

(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2017-529872

(P2017-529872A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)

(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	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-526761 (P2017-526761)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月4日 (2015.8.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年4月4日 (2017.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/067951
 (87) 国際公開番号 W02016/020377
 (87) 国際公開日 平成28年2月11日 (2016.2.11)
 (31) 優先権主張番号 14179715.9
 (32) 優先日 平成26年8月4日 (2014.8.4)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 517038970
 ベルリン キュアーズ ホールディング
 アクチェンゲゼルシャフト
 スイス チューリッヒ ツェーハー ー 8 0
 0 1 バスタイプラッツ 5
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100088694
 弁理士 弟子丸 健
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己抗体関連疾患に対する使用のためのアプタマー

(57) 【要約】

本発明は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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新しいアプタマー分子、このようなアプタマー分子を含む医薬組成物、このようなアプタマー分子を含むアフエーシスカラム、ならびにアプタマー分子の配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するための方法に関する。

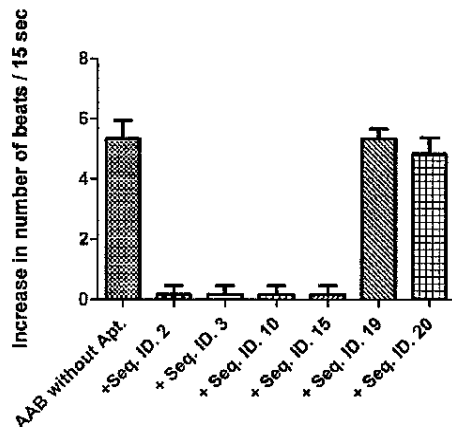


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G タンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療における使用のためのアダプターであって、

a .) Q は、自然数のセットであり、

b .) F は、

$$F := \{ X \in Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c .) F を使用して、

【数 1】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

と定義され、

d .) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c) の通りであり、

e .) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

と定義される 1 セットの終端であり、

ここで G^X は、 b .) 及び c .) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f .) S U は、開始記号である

という条件での、生成規則 P のセット :

$$P = \{$$

$$S \quad M \mid Y \mid D \mid E \mid H \quad (1)$$

$$M \quad N R M \quad (2)$$

$$M \quad M R \quad (3)$$

$$M \quad R M \quad (4)$$

$$N \quad M \quad (5)$$

$$D \quad Y M \quad (6)$$

$$E \quad V M \quad (6 a)$$

$$Y \quad K \mid K L \mid L K \mid L K L \quad (7)$$

$$H \quad L V \mid V \quad (8)$$

$$R \quad L \quad (9)$$

$$Z \quad A \mid C \mid G \mid T \quad (10)$$

$$L \quad Z L \mid Z \quad (11)$$

$$B X \quad G^X \quad (12)$$

10

20

30

40

50

C X	B X L B X	(1 3)
M	C X L C X	(1 4)
K	C X L B X	(1 5)
V	C X L	(1 6)
}		

によって定義される文法を満たすヌクレオチド配列を含み、

式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、

前記アプタマーが、ヌクレオチド配列GGTTGGTGTGGTTGG(配列番号22)、GGTTGGTGTGGT(配列番号23)又はCGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG(配列番号24)を含まない、アプタマー。

【請求項2】

Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体とその標的タンパク質との相互作用を阻害するために使用される、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項3】

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体が検出できる患者の治療における使用のための、請求項1に記載のアプタマー。

【請求項4】

前記ヌクレオチド配列が、最大で593ヌクレオチドの長さを有する、請求項1～3のいずれか1項に記載のアプタマー。

【請求項5】

前記ヌクレオチド配列が、DNA配列であるか、又はヌクレオチド配列がRNA配列である、請求項1～4のいずれか1項に記載のアプタマー。

【請求項6】

前記アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列が、以下の配列、

(5'-GTTGTTTGGGGTGG-3'配列番号1)、

(5'-GTTGTTTGGGGTGGT-3'配列番号2)

(5'-GGTTGGGGTGGGTGGGGTGGGTGGG-3'配列番号3)

