

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-509849

(P2014-509849A)

(43) 公表日 平成26年4月24日(2014.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-557052 (P2013-557052)	(71) 出願人	508334199
(86) (22) 出願日	平成24年3月2日 (2012.3.2)		シャリテ-ユニヴェルジテーツメディツィン・ベルリン
(85) 翻訳文提出日	平成25年9月6日 (2013.9.6)		CHARITE-UNIVERSITÄE TSMEDIZIN BERLIN
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/053616		ドイツ連邦共和国デー-10117ベルリン、シャリテプラッツ1番
(87) 国際公開番号	W02012/119938	(71) 出願人	513225774
(87) 国際公開日	平成24年9月13日 (2012.9.13)		マックス-デルブリュック-セントラム フュア モレクラーレ メディツィン
(31) 優先権主張番号	11157229.3		ドイツ連邦共和国 13092 ベルリン ロベルト-レスレー-シュトラ-セ 10
(32) 優先日	平成23年3月7日 (2011.3.7)	(74) 代理人	100092093
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 辻居 幸一
(31) 優先権主張番号	61/449,772		
(32) 優先日	平成23年3月7日 (2011.3.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の治療及び／又は診断におけるアプタマーの使用

(57) 【要約】

本発明は、自己免疫疾患の治療及び／又は診断において使用するための、配列番号1、配列番号2、配列番号3の核酸配列、及び／又は配列番号1、2及び3のうち1つと少なくとも80%同一である核酸配列を含む、又はからなるアプタマーを対象とし、前記自己免疫疾患は心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び／又はアルツハイマー病である。

。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

自己免疫疾患の治療及び／又は診断において使用するための、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 の核酸配列、並びに／又は配列番号 1、2 及び 3 のうち 1 つと少なくとも 80 % 同一である核酸配列を含むアプタマーであって、前記自己免疫疾患が心筋症、拡張型心筋症（DCM）、周産期心筋症（PPCM）、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癩前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び／又はアルツハイマー病である、アプタマー。

【請求項 2】

自己免疫疾患に罹患している患者の血液又はその構成要素のアフェレシス、好ましくは治療的アフェレシスの際の選択性成分として使用するための、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 の核酸配列並びに／又は配列番号 1、2 及び 3 のうち 1 つと少なくとも 80 % 同一である核酸配列を含む、又はからなるアプタマーであって、前記自己免疫疾患が心筋症、拡張型心筋症（DCM）、周産期心筋症（PPCM）、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癩前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び／又はアルツハイマー病である、アプタマー。

【請求項 3】

前記アプタマーがヒトにおける治療及び／又は診断において使用される、請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4】

前記アプタマーが DNA アプタマーである、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記アプタマーが前記の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 の核酸配列、又は配列番号 1、2 及び 3 のうち 1 つと少なくとも 80 % 同一である核酸配列からなる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6】

自己免疫疾患の治療及び／又は診断において使用するための、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のアプタマーと少なくとも 1 種の薬学上許容される賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 7】

自己免疫疾患の治療及び／又は診断において使用するための、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種のアプタマーと容器とを含むキット。

【請求項 8】

G タンパク質共役受容体、好ましくは、ヒト G タンパク質共役受容体であるアドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、及び／又は P A R 受容体に特異的である抗体の生体外検出のための、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のアプタマーの使用。

【請求項 9】

前記被検抗体が自己抗体である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記抗体が体液、好ましくは、ヒト身体の液体、より好ましくは、ヒト血液、血漿、血清、糞尿、滑液、間質液、リンパ液、唾液、髄液及び／又は涙液中に存在するか、又はそれらに由来する、請求項 8 又は 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記体液が、自己免疫疾患、好ましくは、前記患者の血清における G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患、より好ましくは、前記患者の血

10

20

30

40

50

清におけるアドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、及び / 又は P A R 受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患に罹患している、又は罹患している疑いのある個体から採取される、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のアプタマーを含む、アフエレスカラム。

【請求項 13】

自己免疫疾患の治療及び / 又は診断において使用するための、請求項 12 に記載のアフエレスカラムであって、前記自己免疫疾患が心筋症、拡張型心筋症 (D C M)、周産期心筋症 (P P C M)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癩前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び / 又はアルツハイマー病である、アフエレスカラム。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

免疫系はあらゆる動物の不可欠な部分を成している。哺乳動物は、微生物に対する防御、例えば腫瘍細胞のような異常な細胞の検出及び除去、並びに組織の再生においてその免疫系を用いている。それによって、これらの生物は、体液性免疫と細胞性免疫という2つの相互に関連した防御機構に頼っている。

20

【0002】

抗体は、その抗原と結合すると、体液性免疫応答を誘発する。抗体は複数の方法で働くことができる。抗原の中和の他、抗体は補体系も活性化させる。自身の身体の抗原に向けられた抗体も存在する。このようないわゆる自己抗体が生成する理由として、分子模倣及び / 又はバystander アクチベーション (bystander activation) が知られている。自己抗体が自身の抗原と特異的に結合すると、これらの抗原の分解を促進することができるナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) が活性化される。

【0003】

自己免疫疾患は、自身の細胞又は組織に対して免疫応答を誘発する、自身の身体の構成部分に向けられた抗体の、こうした特異的認識及び結合に基づくものである。この免疫刺激作用の他、自己抗体は他の機構によっても病原性表現型の発生に寄与し得る。Gタンパク質共役受容体、例えば、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体及び / 又はプロテイナーゼ活性化受容体 (P A R) の細胞外部分に特異的であり得る自己抗体も存在し、特異的に結合すると、これらの受容体を活性化させたり遮断したりすることができることはよく知られている。このような自己抗体が生物体に存在すると、個々の受容体の永続的活性化又は遮断という意味で促進作用又は拮抗作用がもたらされ、疾病の発生の一端を担う場合がある。

30

【0004】

拡張型心筋症 (D C M) は、高いパーセンテージの患者が、アドレナリン作動性 - 1 受容体の細胞外部分、特に、アドレナリン作動性 - 1 受容体の第 1 ループ又は第 2 ループに結合するこのような活性化型の自己抗体を呈する疾患の 1 つである。結果として、これらの患者においては D C M の自己免疫的病因が示唆された。このような自己抗体が結合すると、受容体は絶えず活性化される (Jahns et al. (2004) Direct evidence for a beta-1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic cardiomyopathy. J.Clin.Invest. 113, 1419-1429)。

40

【0005】

最近の研究では、免疫グロブリン吸着によって血液からこれらの自己抗体を除去することが心筋の再生に寄与することを示すことができた (Wallukat G, Reinke P, Dorffel WV,

50

Luther HP, Bestvater K, Felix SB, Baumann G. (1996) Removal of autoantibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *Int J Cardiol.* 54:191-195; Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R (2000) Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 101:385-391; W.V. Dorfffel, S.B. Felix, G. Wallukat, S. Brehme, K. Bestvater, T. Hofmann, F.K. Kleber, G. Baumann, P. Reinke (1997) Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95, 1994-1997及びW.V. Dorfffel, G. Wallukat, Y. Dorfffel, S.B. Felix, G. Baumann (2004) Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J. Cardiol.* 97, 529-534)。

10

【 0 0 0 6 】

シャーガス心筋症、周産期心筋症、心筋炎、肺高血圧症及び悪性高血圧症など、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体の存在に関連があることが示唆されている心血管系の他の疾患もある。Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体はまた、例えば緑内障、糖尿病、アルツハイマー病、良性前立腺肥大、硬皮症、レイノー症候群、乾癬、及び子癩前症を有する患者、及び慢性シャーガス病の患者、並びに腎臓同種移植片拒絶を伴う患者でも見出された。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、患者において自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患の治療及び/又は診断において使用するための新規なモダリティを提供することである。

20

【 0 0 0 8 】

本発明は、自己免疫疾患の治療及び/又は診断において使用するための、配列番号1、配列番号2、配列番号3の核酸配列、及び/又は配列番号1、2及び3のうち1つと少なくとも80%同一である核酸配列を含む、又はからなるアプタマーを提供する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明のアプタマーは、それらが配列番号1、配列番号2、配列番号3を有するヌクレオチド15個の核酸配列、及び/又は配列番号1、2及び3のうち1つと少なくとも80%同一である核酸配列を含む、又はからなることを特徴とする。15マー：GGT TGG TGT GGT TGG (配列番号1)、26マー：CGC CTA GGT TGG GTA GGG TGG TGG CG (配列番号2)及び12マー：GGT TGG TGT GGT (配列番号3)は全て互いに独立であり、本発明のアプタマーの標的特異性を可能とし、該標的特異性を担う。配列番号1、2及び/又は3を有する核酸配列の5'末端及び/又は3'末端に、さらなる核酸分子又は配列を付加することもできる。前記15マー(配列番号1)は、トロンビンのその結合に関して最初に単離され(米国特許第5,543,293号明細書参照)、これは国際公開第2010/033167号に最初に記載された26マー(配列番号2)についてもそうである。最初に記載されたものはARC183の名称で、第I相臨床試験において、トロンビンの阻害のために、すなわち、急性の心血管状況での使用の可能性に向けた抗凝固薬として、既に用いられている。26マーは、NU172 (ARC2172)の名称で第II相臨床試験(clinical trial gov. identifier: NCT00808964)において用いられている。しかしながら、前記15マー(配列番号1)に関しては、所望の抗凝固を達成するために必要とされるアプタマーの量では最適な投与プロファイルが得られないことが分かった。

30

40

【 0 0 1 0 】

驚くことに、本発明のアプタマーは、自己免疫疾患に関連するGタンパク質共役受容体に特異的な抗体、特に、自己抗体の相互作用を妨げるために使用可能であることが判明した。特に、本発明のアプタマーは、アドレナリン作動性 - 1受容体、アドレナリン作動

50

性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、及び / 又は P A R 受容体に特異的な自己抗体と結合して、これらの自己抗体とその標的タンパク質との特異的相互作用を阻害することができることを示すことができた。これらの相互作用を阻害することにより、本発明のアプタマーは、これらの抗体を除去する必要なく、個々の G タンパク質共役受容体の永続的活性化を減じる、又は無くしさえする。よって、本発明は、自己免疫疾患、特に、G タンパク質共役受容体を認識する自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患、すなわち、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 1 受容体、アドレナリン作動性 - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、及び / 又は P A R 受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患の治療及び / 又は診断における使用のためのそれらの適合性に関して初めて記載される化合物を提供する。更に、本発明のアプタマーは、固定化した後に、上記で示した自己抗体を捕捉することができる。このように、第 1 に患者の血清から自己抗体を除去するためのアフレスシス技術を確立するため、第 2 に自己抗体の測定のための分析ツールを開発するためのプラットフォームが提供される。最後に、特に、自己免疫疾患の診断のために使用することもできる。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】図 1 は、図に示されている種々の A A B の機能活性の中和の用量反応曲線を示す。

20

【図 2】図 2 は、トロンピンアプタマーによる 1 - 受容体 A A B の機能活性を中和する用量反応曲線に対する、ヒト I g G - 3 [7 3 n M] の存在の影響を示す。

【図 3】図 3 は、E T A - A B により媒介される新生児心筋細胞の拍動数低下に対する、トロンピンアプタマーの影響を示す。

【図 4】図 4 は、固定化 E T A - A B、対照としての固定化ウサギ I g G 及び固定化ヒト I g G サブクラスに対するトロンピンアプタマー（配列番号 1）の結合を示す。A 及び C : 各 2 5 n M の固定化タンパク質、B 及び D : 2 5 0 n M の固定化タンパク質。A 及び B : トロンピンアプタマー配列番号 1 の結合、並びに C 及び D : そのスクランブル対照配列の結合。ビオチン化トロンピンアプタマーを使用した。このビオチン部分が検出に役立つ。結合したビオチンの量は、ニュートラアビジン - P O D 及び T M B / H₂O₂ 反応によって定量した。

30

【図 5】図 5 は、固定化トロンピンアプタマー（配列番号 1）に対する E T A - A B (S P 4 1 2 2 P) の結合を示す。固定化のためのトロンピンアプタマーは、A : 1 μ M、B : 0 . 1 μ M。検出には、二次抗ウサギ I g G - P O D 抗体 (1 : 1 0 . 0 0 0) 及び T M B / H₂O₂ 反応を用いた。非コーティングプレート及びニュートラアビジンコーティングプレートを対照として用いた (ニュートラアビジン = N A) 。

【図 6】図 6 は、固定化トロンピンアプタマー（配列番号 1）及び対照としての固定化スクランブルトロンピンアプタマーに対する E T A - A B (S P 4 1 2 2 P) の結合を示す。

【図 7】図 7 は、トロンピンアプタマーカラム及び対応する対照実験（対照カラム）からの溶出後の、結合した E T A - A B の回収を示す。E T A - A B 活性をバイオアッセイで測定した。