(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号4)、

(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号5)、

(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号6)、

(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号7)、

(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号8)、

(5'-TGGTGGTGGTGGTGGT-3'配列番号9)、

(5'-GGTGGTGGTGG-3'配列番号10)、

(5'-GGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号11)、

(5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号12)、

(5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号13)、

(5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号14)、

10

20

30

40

50

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T T T - 3 ' 配列番号 1 5)、
 (5 ' - G G T G G T G G T G T T G T G G T G G T G G T G G T T T - 3 ' 配列番号 1 6)、
 (5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 1 7)、
 (5 ' - T G G T G G T G G T - 3 ' 配列番号 1 8)、
 (5 ' - T T A G G G T T A G G G T T A G G G T T A G G G (配列番号 2 0)
 のうちのいずれか 1 つである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 7】

前記アプタマーのヌクレオチド配列が、少なくとも 4 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 8 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 1 2 ヌクレオチドの長さを有し、かつ/又はアプタマーのヌクレオチド配列が、最大で 1 2 0 ヌクレオチド、好ましくは最大で 1 0 0 ヌクレオチド、より好ましくは最大で 8 0 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 8】

自己抗体、好ましくは、G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体、好ましくは、ヒト G タンパク質共役受容体アドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び/又は M 3 受容体のうちのいずれか 1 つに特異的な自己抗体と相互作用することができる、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 9】

G タンパク質共役受容体に対する自己抗体の出現に関連する自己免疫疾患に罹っている患者の血液又はその要素の治療的アフェレーシス中の選択的成分としての使用のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 1 0】

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、虚血性心筋症 (i C M)、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、妊娠高血圧腎症、末梢動脈閉塞性疾患 (P A O D)、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス (S L E)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックのうちの 1 つである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 1 1】

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アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び/又は M 3 受容体に特異的な抗体の *i n v i t r o* 検出のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの使用。

【請求項 1 2】

検出される抗体が、自己抗体である、請求項 1 1 に記載のアプタマーの使用。

【請求項 1 3】

前記抗体が、体液、好ましくは、ヒトの体液、より好ましくは、ヒトの血液、血漿、血清、尿、大便、関節液、間質液、リンパ液、唾液、髄液及び/又は涙液の中に存在する又はそれに由来する、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のアプタマーの使用。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記体液が、自己免疫疾患、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患、より好ましくは、アドレナリン作動性アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM受容体、アンジオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM3受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患に罹っているか又は罹っている疑いがある個体から採取される、請求項13に記載のアプタマーの使用。

【請求項 15】

以下のヌクレオチド配列(5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' 配列番号12)を含む、請求項1~10のいずれか1項に記載のアプタマー。

10

【請求項 16】

前記アプタマーが、以下のヌクレオチド配列(5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' 配列番号12)を含む、請求項11~15のいずれか1項に記載のアプタマーの使用。

【請求項 17】

請求項1~10のいずれか1項で規定される少なくとも1種のアプタマーを含み、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい、医薬組成物。

20

【請求項 18】

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療における使用のための、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

アプタマーを含む医薬組成物が、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体とその標的タンパク質との相互作用を阻害するために使用される、請求項18に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 20】

請求項1~19のいずれか1項に記載のアプタマーを含むアフエレーシスカラム。

【請求項 21】

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請求項20に記載のアフエレーシスカラムであって、前記自己免疫疾患が、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、虚血性心筋症(iCM)、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患(PAOD)、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス(SLE)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックである、アフエレーシスカラム。

30

40

【請求項 22】

前記アプタマーが、該アプタマーによって特異的に標的化される自己抗体を特異的に分離して取り出すための選択的成分として使用される、請求項20に記載の使用のためのアフエレーシスカラム。

【請求項 23】

自己免疫疾患に罹患した患者が、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体が検出され得る患者である、請求項18に記載の使用のための医薬組成物又は請求項20に記載の使用のためのアフエレーシスカラム。

【請求項 24】

50

アプタマーオリゴヌクレオチドを調製するための方法であって、

I) アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップであって、

a.) Q は、自然数のセットであり、

b.) F は、

$$F := \{ X \quad Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c.) F を使用して、