40

【図 8】図 8 は、E L I S A 試験における、添加を行った血清からの E T A - A B の回収を示す。A : 溶出液サンプル（透析）と同等に処理した E T A - A B 標準曲線を示す。B : トロンピンアプタマーカラム (A R C 1 8 3 カラム) 及び対応する対照カラム (スクランブルトロンピンアプタマー) からの溶出後の通過画分、洗浄溶液及び溶出液中で回収された E T A - A B の量を示す。検出には、抗ウサギ - I g G - P O D 抗体 (1 : 1 0 , 0 0 0) 及び T M B / H₂O₂ 検出を用いた。

【図 9】図 9 は、自発的に拍動する新生ラット心筋細胞のバイオアッセイを用いた、5 ' - F I T C 標識トロンピンアプタマーの A A B 中和能試験を示す。1 - 受容体 A A B に

50

より生じた拍動数の増加は、100 nM FITC-トロンビンアプタマーが存在した場合には約50%低下した。バーは独立した2回の試験(n=2)の平均である。

【図10】図10は、トロンビンアプタマー//FITC-トロンビンアプタマーサンドイッチアッセイを用いた、患者サンプルのETA- α の検出を示す。対照として、対照IgGサンプル及びスクランブルトロンビンアプタマーを用いた。データは1回の試験から得たものである(FITC-throm-a = FITC-トロンビン-アプタマー、throm-apt a = トロンビン-アプタマー)。

【図11】図11は、自発的に拍動する新生児心筋細胞のバイオアッセイで測定した、100 nM dT-トロンビンアプタマーによる、 α 活性(1-受容体 α 、1+2-受容体 α 、アフィニティー精製2-受容体 α 、各 α n=1)の中和を示す。

【図12】図12は、自発的に拍動するラット心筋細胞のバイオアッセイにおける、1-受容体 α の正の変時活性を中和する原型15マー配列(ARC183、配列番号1)及び26マー配列(NU172、配列番号2)と比較した、末端切断型トロンビンアプタマー配列(12マー配列、配列番号3、Throm K1)の機能性の試験を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明において、用語「アプタマー」は、配列番号1、配列番号2、配列番号3の核酸配列、及び/又は配列番号1、2及び3のうち1つと少なくとも80%同一である核酸配列を含む、又はからなり、かつ、特定の標的分子と、例えば、アドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-2受容体、エンドセリン1-ETA受容体、ムスカリン性M₂受容体、アンギオテンシンII-AT1受容体、及び/又はPAR受容体などのようなGタンパク質共役受容体に向けられた自己抗体と特異的にかつ高親和性で結合することができるオリゴヌクレオチドを意味する。

【0013】

本発明のアプタマーは、核酸分子、すなわちヌクレオチド、の配列を含む、又はからなる。本発明のアプタマーは好ましくは、非修飾及び/又は修飾D-ヌクレオチド及び/又はL-ヌクレオチドを含む。核酸塩基の一般的な一文字コードによれば、「C」はシトシンを表し、「A」はアデニンを表し、「G」はグアニンを表し、そして「T」はチミンを表し、また、「U」はウラシルを表す。以下、そうではないことが示されない限り、用語「ヌクレオチド」は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを意味するものとする。用語「2'-フルオロ修飾ヌクレオチド」、「2'-メトキシ修飾ヌクレオチド」、及び/又は「2'-アミノ修飾ヌクレオチド」はそれぞれ、修飾リボヌクレオチド及び修飾デオキシリボヌクレオチドを意味する。

【0014】

アプタマーは、そのアプタマーが、それぞれ配列番号1、2又は3のヌクレオチド配列に対して、配列番号1、2又は3の全長にわたって少なくとも80%の配列同一性を示すヌクレオチドの連続配列を含む場合に、配列番号1、2及び3のうち1つと少なくとも80%同一である核酸配列からなる、又は含むとみなされる。配列同一性を決定するための手段は当技術分野で周知であり、例えば、アルゴリズムblastnの使用を含み得る。

【0015】

本発明のアプタマーは、15ヌクレオチド~160ヌクレオチド、好ましくは、15ヌクレオチド~120ヌクレオチドの核酸配列を含み得る。

【0016】

本発明のアプタマーは、DNAヌクレオチド配列又はRNAヌクレオチド配列を含み得るか、又はからなり得、従って、それぞれDNAアプタマー又はRNAアプタマーと呼ぶことができる。本発明を通じて明示される配列モチーフ内で、本発明のアプタマーがRNAヌクレオチド配列を含む場合、チミンはウラシルに置き換わると理解される。本発明のRNAヌクレオチド配列は、TがUに置き換わっていること以外は、本発明のDNAヌクレオチド配列と同じである。本発明を通じて簡潔にするために、明確なDNAヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列だけを記載している。しかしながら、それぞれのRNAヌクレオチド配列も本発明に含まれると理解される。

【0017】

DNAアプタマーの使用が特に好ましい。DNAアプタマーは通常、血漿中でRNAアプタマーよりも安定である。

【0018】

本発明のアプタマーは、2'修飾ヌクレオチド、例えば、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシ修飾ヌクレオチド及び/又は2'-アミノ修飾ヌクレオチドを含有するヌクレオチド配列を含み得る。本発明のアプタマーはまた、デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド及び/又は修飾リボヌクレオチドの混合物も含み得る。

10

【0019】

本発明のアプタマーは、修飾を含み得る。このような修飾は、例えば、少なくとも1つのヌクレオチドのアルキル化、すなわち、メチル化、アリール化又はアセチル化、鏡像異性体の包含及び/又はアプタマーと1以上の他のヌクレオチド又は核酸配列との融合を包含する。このような修飾は、例えば、5'-CAP修飾及び/若しくは3'-CAP修飾、又は5'-PEG構造及び/若しくは3'-PEG構造を含み得る。代わりに、又は加えて、本発明のアプタマーは、修飾ヌクレオチド、好ましくは、ロックド(locked)核酸、2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-メトキシ修飾ヌクレオチド及び/又は2'-アミノ修飾ヌクレオチドから選択されるものを含み得る。

20

【0020】

ロックド核酸(locked-nucleic acids)(LNA)は、コンフォメーションが固定された各RNAヌクレオチドの類似体を表す。ロックド核酸のオリゴヌクレオチドは、2'-OH基がメチレン基を介してC4-炭素原子に連結されている1以上の二環式リボヌクレオシドを含む。ロックド核酸は、ヌクレアーゼに対し、各非修飾RNAアプタマー対応物に比べて安定性の向上を示す。また、ハイブリダイゼーション特性も改良され、これにより、アプタマーの親和性及び特異性の増強が可能となる。

【0021】

もう1つの好ましい修飾は、前記アプタマーの3'末端及び/又は5'末端への、いわゆる3'-CAP構造、5'-CAP構造、及び/又は修飾グアノシンヌクレオチド(例えば、7-メチル-グアノシン)の付加である。このような3'末端及び/又は5'末端の修飾は、ヌクレアーゼによる急速な分解からアプタマーを保護する効果を持つ。

30

【0022】

代わりに、又は加えて、本発明のアプタマーは、ペグ化された5'末端及び/又は3'末端を呈することができる。5'-PEG修飾及び/又は3'-PEG修飾は、少なくとも1つのポリエチレングリコール(PEG)単位の付加を含み、好ましくは、このPEG基は、1~900個のエチレン基、より好ましくは、1~450個のエチレン基を含む。好ましい実施形態では、アプタマーは、HO-(CH₂CH₂O)_n-H(式中、nは1~900の整数であり、好ましくは、nは1~450の整数である)を有する直鎖PEG単位を含む。

40

【0023】

本発明のアプタマーは、ホスホチオエート主鎖を有する核酸配列を含み得るか、若しくはからなることができ、又は全部が又は一部がペプチド核酸(PNA)として構成されてもよい。

【0024】

本発明のアプタマーを上述の方法のうち1以上によって修飾する1つの利点は、アプタマーが使用される環境に存在する、例えばヌクレアーゼのような有害な影響に対して、アプタマーを安定化させることができるということである。前記修飾はまた、アプタマーの薬理特性を適合させるためにも適している。前記修飾はアプタマーの親和性又は特異性を変化させないことが好ましい。

50

【0025】

本発明のアプタマーはまた、担体分子及び/又はリポーター分子とコンジュゲートさせてもよい。担体分子は、アプタマーとコンジュゲートされた際に、例えば、安定性を増強することにより、かつ/又は排泄速度に影響を与えることにより、コンジュゲートされたアプタマーのヒト血漿中での血漿半減期を延長するような分子を含む。好適な担体分子の一例としてPEGがある。リポーター分子は、コンジュゲートされたアプタマーの検出を可能とする分子を含む。このようなリポーター分子の例として、GFP、ビオチン、コレステロール、例えば蛍光色素のような色素、電気化学的に活性なリポーター分子及び/又は放射性残基、特に、例えば¹⁸F、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁸²Rb又は⁶⁸GaのようなPET（陽電子放射型断層撮影法）検出に好適な放射性核種を含む化合物がある。当業者は、好適な担体及びリポーター分子並びにそれらを本発明のアプタマーにコンジュゲートさせる方法を十分認識している。

10

【0026】

本発明のアプタマーは、抗体の促進効果又は遮断効果を阻害する。本発明において、用語「抗体」は、例えば、自己抗体、特に、例えば、アドレナリン作動性 - 1受容体、アドレナリン作動性 - 1受容体、アドレナリン作動性 - 2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリン性M₂受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、及び/又はP A R受容体のようなGタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患に罹患している患者の自己抗体を含む天然抗体、及び修飾された又は遺伝子操作された抗体を意味する。自己抗体は、個体の免疫系によって製造された、その個体自身の1以上のタンパク質に向けられた抗体である。しかしながら、抗体という用語は、従来の重鎖及び軽鎖構造を有する抗体に限定されない。本明細書において用語「抗体」は、技術分野で認知された用語であり、所与の抗原と結合する分子又は分子の活性フラグメントを意味すると理解され、特に、この用語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原と特異的に結合する結合部位を含む分子を意味する。免疫グロブリンは、免疫グロブリン 及び 、 、 、 及びμ定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子によって実質的にコードされている1以上のポリペプチドを含むタンパク質である。軽鎖は 又は のいずれかに分類される。重鎖は 、 μ、 、 、 又は に分類され、そしてこれが、それぞれ免疫グロブリンクラス I g G、I g M、I g A、I g D及びI g Eを定義する。また、重鎖のサブクラスも知られている。例えば、ヒトのI g G重鎖は、I g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4サブクラスのいずれかであり得る。抗体は好ましくは、I g M及び/又はI g Gクラス又はこれらのいずれかのサブクラス（I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）であり得る。

20

30

【0027】

「抗体」は、本発明の範囲内で、自己抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、サル化、ヒト及びヒト化抗体、並びにこれらの活性フラグメントを含むものとする。既知の抗原と結合する分子の活性フラグメントの例としては、分離された軽鎖及び重鎖、F a b、F a b / c、F v、F a b'、及びF (a b') 2フラグメントが挙げられ、F a b免疫グロブリン発現ライブラリーの産物、並びに上述の抗体及びフラグメントのいずれかのエピトープ結合フラグメントが含まれる。

40

【0028】

本発明のアプタマーは、自己免疫疾患の治療及び/又は診断において使用される。本発明において用いる場合、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患、特に、ヒトにおける自己免疫疾患を意味し、前記自己免疫疾患は、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する。前記自己抗体は好ましくは自己免疫疾患の病因に関連する可能性があり、従って、前記自己免疫疾患に罹患している患者の血清中に存在する可能性がある。より好ましくは、自己免疫疾患は、患者の血清における、アドレナリン作動性 - 1受容体、アドレナリン作動性 - 1受容体、アドレナリン作動性 - 2受容体、エンドセリン1

50

E T A 受容体、ムスカリン性 M₂ 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、及び / 又は P A R 受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患である。いっそうより好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症 (D C M)、周産期心筋症 (P P C M)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癩前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び / 又はアルツハイマー病である。最も好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症 (D C M)、周産期心筋症 (P P C M)、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び / 又はアルツハイマー病を意味する。

10

【 0 0 2 9 】

本発明のアプタマーの製造又は大量生産は当技術分野で周知であり、単に慣例の作業に過ぎない。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、本発明の少なくとも 1 種のアプタマーと所望により少なくとも 1 種の薬学上許容される賦形剤とを含む医薬組成物も対象とする。本発明はまた、本発明のアプタマー又は本発明の異なるアプタマーの混合物と例えば好適な担体又は希釈剤のような薬学上許容される賦形剤とを含む医薬組成物も対象とする。