【数 2】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

10

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

20

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

と定義され、

d.) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c.) の通りであり、

e.) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

30

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで G^X は、b.) 及び c.) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f.) S U は、開始記号である

という条件での、以下の生成規則 P のセット :

P = {

$$S \quad M \mid Y \mid D \mid E \mid H \quad (1)$$

$$M \quad N R M \quad (2)$$

$$M \quad M R \quad (3)$$

$$M \quad R M \quad (4)$$

$$N \quad M \quad (5)$$

40

$$D \quad Y M \quad (6)$$

$$E \quad V M \quad (6 a)$$

$$Y \quad K \mid K L \mid L K \mid L K L \quad (7)$$

$$H \quad L V \mid V \quad (8)$$

$$R \quad L \quad (9)$$

$$Z \quad A \mid C \mid G \mid T \quad (10)$$

$$L \quad Z L \mid Z \quad (11)$$

$$B X \quad G^X \quad (12)$$

$$C X \quad B X L B X \quad (13)$$

$$M \quad C X L C X \quad (14)$$

50

K	C X L B X	(1 5)
V	C X L	(1 6)
}		

の適用を含み、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味する、ステップと、

II) ステップI) で得られたヌクレオチド配列を有するアプタマーオリゴヌクレオチドを作製するステップと

を含む、方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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新しいアプタマー分子、このようなアプタマー分子を含む医薬組成物、このようなアプタマー分子を含むアフエーシスカラム、ならびにアプタマー分子の配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫系は、あらゆる動物の不可欠な部分を形成している。哺乳動物は、微生物に対する防御において、例えば腫瘍細胞のような異常細胞の検出及び除去において、ならびに組織の再生においてその免疫系を使用している。それによって生物体は、2つの相互に連結した防御機構である体液性免疫及び細胞性免疫に依存している。

抗体は、その抗原に結合したときに、体液性免疫応答を誘発する。抗体は、複数の方法で作用しうる。抗原の中和とは別に、抗体は補体系も活性化する。自身の身体の抗原に向けられる抗体もある。これらのいわゆる自己抗体が産生される理由として、分子擬態及び/又はパイスタンダー活性化が知られている。自身の抗原に自己抗体が特異的に結合することにより、これらの抗原の分解を促進できるナチュラルキラー細胞(NK細胞)を活性化することができる。

自己免疫疾患は、自身の細胞又は組織に対する免疫応答を誘発する、自身の身体の構成部分に向けられる抗体のこのような特異的な認識及び結合に基づいている。この免疫賦活作用とは別に、自己抗体は他の機構によっても病原性表現型の発現に寄与しうる。

【0003】

アドレナリン作動性アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM2受容体、アンジオテンシンII A T 1受容体、プロテイナーゼ活性化型受容体(PAR)受容体、MAS受容体、5HT4受容体及び/又はM3受容体などのGタンパク質共役受容体の細胞外部分に特異的であり、かつ、特異的な結合により、これらの受容体を活性化又は遮断することができる自己抗体があることはよく知られている。

Gタンパク質共役受容体は、細胞外間隙から細胞内に情報を伝達するシグナル伝達分子である。それらは、1000種を超える種々の受容体を包含する受容体ファミリーに属し、5つのサブグループに細分される。それらは、多くの異なる種に存在する、細胞膜を越えての細胞内へのシグナル伝達の原理を示す。

典型的なGPCRの特性は、それらが、物質が結合して異なる細胞内反応を引き起こしうる異なるエピトープを有する3つの異なる細胞外ループを有することである。体液タンパク質アドレナリンは、アドレナリン作動性ベータ-1受容体に結合して心筋細胞の拍動の強さ及び頻度を高めることができる。

【0004】

機能的に病原性の、GPCRに対する自己抗体は、常にではないがサブタイプIgG3(糖タンパク質免疫グロブリンG、サブクラス3)のうちであることが多く、異なるGP

30

50

C R ループ及びループ内の異なる場所に結合する能力を有する。これらの機能的に病原性の抗体は、G P C R とのそれらの相互作用によって病理学的な細胞機能及び次いで組織機能を発揮する。

したがって、異なる受容体に対して向けられる多くの異なる自己抗体がある。心筋の場合には、例えば、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体又はムスカリン性アセチルコリン受容体に対して向けられる自己抗体がある。他の疾患において重要な役割を有する他の抗体は、アドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性アルファ - 2 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 2 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、プロテイナーゼ活性化型受容体 (P A R) 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体、M 3 受容体などに対して向けられる。

このような自己抗体が生物体に存在することにより、疾患の発症に關与するそれぞれの受容体の恒久的な活性化又は遮断という意味における作動的又は拮抗的な作用がもたらされうる。

【 0 0 0 5 】

拡張型心筋症 (D C M) は、高い割合の患者が、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体の細胞外部分に、特に、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体の第 1 又は第 2 のループに結合しているこのような活性化自己抗体を有する疾患のうちの 1 つである。結果として、これらの患者における D C M の自己免疫性病因が示唆された。これらの自己抗体の結合により、G P C R の活性化を制限する生理的なフィードバック機構が抑制されるので、受容体は持続的に活性化される。

【 0 0 0 6 】

G タンパク質共役受容体に対する自己抗体の存在に關連することが示唆された他の心血管系の疾患があり、例えば、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である。G タンパク質共役受容体に対する自己抗体は、例えば、緑内障、糖尿病、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、及び妊娠高血圧腎症などを有する患者において、及び慢性シャーガス病において、ならびに腎同種異系移植片拒絶反応を有する患者においても見出された。

通常、これらの受容体のエピトープ領域は、約 2 0 アミノ酸を含むペプチド鎖からなるのに対して、疾患特異的なエピトープは、これらの領域のうちの 1 つの 3 ~ 5 アミノ酸の配列を構成する。しかし、自己抗体とこれらのエピトープとの望ましくない相互作用は、いくつかの自己免疫疾患の発症及び慢性化に重要な役割を果たす。

【 0 0 0 7 】

最近の研究では、免疫グロブリン吸着を介し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役立つことを示すことができている (Wallukat G, Reinke P, Dorffell WV, 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. Dorffell, 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. Dorffell, G. Wallukat, Y. Dorffell, S.B. Felix, G. Baumann (2004) Immunoadsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J. Cardiol.* 97,20 529-534) 。

【 0 0 0 8 】

特定の/aptamer は、ヒトのベータ - 1 アドレナリン作動性受容体の第 2 の細胞外ループに特異的な抗体、特に、自己抗体と、その標的との相互作用に干渉するために使用されることがさらに見出されている (国際公開第 2 0 1 2 / 0 0 0 8 8 9 号) 。 Aptamer は、その標的分子に対する高い親和性を特徴とする短鎖オリゴヌクレオチドである。相互作用を阻害することにより、Aptamer は、これらの抗体の除去を必要とすることなく、

10

20

30

40

50

ベータ - 1 アドレナリン作動性受容体の恒久的な活性化を低減するか又はさらに無効にすることもできた。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さらなるアプタマーは、国際公開第2012/119938号に開示されている。

好ましい一実施形態によれば、アプタマーは、それぞれの自己抗体によってGタンパク質共役受容体の活性化を低減するか又は無効にするために使用される。別の好ましい実施形態によれば、アプタマーは、Gタンパク質共役受容体に対して向けられる自己抗体を中和するため、及び/又は自己抗体が向かうGタンパク質共役受容体に及ぼす自己抗体の影響を低減するために使用される。

【0009】

しかし、上記に挙げた特定の自己免疫疾患に対して適用されうるきわめて限られた数のアプタマーのみが現在利用可能であり、ヒト患者における適用のためのそれらの有効性及び無害性は未だ不明のままである。したがって、自己抗体とGPCRとの相互作用に対する増強された干渉を示すさらなるアプタマーを利用できることが望ましい。

したがって、本発明の目的は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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新しいアプタマーを提供することである。