【 0 0 3 1 】

好ましくは、本発明のアプタマーは、医薬組成物の有効成分を構成し、且つ / 又は有効量で存在する。

20

【 0 0 3 2 】

用語「有効量」は、疾患又は病態に予防上、診断上又は治療上適切な効果を有する本発明のアプタマーの量を表す。予防効果は疾患の発症を予防する。治療上適切な効果は、疾患の 1 以上の症状をある程度軽減するか、又は疾患若しくは病態と関連のある、若しくは原因となる 1 以上の生理学的又は生化学的パラメーターを部分的に若しくは完全に正常に戻す。本発明のアプタマーを投与するための個々の量は、所望の予防、診断又は治療効果を達成するために十分に高いものである。当業者ならば、任意の特定の哺乳動物に対する具体的な用量レベル、投与の頻度及び期間は、使用する具体的成分の活性、年齢、体重、健康状態、性、食餌、投与時間、投与経路、薬物の組合せ、及び具体的療法の重篤度 (the severity of the specific therapy) を含む様々な要因によって決まることが理解されるであろう。当業者ならば、周知の手段及び方法を用い、慣例の実験の一事項として正確な量を決定することができる。

30

【 0 0 3 3 】

本発明の医薬組成物では、総アプタマー含量の少なくとも 2 0 %、好ましくは少なくとも 5 0 %、より好ましくは少なくとも 7 5 %、最も好ましくは少なくとも 9 5 % が本発明のアプタマーから構成される。

【 0 0 3 4 】

療法に使用する場合、医薬組成物は一般に 1 種以上の薬学上許容される賦形剤を伴う製剤として投与される。用語「賦形剤」は、本明細書では、本発明のアプタマー以外の任意の成分を表して用いられる。賦形剤の選択は、特定の投与様式に依存するところが大きい。賦形剤は好適な担体及び / 又は希釈剤であり得る。

40

【 0 0 3 5 】

本発明の医薬組成物は、経口投与することができる。経口投与は嚥下を含んでよく、その場合には前記組成物は消化管に入り、或いは頬側又は舌下投与を用いてもよく、これによれば前記組成物は口腔から直接血流に入る。

【 0 0 3 6 】

経口投与に好適な製剤としては、錠剤；コーティング錠；粒子、液体又は粉末を含有するカプセル剤；トローチ剤 (液体充填型を含む)；及び咀嚼剤などの固体製剤；多粒子及びナノ粒子；ゲル；固溶体；リポソーム；フィルム、腔坐剤、噴霧剤及び液体製剤が含ま

50

れる。

【0037】

液体製剤としては、懸濁液、溶液、シロップ剤及びエリキシル剤が含まれる。このような製剤は軟カプセル又は硬カプセル中の充填剤として用いてもよく、一般に担体、例えば、水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、メチルセルロース、又は好適なオイル、及び1種以上の乳化剤及び/又は沈殿防止剤を含む。液体製剤はまた、例えばサシェ剤からの固体の再構成によって調製することもできる。

【0038】

錠剤投与形の場合、用量に応じ、本発明のアプタマーは投与形の0.1質量%~80質量%、より一般には投与形の5質量%~60質量%を構成し得る。本発明のアプタマーに加え、錠剤は一般に崩壊剤を含有する。崩壊剤の例としては、グリコール酸ナトリウムデンプン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、微晶質セルロース、低級アルキル置換ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、アルファ化デンプン及びアルギン酸ナトリウムが挙げられる。一般に、崩壊剤は投与形の1質量%~25質量%、好ましくは5質量%~20質量%含む。

10

【0039】

錠剤は、例えば、結合剤、界面活性剤、滑沢剤、及び/又は例えば、抗酸化剤、着色剤、香味剤、保存剤及び/又は矯味剤のような他の可能性のある成分といった付加的賦形剤を含んでもよい。

20

【0040】

錠剤ブレンドは直接打錠してもよく、又はローラーにより錠剤を形成してもよい。或いは、錠剤ブレンド又はブレンドの一部を、打錠前に湿式造粒、乾式造粒、熔融造粒、熔融凝固、又は押出成形してもよい。最終的な製剤は1以上の層を含んでもよく、コーティングしてもコーティングしなくてもよく、それを更にカプセル封入してもよい。

【0041】

経口投与用固体製剤は、即時放出及び/又は調節放出されるように調剤することができる。調節放出製剤としては、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出及びプログラム放出が含まれる。

【0042】

本発明の医薬組成物はまた、血流中、筋肉中、又は内部器官中に直接投与してもよい。非経口投与のための好適な手段としては、静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、心室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内及び皮下が含まれる。非経口投与のために好適なデバイスとしては、有針(マイクロニードルを含む)注射器、無針注射器及び注入技術が含まれる。

30

【0043】

非経口製剤は一般に、塩、炭水化物及び緩衝剤(好ましくは、3~9のpHに緩衝)などの賦形剤を含有し得る水溶液であるが、適用によっては、それらは無菌非水溶液として、又は無菌発熱物質不含水などの好適なビヒクルとともに使用される乾燥形態として調剤することがより好適である場合がある。

40

【0044】

例えば凍結乾燥によるなど、無菌条件下での非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的製薬技術を用いて容易に達成することができる。

【0045】

非経口溶液の調製に使用する本発明の医薬組成物の溶解度は、溶解促進剤の配合などの適当な調剤技術の使用によって増大させることができる。

【0046】

非経口投与用の製剤は、即時放出及び/又は調節放出されるように調剤することができる。調節放出製剤としては、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出及びプログラム放出が含まれる。従って、本発明の化合物は、有効化合物の調節放出を提供す

50

るインプラント型デポーターとして投与するための固体、半固体、又はチクソトロピー液体として調剤してもよい。このような製剤の例としては、薬物コーティングステント及びPGLAポリ(D,L-乳酸-コグリコール)酸(PGLA)マイクロスフェアが含まれる。

【0047】

本発明の医薬組成物はまた、皮膚又は粘膜に局所的に、すなわち、皮膚に又は経皮的に投与してもよい。この目的に典型的な製剤としては、ゲル、ヒドロゲル、ローション、溶液、クリーム、軟膏、撒布粉剤、包帯、フォーム、フィルム、皮膚パッチ、ウエハース、インプラント、スポンジ、繊維、帯具及びマイクロエマルジョンが含まれる。リポソームもまた使用可能である。典型的な担体としては、アルコール、水、鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、グリセリン、ポリエチレングリコール及びプロピレングリコールが含まれる。浸透促進剤を配合してもよい。局所投与の他の手段としては、エレクトロポレーションによる送達、イオン導入法(iontophoresis)、音波導入法(phonophoresis)、超音波導入法(sonophoresis)及びマイクロニードル又は無針(例えば、Powderject(商標)、Bioject(商標)など)注射が含まれる。局所投与用製剤は、即時放出及び/又は調節放出されるように調剤することができる。調節放出製剤としては、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出及びプログラム放出が含まれる。

10

【0048】

ヒト患者への投与に関して、本発明のアプタマー及び/又は本発明の医薬組成物の総一日用量は、もちろん投与様式に応じて、一般に0.001mg~5000mgの範囲である。例えば、静脈内一日用量は0.001mg~40mgを必要とするだけである。総一日用量は単回用量で投与しても分割用量で投与してもよく、医師の判断で本明細書に示される典型的範囲から外れてもよい。

20

【0049】

これらの用量は約65kg~70kgの体重を有する平均的なヒト被験者に基づくものである。医師は、小児及び高齢者など、体重がこの範囲外にある被験者に対する用量を容易に決定することができる。

【0050】

本発明はまた、本発明のアプタマー、医薬組成物、容器及び所望により使用説明書及び/又は投与手段を含むキットを包含する。

【0051】

本発明のアプタマー、医薬組成物及び/又はキットは、自己免疫疾患、特に、ヒトにおける自己免疫疾患の治療及び/又は診断において使用される。好ましくは、自己免疫疾患は、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患であり、この場合、自己抗体は前記自己免疫疾患に罹患している患者の血清中に存在する。より好ましくは、自己免疫疾患は、患者の血清におけるアドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-2受容体、エンドセリン1、ETA受容体、ムスカリン性M₂受容体、アンジオテンシンII AT₁受容体、及び/又はPAR受容体に特異的な自己抗体の存在に関連する自己免疫疾患である。いっそうより好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び/又はアルツハイマー病である。最も好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び/又はアルツハイマー病を意味する。

30

40

【0052】

本明細書において、用語「療法」、「治療」及び「治療上」は、治療する行為を意味し、「治療する」は以下に定義される。本明細書において、用語「治療する」は、この用語を適用する疾患、障害若しくは病態の進行を逆転させること、緩和すること、若しくは阻

50

害すること、又はそのような疾患、障害若しくは病態の1以上の症状の進行を逆転させること、緩和すること、若しくは阻害することを意味する。本明細書において、「治療する」とはまた、哺乳動物における疾患、障害又は病態の発生の確率又は罹患率を、未治療の対象集団と比較して、又は治療前の同じ哺乳動物と比較して低減することも意味し得る。例えば、本明細書において、「治療する」とは、疾患、障害又は病態を予防することを意味する場合もあり、疾患、障害若しくは病態の発症を遅延させる、若しくは予防すること、又は疾病、障害若しくは病態に関連する症状を遅延させる、若しくは予防することも含み得る。本明細書において、「治療する」とはまた、疾患、障害若しくは病態、又はそのような疾患、障害若しくは病態に関連する症状の重篤度を、哺乳動物がその疾患、障害又は病態に罹患する前に軽減することも意味し得る。このような、罹患前の疾患、障害若しくは病態の予防、又はその重篤度の軽減は、投与時にその疾患、障害又は病態に罹患していない被験体に、本明細書に記載されるように、本発明の組成物を投与することに関する。本明細書において、「治療する」とはまた、疾患、障害若しくは病態、又はそのような疾患、障害若しくは病態に関連する1以上の症状の再発を予防することも意味し得る。

10

【0053】

疾患の治療及び/又は診断に関して、投与経路に関係なく、本発明のアプタマーは、1回治療サイクルにつき20mg/kg体重以下、好ましくは10mg/kg体重以下、より好ましくは1µg/kg~20mg/kg体重の範囲から選択される、最も好ましくは0.01~10mg/kg体重の範囲から選択される一日用量で投与される。

【0054】

本発明はまた、自己免疫疾患の治療及び/又は診断のための薬剤の製造における、本発明のアプタマー又は本発明の医薬組成物の使用を対象とする。好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び/又はアルツハイマー病である。いっそうより好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び/又はアルツハイマー病を意味する。

20

30

【0055】

別の態様において、本発明は、自己免疫疾患の治療又は診断方法を対象とし、そのような治療を必要とする個体に有効量の本発明のアプタマー又は本発明の医薬組成物が投与される。好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び/又はアルツハイマー病である。いっそうより好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び/又はアルツハイマー病を意味する。

40

【0056】

本発明のアプタマーは、自己免疫疾患の治療又は診断に使用される場合、必ずしも個体又は患者に投与される必要はない。治療効果又は診断効果はまた、身体又は体液からの、例えば自己抗体のような抗体の除去に本発明のアプタマーを使用することによって達成することもできる。このような除去は、本発明のアプタマーが*ex vivo*において、例えば、免疫吸着及び/又はアフレスिस中にのみ体液と接触され、従って、本発明のアプタマーが治療を受ける個体又は患者の身体に入らない状態での本発明のアプタマーの適用を含み得る。よって、本発明はまた、本発明のアプタマーを含むアフレスिसカラムも対象とする。

50

【0057】

アフエレシスは、ドナー又は患者の血液を、ある特定の構成要素を分離し、残りのものをそのドナー又は患者の循環に再び戻すような装置に通すという医療技術である。本発明のアプタマーは、アフエレシスの際の選択性成分として使用することができる。この選択性成分は、サンプル又は血液中に存在する、本発明のアプタマーによって特異的に標的とされる所望の特定構成要素、すなわち、抗体又は自己抗体を特異的に分離することを担う。好ましくは、本発明のアプタマーは、自己免疫疾患に罹患している患者に由来する血液又はその一部の治療的アフエレシスにおいて選択性成分として使用される。より好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症（DCM）、周産期心筋症（PPCM）、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び/又はアルツハイマー病である。いっそうより好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症（DCM）、周産期心筋症（PPCM）、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び/又はアルツハイマー病を意味する。

10

【0058】

本発明はまた、本発明のアプタマーと固相支持体との結合体に関する。当業者は、このようなアプタマーと固相支持体との結合体を製造するために使用可能な技術及び材料を十分認識している。好ましい実施形態では、固相支持体は、医学的、生化学的又は生物学的アッセイにおいて適用可能な固相材料、例えば、アフエレシス又はELISAアッセイにおいて使用される材料を含む。前記固相材料は、医学的、生化学的又は生物学的アッセイにおいて支持体として通常使用されるポリマーを含む。特に、本発明のアプタマーは、得られる生成物が、アフエレシスに好適なカラム、好ましくは、液体サンプル、好ましくは体液から、本発明のアプタマーが特異的に結合し得る抗体を除去するためのアフエレシスでの使用に好適なカラムの製造に使用可能となるような固相支持体に結合させることができる。

20

【0059】

さらなる態様において、本発明は、Gタンパク質共役受容体、好ましくは、Gタンパク質共役受容体であるアドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリン性M₂受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、及び/又はP A R受容体に特異的である、例えば自己抗体のような抗体の生体外検出及び/又は同定のための本発明のアプタマーの使用を対象とする。

30

【0060】

このような使用は、有効量の本発明のアプタマーの存在下及び不在下でのラット心筋細胞拍動数アッセイにおけるサンプルの試験を含み得る。サンプルと本発明のアプタマーが拍動数に及ぼす影響によって、当業者は個々の抗体の存在を結論付けることができる。また、サンプル中のこのような抗体の総量又は相対量に関するデータとともに、このような抗体の他の特性に関するデータも得ることができる。

40

【0061】

いわゆるラット心筋細胞拍動数アッセイは、患者に由来する、例えば、ヒトアドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-1受容体、アドレナリン作動性-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリン性M₂受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、及び/又はP A R受容体のような、いくつかのヒトGタンパク質共役受容体に特異的な抗体、例えば、自己抗体の検出及び同定のための、十分に確立されたアッセイである。このアッセイは、Wallukat et al. (1987) Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chromotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes, Biomed. Biochim. Acta 46, 634-639; Wallukat et al. (1988) Cultivated cardiac mus

50

cle cells - a functional test system for the detection of autoantibodies against the beta adrenergic receptor, Acta Histochem. Suppl. 35, 145-149;及びWallukat et al. (2010) Distinct patterns of autoantibodies against G-protein coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients, J. Am. Coll. Cardiol. 55, 463-468に詳細に記載されている。よって、当業者はこのアッセイの性質を十分認識し、その適用方法を知っている。

【0062】

本発明のアプタマーは、特に個々の抗体の検出及び/又は同定に使用することができ、前記抗体は、体液、好ましくは、ヒト身体の液体、より好ましくは、ヒト血液、血漿、血清、尿、糞便、滑液、間質液、リンパ液、唾液、汗、髄液及び/又は涙液中に存在するか、又はそれらに由来する。好ましい実施形態では、体液は、自己免疫疾患に罹患している、又は罹患している疑いのある個体から採取される。好ましくは、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、シャーガス巨大食道、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大、硬皮症、乾癬、レイノー症候群、子癇前症、腎臓同種移植片拒絶、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、及び/又はアルツハイマー病である。いっそうより好ましくは、用語「自己免疫疾患」は、自己免疫疾患である拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、シャーガス心筋症、シャーガス巨大結腸、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群及び/又はアルツハイマー病を意味する。

【0063】

このような抗体の検出及び/又は同定に関して、本発明のアプタマーは溶液中で又は固定化形態で使用可能である。

【0064】

本発明のアプタマーは、前記抗体の直接的又は間接的検出及び/又は同定に使用可能である。

【0065】

以下、例を挙げて本発明を更に説明し、例示する。

【実施例】

【0066】

概要

それぞれ配列番号1及び2を有する核酸配列からなるアプタマーは、Gタンパク質共役受容体を標的とする自己抗体に対して親和性があり、且つ、特異的な結合剤である。前記アプタマーは、AAB(自己抗体)機能を可溶状態で中和することができる。表面に固定化されたアプタマーはAABを捕捉することができる。その後溶出を行えば、捕捉されたAABを除去することができる。

【0067】

従って、本発明のアプタマーは、Gタンパク質共役受容体に対して機能的に活性なAABに関連する疾患の治療のために、治療目的及び診断目的で適当な分子であることが示された。

【0068】

材料及び方法

心筋細胞の調製及び培養

1~3日齢のラットの心臓を無菌条件下で摘出し、ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に移した。心室組織を分離し、細片に切断し、ペニシリン/ストレプトマイシンを含有する10mlのPBSで2回洗浄し、最後にPBSのみで1回洗浄した。これらの心室細片を、0.2%トリプシンを含有する30mlのPBSに懸濁させた。37℃で20分間インキュベートした後、このトリプシン処理を10mlの氷冷した熱不活化仔ウシ血清で停止させた。得られた懸濁液を130×gで6分

10

20

30

40

50

間遠心分離し、ペレットを20mlのSM20-I培地に移した。細胞数の評価のため、100 μ lのこの懸濁液を100 μ lのトリパンブルー溶液に加えた。細胞培養のため、 2.4×10^6 細胞を、加湿空気で平衡化し10%熱不活化仔ウシ血清、0.1mUインスリン、及び2 μ Mフルオロデオキシウリジン（非筋細胞による筋細胞の肥大を防ぐ）を添加したグルコース含有SM20-I培地2.5mlに懸濁させ、12.5cm²のファルコンフラスコに移し、単層として37℃で4日間培養した。培地を2日後に更新した。

【0069】

バイオアッセイの原理

AABの同定及び定量のため、最初にWallukat and Wollenberger (Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the serum gamma globulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chromotropic beta adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. Biomed Biochim Acta 1987;46:S634-9)によってGタンパク質共役受容体に対するAABの測定のために確立され、最近、本発明者らが慢性シャーガス病においてアドレナリン作動性 β_1 及び β_2 受容体並びにムスカリン作動性M2受容体に対するAABの測定に関して詳細に記載した(Wallukat G, Munoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borge s AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. J Am Coll Cardiol. 2010;55:463-8)バイオアッセイを用いた。

【0070】

このバイオアッセイにおいて、自発的に拍動する培養新生ラット心筋細胞の変時応答を記録した。なお、前記変時応答は、アドレナリン作動性 β_1 及び β_2 受容体又はアドレナリン作動性 β_1 受容体を標的とするものなどのAABを刺激することによって生じる正の変時性と、ムスカリン作動性M2受容体又はエンドセリン受容体A型（ETA受容体）を標的とするものなどのAABを阻害することによって生じる負の変時性の和である（1単位のAAB活性 = 1拍/分の拍動数変化）。

【0071】

AAB種を変時応答（正又は負の変時性）への寄与に関して区別するために、 β_2 受容体AABに対するICI-118,551、M2-AABに対するアトロピン、 β_1/β_2 受容体AABに対するプロプラノロール、ETA受容体に対するBQ610又はBQ123、 β_1 アドレナリン受容体に対するプラゾシン、及びAT1受容体に対するイベサルタン(Ibesartan)又はロサルタンなどの特異的拮抗剤の存在下で分析を行った。特異的に遮断された一度を除く残りの活性変化はAABにより生じたものである。

【0072】

上記に示した種々の受容体AABのさらなる同定は、前記受容体の細胞外ループに相当するAABエピトープ提示ペプチドを使用することで行った。

【0073】

前記バイオアッセイは、全てのヒト血清AAB、及びその配列がヒト受容体と相同であり（AAB標的化の場合）、且つGタンパク質系などの細胞の拍動数（収縮性、変時性）を調節する機構に関連する細胞表面の受容体を標的とする他の分子を検出及び定量することができる。

【0074】

AABの同定及び区別並びにAAB活性の測定のための血清サンプルの調製

1mlの対照及び患者血清と660 μ lの飽和硫酸アンモニウム溶液を混合し（終濃度40%硫酸アンモニウム）、4℃で18時間インキュベートした。6,000 \times gで15分間遠心分離した後、ペレットを750 μ lのPBSに再懸濁させ、750 μ lの飽和硫酸アンモニウム溶液と混合し（終濃度50%硫酸アンモニウム）、再び遠心分離した。この後、ペレットを700 μ lのPBSに懸濁させ、100倍容量のPBSに対して透析した。得られたIgG画分は測定まで-20℃で保存することができる。

【 0 0 7 5 】

結果

特異的アプタマーによる、Gタンパク質共役受容体に対する種々のA A BのA A B機能の阻害

以下では、抗体（患者血清由来の自己抗体）の活性の、アプタマー配列番号1（トロンビンアプタマー配列番号1又はARC183としても知られる、米国特許第5,543,293号明細書に記載）による、及びアプタマー配列番号2（トロンビンアプタマー配列番号2、又はARC2172若しくはNU172としても知られる、国際出願公開第2007/025049号に記載）による中和を検討した（表1）。

【 0 0 7 6 】

この実施において以下の抗体（自己抗体 = A A B）：アドレナリン作動性 1 受容体 A A B、アドレナリン作動性 2 受容体 A A B、ムスカリン性 M₂ 受容体 A A B、エンドセリン1 E T A 受容体 A A B（E T A - A A B）、アンギオテンシン I I A T 1 受容体 A A B、及び P A R 受容体 A A B を検討した。

【 0 0 7 7 】

このような A A B の存在は以下の病的状態：D C M、シャーガス心筋症、慢性シャーガス病、シャーガス巨大結腸、周産期心筋症、緑内障(Glaucom)、肺高血圧症、高血圧症、悪性高血圧症(maligne hypertension)、糖尿病(diabetis mellitus)、アルツハイマー病、腎臓同種移植片拒絶、レイノー症候群において記載されているが、同一又は類似の A A B の媒体となり得る他の病的状態を排除するものではない。表1は、Gタンパク質共役受容体に向けられた全ての供試自己抗体の機能活性が、配列番号1を有するアプタマーを用いた場合に中和され、又は配列番号2を有するアプタマーを用いた場合には部分的に中和されたことを示す。

【 0 0 7 8 】

10

20

【表 1 - 1】

Gタンパク質共役受容体に向けられたAABの機能活性の中和に対するアプタマ-配列番号1及び配列番号2[100nM]の能力を示す。
AABの機能活性は細胞の拍動数を変化させる能力によって測定した[Δ拍動数/15秒]

疾患	AAB型	ループ	アフィニ ティ-精 製	アプタマ -無し	+トロンピンアプタ マー(配列番号1)	+スクランブル アプタマー	+トロンピンアプタ マー(配列番号2)
DCM	β1受容体AAB	1. ループ		患者1 患者2	-0.17 0.5		
		2. ループ		患者1	0.17 0.33	5.33	
線内障	β2受容体AAB	2. ループ	有り	患者1	0.33		5.33
				患者2	-0.17		
				患者3	0.67		
				患者4	-0.17		
周産期心筋症	β1受容体AAB	2. ループ	有り	患者1	0.5		4.0
				患者2	-0.17		
肺高血圧症	α1受容体AAB	2. ループ		患者1	5.5		2.0
				患者2	5.17		
高血圧症	エンドセリン 受容体AAB	2. ループ		患者1	-4.83		2.0
				患者2	-4.8		
				患者1	5.5		
				患者2	6.33		
悪性高血圧症	AT1受容体AAB	2. ループ		患者1	1.0		3.33
				患者2	-0.83		
シャ-ガス巨 大結腸	β2受容体AAB	2. ループ		患者1	0.67		2.0
				患者2	-0.5		
シャ-ガス 心筋症	β1受容体AAB	2. ループ		患者2	0.5		3.0
				患者2	-3.67		
腎臓移植移植 片拒絶	AT1受容体AAB	2. ループ	有り	患者1	0.17		3.0
				患者1	6.17		

10

20

30

40

(図1)。これを実施したところ、Gタンパク質共役受容体に対するヒトAABが中和されただけでなく、SHRラットの血液に由来する1受容体AABも中和された。実際に、1受容体の第1又は第2ループに対するヒトAAB、AT1受容体及びアドレナリン作動性1受容体に対するAABが中和された。ラットの1受容体AABは、自発的に形成されたAABである。

【0080】

これらの用量反応曲線は若干の違いを示すことが明らかになった。この中和効果はヒト1受容体AABで最も有効であり、ラット1受容体AABでは最小の効果を示した。AAB濃度がIgG画分の0.1%前後であると考えたと(Dr. Wallukatの私的情報)、種々のアプタマー濃度は終濃度約1.4nM AAB(通常IgG濃度約10g/l = 68.5μM、細胞培養培地中AABの希釈は1:50)となる。これにより、一般にAAB機能の完全な阻害には100nMのアプタマーが必要であるが、1受容体AABなどのいくつかのAABでは、約1nMのアプタマー濃度で中和効果が始まるということが極めて論理的となる。

【0081】

競合するヒトIgG-3の存在下でのアプタマー-AAB親和性

ヒトIgGサブタイプに対するトロンピンアプタマー配列番号1の親和性を試験する前者の実験は、トロンピンアプタマー配列番号1がIgG-3、次いでIgG-4、IgG-2、及びIgG1に対して高い親和性を有することを示した。最後の3つのサブタイプ間の違いはわずかなものに過ぎず、サブタイプIgG-3に対する親和性が著しかった(データは示されていない)。