【0010】

さらに、本発明のもう1つの目的は、このようなアプタマー分子を含む医薬組成物ならびにこのようなアプタマーを含むアフェレーシスカラムを提供することである。

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の療法及び/又は診断における使用のための新しいアプタマーのヌクレオチド配列を決定するための方法を提供することも本発明の目的である。

【発明の概要】

【0011】

この目的は、以下に詳述されるような本発明の態様によって解決される。

【0012】

本発明の第1の態様によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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アプタマーであって、

a.) Qは、自然数のセットであり、

b.) Fは、

$$F := \{ X \mid Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c.) Fを使用して、

【数1】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

10

20

30

40

50

と定義され、

d.) Uは、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される1セットの非終端であり、

ここでBX及びCXについてはc.)の通りであり、

e.) Wは、

$$W = \{ A, C, G, T, G^x \}$$

と定義される1セットの終端であり、

ここで G^x は、b.)及びc.)の(5)に従って導き出せるすべての終端を表し、

f.) S Uは、開始記号である

という条件での、生成規則Pのセット：

P = {

S	M Y D E H	(1)
M	NR M	(2)
M	MR	(3)
M	RM	(4)
N	M	(5)
D	YM	(6)
E	VM	(6 a)
Y	K K L L K L K L	(7)
H	L V V	(8)
R	L	(9)
Z	A C G T	(1 0)
L	Z L Z	(1 1)
B X	G^x	(1 2)
C X	B X L B X	(1 3)
M	C X L C X	(1 4)
K	C X L B X	(1 5)
V	C X L	(1 6)
}		

10

20

30

によって定義される文法を満たすヌクレオチド配列を含み、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、該アプタマーは、ヌクレオチド配列GGTTGGTGTGGTTGG(配列番号22)、GGTTGGTGTGGT(配列番号23)又はCGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG(配列番号24)を含まない、アプタマーが提供される。

【0013】

本発明の第1の態様の好ましい実施形態では、アプタマーのヌクレオチド配列は、最大で593ヌクレオチドの長さを有する。

40

【0014】

本発明の第1の態様の別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、DNA配列である。

【0015】

本発明の第1の態様のさらに別の好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、RNA配列である。

【0016】

本発明の第1の態様の好ましい実施形態では、アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列は、以下の配列のうちのいずれか1つである：

(5' - GTTGTTTGGGGTGG - 3' 配列番号1)、

50

(5 ' - G T T G T T T G G G G T G G T - 3 ' 配列番号 2)

(5 ' - G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G T G G G - 3 ' 配列番号 3)

、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G - 3 ' 配列番号 4)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 5)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T T T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 6)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 7)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T T G G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 8)、

(5 ' - T G G T G G T G G T G G T - 3 ' 配列番号 9)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 10)、

(5 ' - G G T G G T T G T G G T G G - 3 ' 配列番号 11)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 12)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G - 3 ' 配列番号 13)、

(5 ' - G G T G G T T G T G G T G G T T G T G G T G G T T G T G G T G G - 3 ' 配列番号 14)、

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

(5 ' - G G T G G T G G T G T T G T G G T G G T G G T G G T T T - 3 ' 配列番号 16)、

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

(5 ' - T G G T G G T G G T - 3 ' 配列番号 18)、

(5 ' - T T A G G G T T A G G G T T A G G G T T A G G G - 3 ' 配列番号 20)

【 0 0 1 7 】

本発明の第 1 の態様の好ましい実施形態では、アプタマーのヌクレオチド配列は、少なくとも 4 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 8 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 12 ヌクレオチドの長さを有する。

本発明の第 1 の態様の好ましい実施形態では、アプタマーのヌクレオチド配列は、最大で 120 ヌクレオチド、好ましくは最大で 100 ヌクレオチド、より好ましくは最大で 80 ヌクレオチドの長さを有する。

【 0 0 1 8 】

本発明の第 1 の態様の好ましい実施形態では、アプタマーは、自己抗体、好ましくは、G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体、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アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体のうちのいずれか 1 つに特異的な自己抗体と相互作用することができる。