【0082】

ここで、AABに対するトロンピンアプタマー配列番号1の親和性が、IgG-3サブクラスに対するその一般的親和性に比べて高いかどうかを調べるために、以下の競合実験を行った:ヒト患者血清AAB(1受容体AAB、第2ループ、1:50希釈)に対するトロンピンアプタマー配列番号1の用量反応曲線を求めるとともに、1つの実験セットにおいて、トロンピンアプタマーの結合に関して1受容体AABと競合可能な73nMのヒトIgG-3を加えた(図2)。特に低濃度のトロンピンアプタマー配列番号1(1、5、及び10nMトロンピンアプタマー)では(このIgG-3濃度は、トロンピンアプタマーに対して明らかにモル過剰である)、IgG-3が存在する場合でも存在しない場合でも、AAB中和効果間に違いは見られなかった。

【0083】

モデル自己抗体:受容体の第2の細胞外ループに対するウサギ抗ヒトエンドセリン受容体抗体(acris antibodies社、SP41222P)を用いたトロンピンアプタマーと自己抗体の間の結合の証明

1. バイオアッセイにおけるETA-AAB機能試験及びトロンピンアプタマー配列番号1による中和

ヒトエンドセリン受容体の第2の細胞外ループに対してウサギエンドセリン受容体抗体(ETA-AAB)を作製した。この抗体はバイオアッセイにおいて機能活性を示した。このETA-AABは、自発的に拍動する新生(neonatale)ラット心筋細胞の拍動数の減少を引き起こした(図3)。100nMのトロンピンアプタマーを添加すると、このETA-AABの完全な中和が起こり、拍動数に変化が生じた(図3)。トロンピンアプタマー(配列番号1)を単独で新生(neonatale)ラット心筋細胞に添加しても、細胞に対して視覚的影響は無く、基本拍動数にも影響を及ぼさなかった(データは示されていない)。

【0084】

2. トロンピンアプタマー配列番号1とETA-AABの間の直接的結合の試験

2つの異なる試験設定のELISA試験において、トロンピンアプタマーとETA-AABの間の直接的結合を試験した。第1に、ETA-AABをELISAプレートに固定化し、そのトロンピンアプタマー配列番号1との結合能を試験した(図4)。第2の試験セットでは、トロンピンアプタマー配列番号1を固定化し、ETA-AABを結合に用いた(図

10

20

30

40

50

5)。

【0085】

第1の試験セットでは、ELISAプレートへの固定化のために2種類の異なるタンパク質濃度を選択した：25 nM (図4A)及び250 nM (図4B)。対照として、同じ濃度のウサギIgG、ヒトIgGサブクラス(IgG-1、2、3及び4)と、非コーティングプラスチックプレートを用いた。さらなる対照をスクランブルトロンピンアプタマー配列とし、これを結合に用いた(図4C、D)。

【0086】

第2の試験セットでは、ETA-ABとトロンピンアプタマー配列番号1の間の結合を逆にして試験した。この場合には、ニュートラアビジンを予め固定化することにより、ELISAプレートにビオチン化トロンピンアプタマーを固定化した。その後、ETA-ABを結合に用いた(図5A、B)。

10

【0087】

図5Bと5Aの吸光度を比較すると、この与えられた試験では、0.1 μMのトロンピンアプタマー(配列番号1)のコーティングで既に飽和に達していたことが示される。

【0088】

さらなる対照を、固定化スクランブルトロンピンアプタマーに対するETA-ABの結合とした(図6)。

【0089】

前記スクランブルトロンピンアプタマーに対するETA-ABの親和性は、トロンピンアプタマー(配列番号1)を結合に用いた場合に達成された親和性の約50%であった。

20

【0090】

血清からAABを除去するためのトロンピンアプタマーカラム(Thombinaptamar-column) 1. ウサギETA-ABを添加したヒト血清

以下では、トロンピンアプタマーカラムを作製し、血清からAABを除去するために用いた。対照として、スクランブルトロンピンアプタマーを保持するカラムを用いた。

【0091】

アプタマー(トロンピンアプタマー配列番号1)及びスクランブル対照配列を、0.1 μmolの濃度でカラム材料(NHS活性化セファロース、GE healthcare)に結合させた。

30

【0092】

第1の試験セットでは、バイオアッセイ(図7)によってETA-AB活性を測定するためだけでなく、ELISA(図8)によっても測定するための機会を得るために、血清にウサギETA-AB(50 nM)を添加した。添加を行った血清を前記カラム及び対照カラムに適用した。通過画分を採取し、保存した。結合したETA-ABを、3M KSCN溶液を用いて溶出させた。溶出液中のAAB活性を測定する前に、サンプルを4で3日間、生理学的バッファーに対して透析した。

【0093】

バイオアッセイでは、2つの画分中に採取された溶出液を測定した(図7)。トロンピンアプタマーカラムは溶出後にETA-AB活性を示したが、対照カラムは示さなかった。主要なETA-AB画分は第2の溶出液画分に存在し、これは使用する用量によった。カラムの容量は500 μlであったが、全ての取り扱い工程に250 μlを選択した。

40

【0094】

カラムの通過画分又は溶出液中のETA-ABをELISAにおいて検出するために、ELISAのETA-AB標準曲線にも、溶出液サンプル材料と同等の透析手順を施さなければならなかった(図8A)。この標準的材料を用い、サンプルにETA-ABが存在するかどうかを調べた(図8B)。

【0095】

特異的トロンピンアプタマーカラムだけが、添加を行った対照血清からのETA-ABと結合することができ、スクランブル対照アプタマーはETA-ABと結合しなかったこ

50

とが示される。ここでは、ETA-A Bは通過画分に見られたが、特異的カラムでは、溶出液画分がETA-A Bを含んでいた。

【0096】

対照血清由来の結合したヒトIgGは二次抗体との交差反応を介してETA-A Bの存在を模倣する可能性があるということを排除するために、血清(40%及び100%)をまたELISAプレートに適用した。交差反応の最大潜在量を測定したところ、特異的抗ウサギA B検出よりも小さかった。更に、独立した試験では、これらの溶出液は通過画分サンプルの1/10より少ないヒトIgGを含んでいたことが示され(データは示されていない)、二次抗体の交差反応性の大きな影響は排除された。

【0097】

2. ヒトA A B含有血清

第2の一連の試験では、トロンビンアプタマーカラムを血清A A Bの除去に用いた。対照として、スクランブルトロンビンアプタマーカラムを用いた。

【0098】

この目的で、250µlのETA-A A B及びα1受容体A A B含有血清をカラムに適用した。通過画分及び溶出液を捕捉させ、バイオアッセイを用いてA A B活性を評価した(表2)。溶出は3M KSCNで行った。サンプルを生理学的バッファーに対して3日間透析した後、A A B活性の測定を行った。

【0099】

【表2】

カラム試験の一面分中のヒト血清に由来するETA-AAB及びα1受容体AAB活性の測定

ビーズ数の減少/増加 [ビーズ/15秒]		トロンビンアプタ マーカラム	対照カラム(スクラ ンブルトロンビン アプタマー)
通過画分	α1受容体AAB	- 0.17	6.17
	エンドセリン受容 体AAB	- 0.17	- 4.17
第1溶出液	α1受容体AAB	2.0	0.17
	エンドセリン受容 体AAB	-1.83	0.17
第2溶出液	α1受容体AAB	4.67	-0.17
	エンドセリン受容 体AAB	- 2.5	-0.17
第3溶出液	α1受容体AAB	1.0	n.d.
	エンドセリン受容 体AAB	-0.5	n.d.

n.d.=測定されず

【0100】

アプタマー - 磁性ビーズにより血清をA A Bから精製するための、考えられるキット

トロンビンアプタマー - 磁性ビーズにより血清をA A Bから精製するため、又はA A Bを濃縮するためのキット。

【0101】

10

20

30

40

【表3】

固定化トロンビンアプタマー(配列番号1;ストレプトアビジン磁性ビーズ及びビオチン化トロンビンアプタマー)に対する血清AAB(ヒト及びラット)の結合

Δビーズ/15秒	トロンビンアプタマー(配列番号1)ヒトβ1-AAB	スクランブルトロンビンヒトβ1-AAB	トロンビンアプタマー(配列番号1)SHR-ラット
粒子上清	0	5.5	0
1. 洗浄溶液	0	n.d.	0
第1溶出液	5.67(β1受容体AAB)	1.0(第1+第2溶出液を合わせたもの)	4.67(β1受容体AAB) -1.83(M2受容体AAB)
第2溶出液	2.5(β1受容体AAB)		2.5(β1受容体AAB) -2.83(M2受容体AAB)

10

20

【0102】

エキソヌクレアーゼ保護の導入

以下では、アプタマー配列番号1の機能活性に及ぼす3'-dTキャップの導入の影響を調べた。3'-dTキャップは、ヌクレオチド配列をエキソヌクレアーゼ活性から保護し、生物学的流体中でのその安定性を高めると考えられる。アプタマー機能に及ぼす3'-dTキャップの影響を調べるにあたって、DCM患者由来のβ1受容体AAB(2-ループ)及びアルツハイマー患者由来のβ2受容体AABを使用した(表4)。両AABの機能活性は、100nMの3'-dTキャップ修飾アプタマーとともにインキュベートした際に中和された。3'-dTキャップ修飾は、アプタマー配列番号1の機能活性に影響を及ぼさなかった。

30

【0103】

キャップ保護されたアプタマーはそれだけでは、新生児心筋細胞の基本拍動数に影響を及ぼさなかった。

【0104】

【表4】

3'-dTキャップ修飾トロンビンアプタマー配列番号1で処理した、又は処理しなかったAAB(アプタマー無し)の血清AAB変時活性[Δビーズ/15秒]のバイオアッセイ測定

疾患	AAB型	アプタマー無し	+アプタマー-3'-dTキャップ
DCM	β1受容体AAB	6.0	0.0
アルツハイマー	β2受容体AAB	5.17	0.0

40

【0105】

AABの検出のためのFITC標識トロンビンアプタマー

血清AABの検出のための直接蛍光マーカー標識トロンビンアプタマーの使用

これらの試験の目的は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体を標的とする直接標識アプタマーの生成であり、最終的にこのようなAABの検出に活用される。

【0106】

50

この目的で、トロンピンアプタマーの5'末端をFITCで標識した。

【0107】

第1の試験では、FITC標識トロンピンアプタマーが、その非標識型に比べて、自己抗体を中和する完全な機能/活性を示すかどうかを調べた。これを、バイオアッセイを用いて調べた。

【0108】

図9は、100nMの5'-FITC-トロンピンアプタマーの、1受容体AABを中和する能力を示す。FITC標識トロンピンアプタマーの活性を低下させたが、この100nMという選択濃度では、1受容体AAB活性の50%がなお中和された。このアプタマー濃度では、AAB活性の部分的阻害が見られた。

10

【0109】

FITC標識トロンピンアプタマーは、同濃度の非標識アプタマーと比べた場合に、AAB活性の部分的阻害を示したことから、この標識トロンピンアプタマーをサンドイッチアッセイに使用することが可能な戦略であるかどうかを調べるために、この分子を採取した。このため、非標識ビオチン化トロンピンアプタマーを、ニュートラアビジンを介してELISAプレートに固定化してAABを捕捉するために用い、一方、FITC標識抗トロンピンアプタマーの方は、吸着されたAAB材料の検出の目的で用いることを想定した。

【0110】

サンプルを複数のウェルから取り出し、2つを1つにし(最終容量200 μ l)、300 μ lのPBSで希釈し、分光蛍光光度計RF-5001PC(島津、日本)を用い、励起波長及び蛍光波長をそれぞれ494nm及び519nmとして、相対的蛍光を測定した。

20

【0111】

図10から分かるように、対照IgGサンプルと比較して、患者サンプル(ETA-AABを含有するIgG画分)を検出することができた。スクランブルトロンピンアプタマーをさらなる対照として用いた場合にも、蛍光を示さなかった。

【0112】

トロンピンアプタマーの機能に対するdTキャップの影響

次の試験において、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体を中和するトロンピンアプタマー活性に影響を及ぼすことなくエキソヌクラーゼ(exonuclease)活性から保護するためにdTキャップなどの保護基を導入することが可能であるかどうかを調べた。dTキャップの導入は、Gタンパク質共役受容体に対するAABを中和するトロンピンアプタマー機能に影響を及ぼすことなく可能であった(図11)。

30

【0113】

12マー配列を生じるトロンピンアプタマーの末端切断

次の試験セットにおいて、トロンピンアプタマーを末端切断してもGタンパク質共役受容体に対する自己抗体をなお中和することができる産物を生じるかどうかを調べた。

【0114】

これにより、トロンピンアプタマー(ARC183)の原型15マー配列は末端切断を受けて配列番号3を有する12マーの配列となり、これをThrom-K1と呼称した。この末端切断型配列を、バイオアッセイでそのAAB中和能に関して試験した(1受容体AABに関して示した、図12)。

40

【0115】

この12マー配列は完全な活性を示した。

【 図 1 】

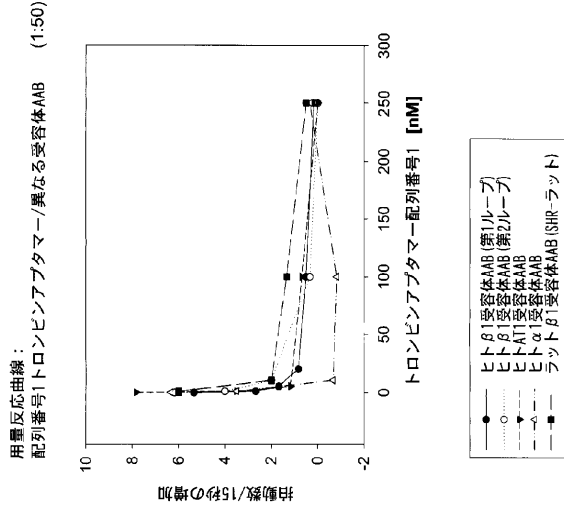


Figure 1

【 図 2 】

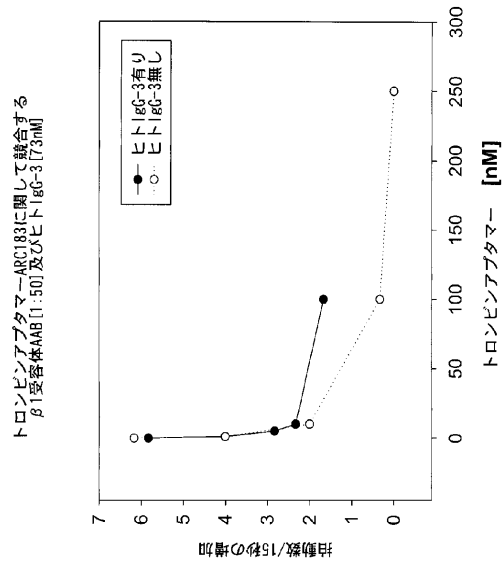


Figure 2

【 図 4 A 】

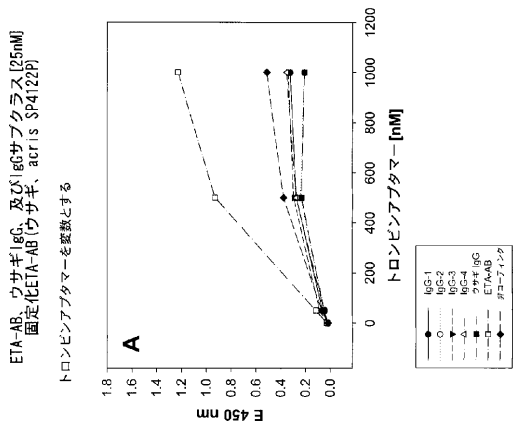


Figure 4 A

【 図 4 B 】

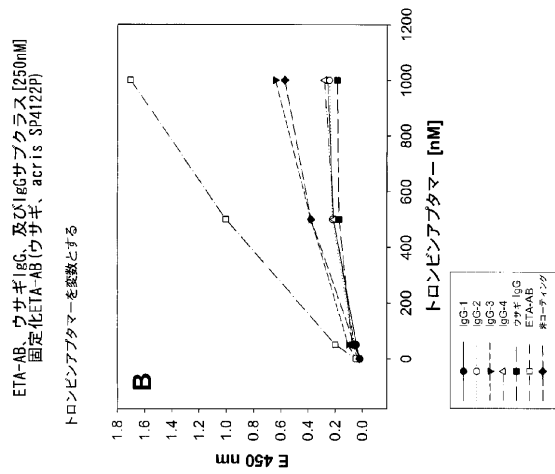


Figure 4 B

【 図 4 C 】

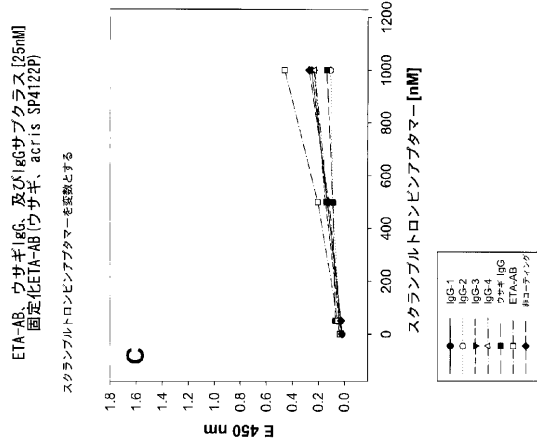


Figure 4 C

【 図 4 D 】

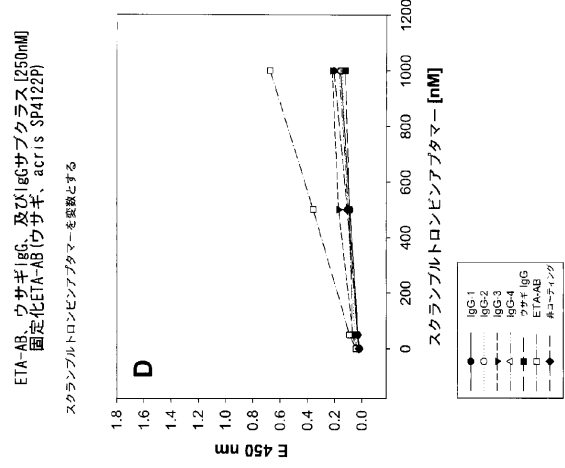


Figure 4 D

【 図 5 A 】

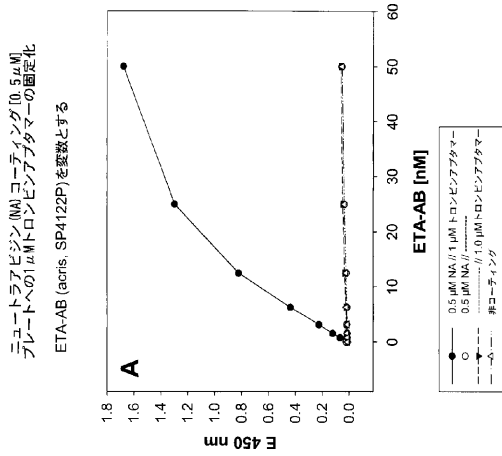


Figure 5 A

【 図 5 B 】

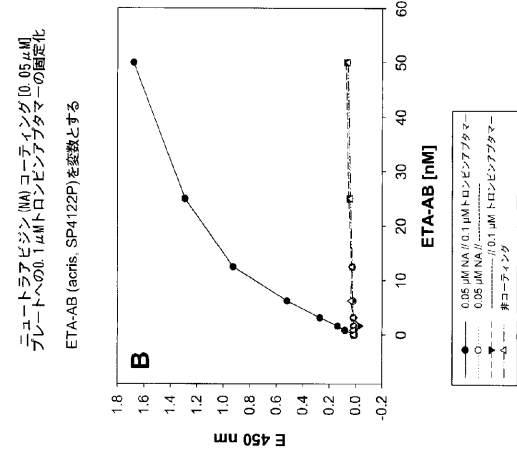


Figure 5 B

【 図 6 】

(0.05 μM ニュートロンペンタマー/コラーゲン/プレートへの)
0.1 μM トロンビン/アブタマー (配列番号) の固定化
0.1 μM スクラムブル (scrambled) トロンビン/アブタマーの固定化
ETA-AB を変数とする

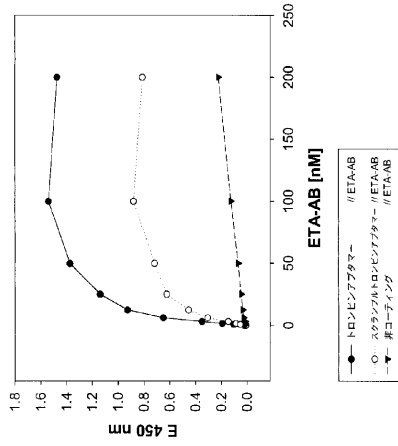


Figure 6

【 図 8 A 】

3日/4℃で生理学的バツファーンに対して透析した
3M KSCN中のETA-ABの標準曲線

プレート: 0.05 μM ニュートロンペンタマー/コラーゲン
プレートへの0.1 μM トロンビン/アブタマーの固定化

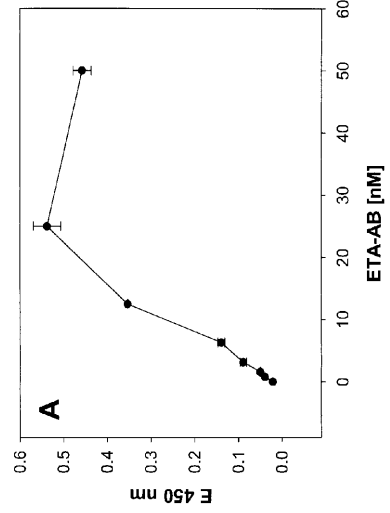


Figure 8 A

【 図 10 】

トロンビン/アブタマー//サンプリル/FITC-トロンビン/アブタマー
サンプリル患者 IgG (ETA-AAB)
対照: 対照 IgG

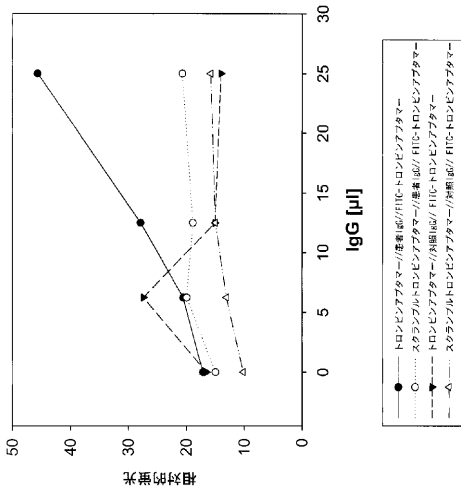


Figure 10

【 図 3 】

ETA-AB (ETA-AB:ウサギ、acris、SP4122P)
3. 3nMの負の変時作用

100nMのトロンピンアプタマーによる変時作用の中和

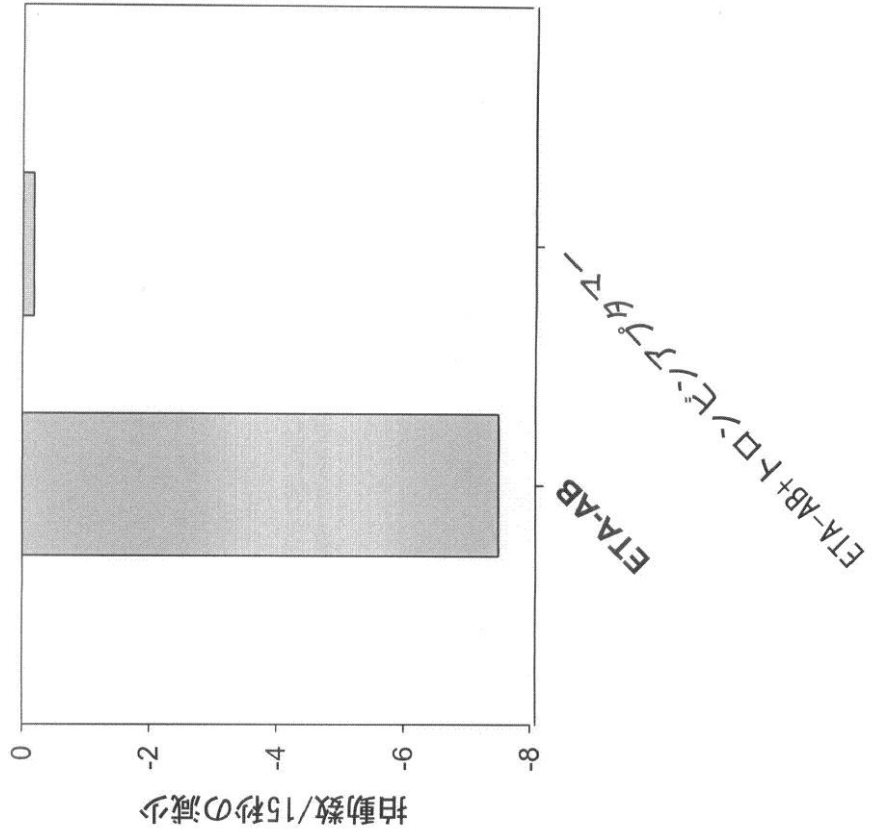


Figure 3

【 図 7 】

カラム溶出液中のETA-AB機能の測定

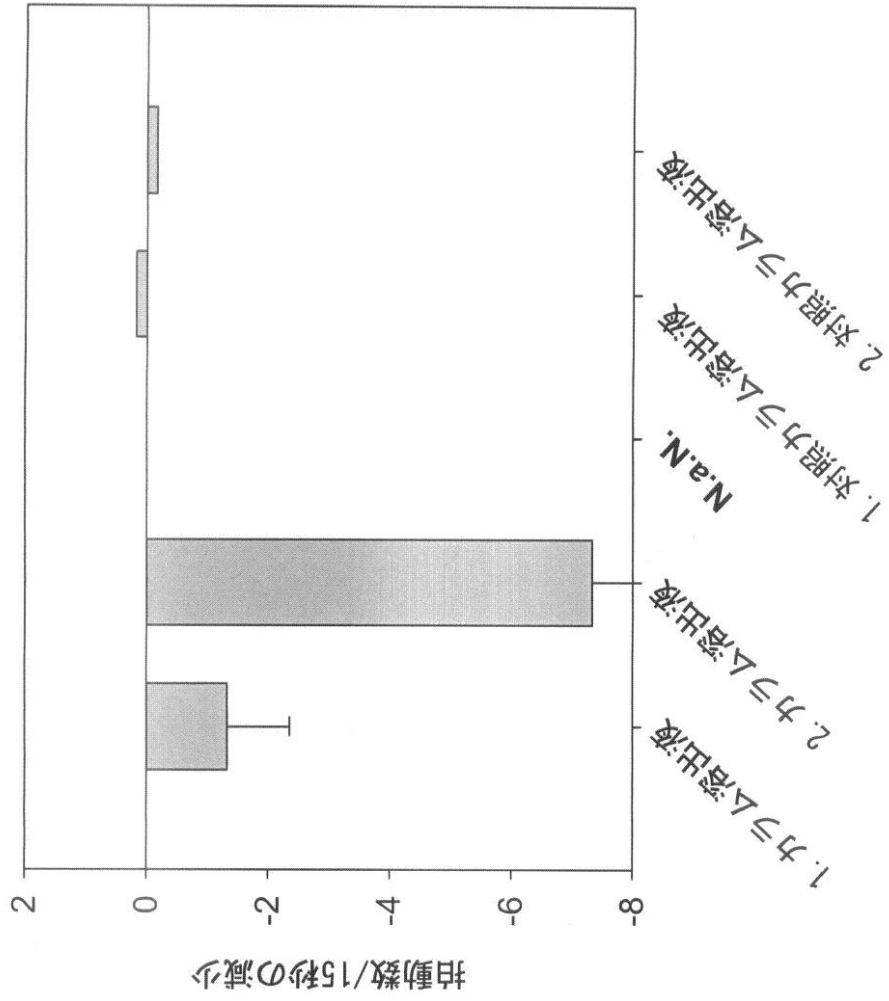


Figure 7

【 図 8 B 】

トロンビンアプタマー (ARC183) カラム試験
ETA-AB添加 (spiked) 血清

通過画分、洗浄溶液及び溶出液からのETA-ABの回収

プレート:0.05 μ Mニユートアラビジンへの
0.1 μ Mトロンビンアプタマーの固定化

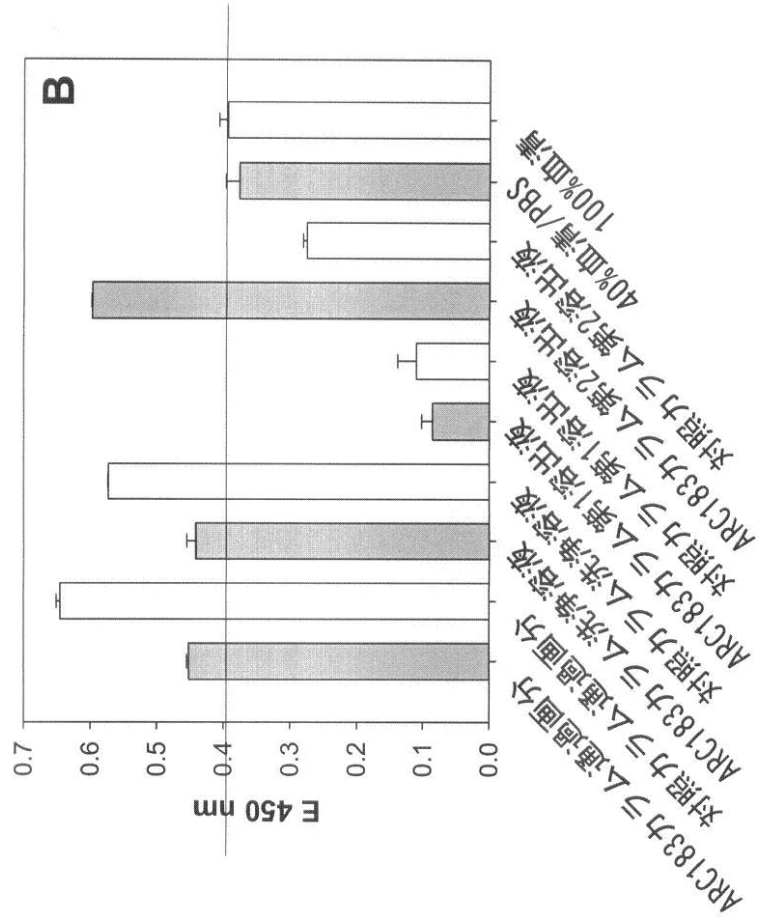


Figure 8 B

【図9】

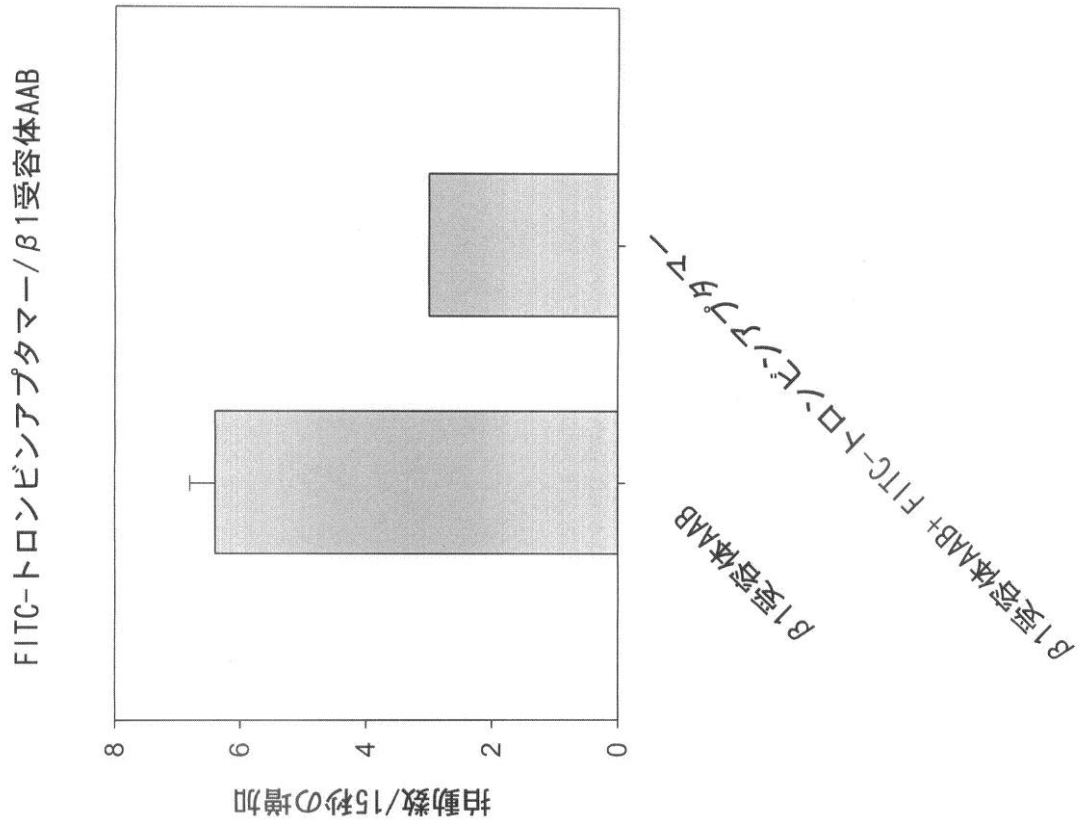


Figure 9

【図 11】

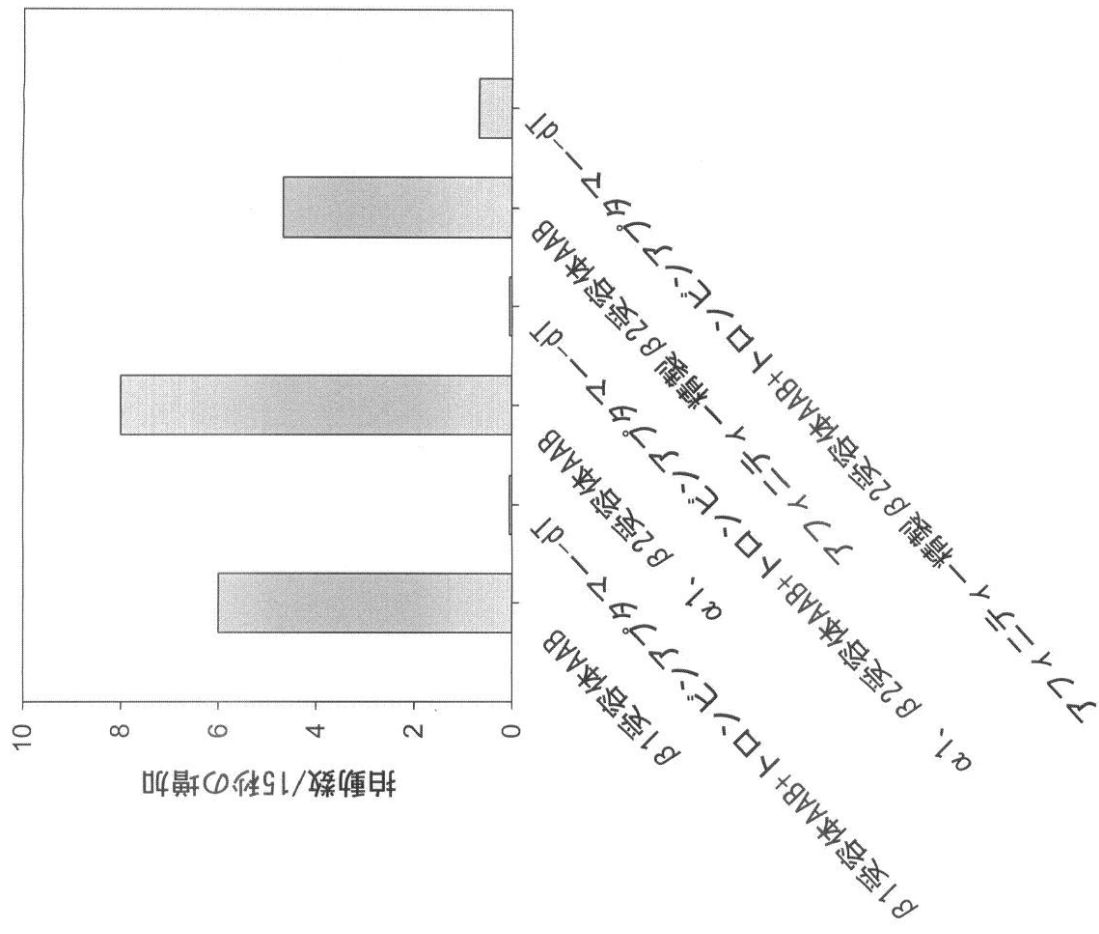


Figure 11

【 図 1 2 】

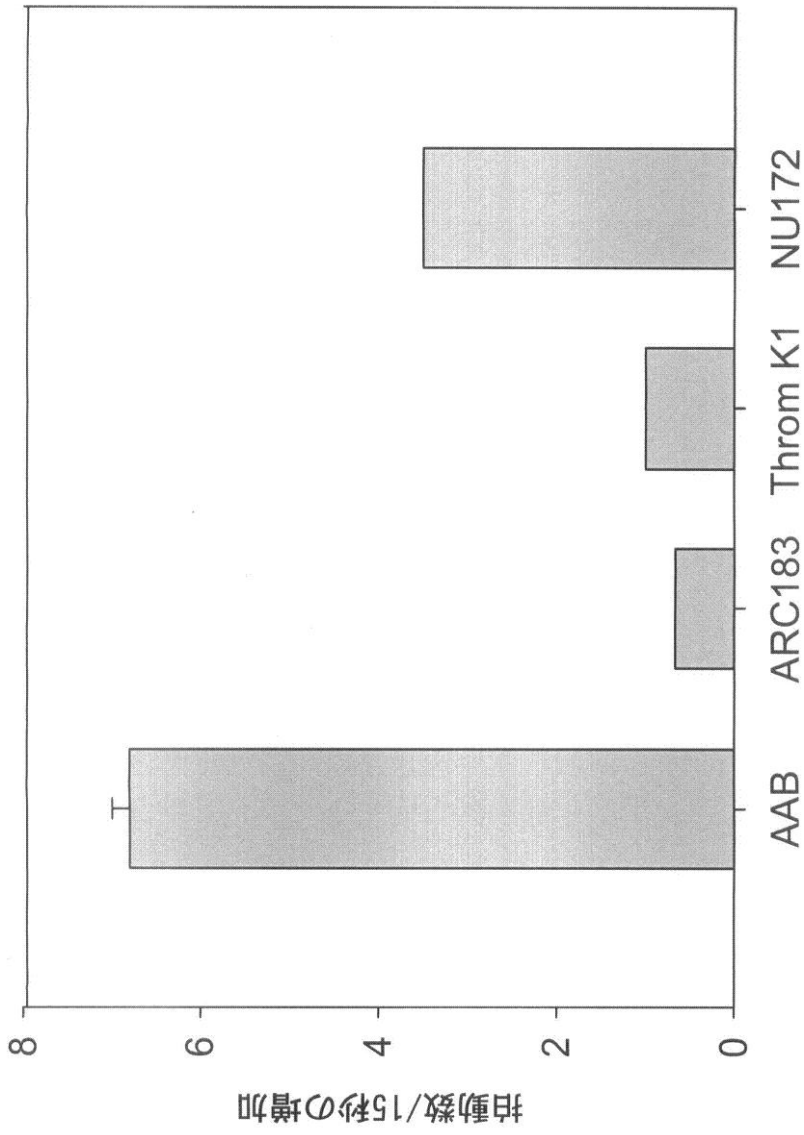


Figure 12

【 配列表 】

2014509849000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/053616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/115 A61K31/7088 A61M1/36 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61M		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/025049 A2 (ARCHEMIX CORP [US]; DIENER JOHN L [US]; WAGNER-WHYTE JESS [US]; FONTAN) 1 March 2007 (2007-03-01) page 41; table 13; sequences 294, 436 -----	1-7
X	WO 2005/037323 A2 (UNIV LOUISVILLE RES FOUND [US]; BATES PAULA J [US]; GIRVAN ALLICIA C []) 28 April 2005 (2005-04-28) claims 1,2,7,9; sequences 23, 26 -----	1-7
Y	WO 92/14843 A1 (GILEAD SCIENCES INC [US]) 3 September 1992 (1992-09-03) page 65; table 7 -----	1-7
Y	WO 02/26932 A2 (UNIV DUKE [US]) 4 April 2002 (2002-04-04) page 22 -----	1-7
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 June 2012		09/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/053616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>QIANG ZHAO ET AL: "Aptamer-Based Affinity Chromatography Assays for Thrombin", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 80, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 7586-7593, XP002557962, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC801206S [retrieved on 2008-08-30] the whole document</p> <p>-----</p>	1-7
A	<p>HWANG B ET AL: "Prevention of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis by an in vitro selected RNA aptamer", FEBS LETTERS, vol. 548, no. 1-3, 31 July 2003 (2003-07-31), pages 85-89, XP004441066, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00745-2 the whole document</p> <p>-----</p>	1-7
A	<p>GRAMMAS PAULA ET AL: "Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: Implications for disease pathogenesis", JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 9, no. 1, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 51-58, XP008139368, ISSN: 1387-2877 page 54, right-hand column - page 56, right-hand column</p> <p>-----</p>	1-7
A	<p>YIN XIANGLING ET AL: "Brain Endothelial Cells Synthesize Neurotoxic Thrombin in Alzheimer's Disease", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 176, no. 4, April 2010 (2010-04), pages 1600-1606, XP002649853, ISSN: 0002-9440 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/053616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>AHMAD SARFRAZ ET AL: "Serine Proteases-Mediated Serotonin Release and Its Inhibition by Argatroban and Other Direct Thrombin Inhibitors: Implications in the Control of Thrombogenesis.", Journal of Thrombosis and Haemostasis , vol. 1, no. Suppl. 1 12 July 2003 (2003-07-12), 18 July 2003 (2003-07-18), XP002648629, 44TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; PHILADELPHIA, PA, USA Retrieved from the Internet: URL:http://www.blackwellpublishing.com/ist h2003/abstract.asp?id=10247 [retrieved on 2011-07-15] the whole document</p>	1-7
A	<p>GALINA S. BOGATKEVICH ET AL: "Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts", ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 60, no. 11, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 3455-3464, XP055002346, ISSN: 0004-3591, DOI: 10.1002/art.24935 the whole document</p>	1-10
A	<p>US 5 543 293 A (GOLD LARRY [US] ET AL) 6 August 1996 (1996-08-06) cited in the application sequence 1</p>	1-7
A	<p>CARR M E: "DIABETES MELLITUS A HYPERCOAGULABLE STATE", JOURNAL OF DIABETES AND ITS COMPLICATIONS, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 44-54, XP001121390, ISSN: 1056-8727, DOI: DOI:10.1016/S1056-8727(00)00132-X the whole document</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/053616**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-7

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 053616

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7

Aptamer comprising a nucleic acid sequence of SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID NO: 3 and/or a nucleic acid sequence being at least 80% identical to one of SEQ ID No. 1, 2 and 3 for use in therapy and/or diagnosis of autoimmune diseases or for use as selective ingredient during apheresis, preferably during therapeutic apheresis of blood or constituents thereof of a patient suffering from an autoimmune disease, wherein the autoimmune disease is cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy (DCM), peripartum cardiomyopathy (PPCM), idiopathic cardiomyopathy, Chagas' cardiomyopathy, Chagas' megacolon, Chagas' megaesophagus, Chagas' neuropathy, benign prostatic hyperplasia, scleroderma, psoriasis, Raynaud syndrome, pre-eclampsia, kidney allograft rejection, myocarditis, glaucoma, hypertension, pulmonary hypertension, malignant hypertension, and/or Alzheimer's disease.

2. claims: 8-11

Use of an aptamer of one of claims 1 to 5 for the in vitro detection of an antibody being specific for a G-protein coupled receptor, preferably the human G-protein coupled receptor adrenergic alpha-1 receptor, adrenergic beta-1 receptor, adrenergic beta-2 receptor, endothelin 1 ETA receptor, muscarinic M2 receptor, angiotensin II AT1 receptor, and/or PAR receptors.

3. claims: 12, 13

Apheresis column comprising an aptamer comprising a nucleic acid sequence of SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID NO: 3 and/or a nucleic acid sequence being at least 80% identical to one of SEQ ID No. 1, 2 and 3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/053616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007025049 A2	01-03-2007	AU 2006283025 A1	01-03-2007
		CA 2617782 A1	01-03-2007
		EA 200800667 A1	29-08-2008
		EP 1928505 A2	11-06-2008
		JP 2009508473 A	05-03-2009
		KR 20080042091 A	14-05-2008
		ME P0208 A	10-02-2010
		RS 20080075 A	15-07-2009
		US 2009221680 A1	03-09-2009
		US 2012149764 A1	14-06-2012
		WO 2007025049 A2	01-03-2007
WO 2005037323 A2	28-04-2005	US 2005187176 A1	25-08-2005
		WO 2005037323 A2	28-04-2005
WO 9214843 A1	03-09-1992	AU 1435492 A	15-09-1992
		CA 2104698 A1	22-08-1992
		EP 0572529 A1	08-12-1993
		IE 920562 A1	26-08-1992
		JP H06508022 A	14-09-1994
		WO 9214843 A1	03-09-1992
WO 0226932 A2	04-04-2002	AU 9630501 A	08-04-2002
		AU 2011202290 A1	09-06-2011
		CA 2425208 A1	04-04-2002
		EP 1330544 A2	30-07-2003
		EP 2322648 A1	18-05-2011
		EP 2325337 A1	25-05-2011
		EP 2351855 A1	03-08-2011
		US 2003175703 A1	18-09-2003
		US 2008182809 A1	31-07-2008
		US 2008200413 A1	21-08-2008
		US 2008207546 A1	28-08-2008
		US 2008221053 A1	11-09-2008
		US 2009163429 A1	25-06-2009
		US 2011160443 A1	30-06-2011
		US 2012178917 A1	12-07-2012
		WO 0226932 A2	04-04-2002
		US 5543293 A	06-08-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 27/06	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
		A 6 1 P 27/06	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男

(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013
弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(72)発明者 シムケ インゴルフ
ドイツ連邦共和国 1 2 6 2 1 ベルリン ベルゲドルファー シュトラッセ 8 0

(72)発明者 ハベルランド アンネカトリン
ドイツ連邦共和国 1 0 4 3 9 ベルリン ドゥンカーシュトラッセ 3 4

(72)発明者 ワルカット ゲルト
ドイツ連邦共和国 1 3 1 2 9 ベルリン ヴォルケンシュタインシュトラッセ 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA17
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QR83 QS33 QX01
4C084 AA13 NA14 ZA01 ZA16 ZA33 ZA36 ZA66 ZA81 ZA89 ZA94
ZB05 ZB08 ZC41 ZC42
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA16 ZA33 ZA36
ZA66 ZA81 ZA89 ZA94 ZB05 ZB08 ZC41 ZC42

专利名称(译)	适体在治疗和/或诊断自身免疫疾病中的用途		
公开(公告)号	JP2014509849A	公开(公告)日	2014-04-24
申请号	JP2013557052	申请日	2012-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	柏林夏里特综合医药大学 德尔布吕克中枢毛皮泄漏克拉补救寻		
申请(专利权)人(译)	慈善 - 海胆韦利济哲媒体双胞胎柏林 马克斯 - 德尔布吕克 - 中枢毛皮Morekurare Meditsuin		
[标]发明人	シムケインゴルフ ハベルランドアンネカトリン ワルカットゲルト		
发明人	シムケ インゴルフ ハベルランド アンネカトリン ワルカット ゲルト		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 C12Q1/68 A61K31/711 A61K48/00 A61P37/06 A61P9/00 A61P1/04 A61P25/00 A61P13/08 A61P17/06 A61P17/00 A61P9/12 A61P25/28 A61P27/06		
CPC分类号	A61M1/3679 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/28 A61P27/06 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/317 C12N2310/3517 C12N2320/10 C12N2320/30 G01N33/564 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12Q1/68.A A61K31/711 A61K48/00 A61P37/06 A61P9/00 A61P1/04 A61P25/00 A61P13/08 A61P17/06 A61P17/00 A61P9/12 A61P25/28 A61P27/06		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR83 4B063/QS33 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA16 4C084/ZA33 4C084/ZA36 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084/ZB05 4C084/ZB08 4C084/ZC41 4C084/ZC42 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA66 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZC41 4C086/ZC42		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	2011157229 2011-03-07 EP 61/449772 2011-03-07 US		
其他公开文献	JP6190276B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含SEQ ID No.1, SEQ ID No.2的核酸序列或由其组成的适体和/或与SEQ ID No.1和SEQ ID No.1之一至少80%相同的核酸序列。2用于治疗 and/或诊断自身免疫疾病。

ALCの構造系主筋の配筋率を算出する様式による算定した配筋率(%)

種別	形状	ループ	ファイバー タイプ	ファイバー 種類	77777777 一般	77777777 一般	77777777 一般	77777777 一般	77777777 一般	77777777 一般
000		① 変形体積 1 ループ			標準	6.33	-0.17			
					標準	5.33	0.5			
		② 変形体積 2 ループ			標準	5.33	0.17	5.33		
					標準					
縦筋		① 変形体積 2 ループ 有り			標準	7.33	0.33			5.33
					標準	8.67	-0.17			
					標準	6.0	0.67			
					標準	7.67	-0.17			
縦筋 引込		① 変形体積 2 ループ 有り			標準	6.33	0.5			4.0
					標準	4.5	-0.17			
		② 変形体積 2 ループ			標準	5.17	0.33			2.0
					標準					
		③ エンドピン 変形体積			標準	-4.83	-0.17			2.0
					標準	-4.8	0.33			3.33
高引込		④ 変形体積 2 ループ			標準	5.5	1.0			2.0
					標準	6.33	-0.83			
高引込 引込		① 変形体積 2 ループ			標準	7.00	0.67			2.0
					標準	6.17	-0.5			
高引込 引込		② 変形体積 2 ループ			標準	3.5	0.5			3.0
					標準	-3.67	0.5			3.0
高引込 引込		③ エンドピン 変形体積			標準	6.17	0.17			
					標準					