本発明の第 1 の態様の好ましい実施形態では、アプタマーは、G タンパク質共役受容体に対する自己抗体の出現に関連する自己免疫疾患に罹っている患者の血液又はその要素の治療的アフェレーシス中の選択的成分としての使用のためのものである。

【 0 0 1 9 】

本発明の第 1 の態様の好ましい実施形態では、自己免疫疾患は、心筋症、虚血性心筋症

(iCM)、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、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患(PAOD)、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス(SLE)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックのうちの1つである。

【0020】

本発明の第1の態様の好ましい実施形態では、アプタマーは、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アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM 3受容体に特異的な抗体の *i n v i t r o* 検出における使用のためのものである。

本発明の第1の態様の別の好ましい実施形態では、検出される抗体は、自己抗体である。

【0021】

本発明の第1の態様のさらに別の好ましい実施形態では、抗体は、体液、好ましくは、ヒトの体液、より好ましくは、ヒトの血液、血漿、血清、尿、大便、関節液、間質液、リンパ液、唾液、髄液及び/又は涙液の中に存在する又はそれに由来する。

本発明の第1の態様のさらに別の好ましい実施形態では、体液は、自己免疫疾患、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患、より好ましくは、アドレナリン作動性アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM 3受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患に罹っている又は罹っている疑いがある個体から採取される。

【0022】

本発明の第1の態様のさらに別の好ましい実施形態では、アプタマーは、以下のヌクレオチド配列(5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号12)を含む。

本発明の第2の態様によれば、本発明の少なくとも1種のアプタマーを含み、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい、医薬組成物が提供される。

本発明の第2の態様の好ましい実施形態では、医薬組成物は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療における使用のために提供される。

【0023】

本発明の第3の態様によれば、本発明の第1の態様によるアプタマーを含むアフエレーシスカラムが提供される。

本発明の第3の態様の好ましい実施形態では、アフエレーシスカラムは、自己免疫疾患の治療及び/又は診断における使用のために提供され、ここで自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、虚血性心筋症(iCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患(PAOD)、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス(SLE)、統合失調症、シェーグレン症候群、

10

20

30

40

50

歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及びノ又は先天性心ブロックである。

【 0 0 2 4 】

本発明の第 4 の態様によれば、アダマーオリゴヌクレオチドを調製するための方法であって、

アダマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップであって、

a .) Q は、自然数のセットであり、

b .) F は、

$$F := \{ X \mid Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c .) F を使用して、

【 数 2 】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

と定義され、

d .) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c) の通りであり、

e .) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで G^X は、 b .) 及び c .) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f .) S U は、開始記号である

という条件での、生成規則 P のセット :

$$P = \{$$

$$S \quad M \mid Y \mid D \mid E \mid H \quad (1)$$

$$M \quad N R M \quad (2)$$

$$M \quad M R \quad (3)$$

$$M \quad R M \quad (4)$$

$$N \quad M \quad (5)$$

$$D \quad Y M \quad (6)$$

$$E \quad V M \quad (6 a)$$

$$Y \quad K \mid K L \mid L K \mid L K L \quad (7)$$

$$H \quad L V \mid V \quad (8)$$

$$R \quad L \quad (9)$$

$$Z \quad A \mid C \mid G \mid T \quad (10)$$

10

20

30

40

50

L	Z L Z	(1 1)
B X	G ^x	(1 2)
C X	B X L B X	(1 3)
M	C X L C X	(1 4)
K	C X L B X	(1 5)
V	C X L	(1 6)
}		

の適用を含み、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味する、ステップと、第1のステップで得られたヌクレオチド配列を有するアプタマーオリゴヌクレオチドを作製するステップとを含む、方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】アプタマー（2 μl）によるアルファ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図2】アプタマー（2 μl）によるベータ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図3】PAR1/PAR2受容体に対するAABの作用におけるアプタマーの影響を示す図である。

【図4】アプタマー（2 μl）によるエンドセリン1 ETA受容体AABの中和を示す図である。

【図5】配列番号10、配列番号19及び配列番号20のアプタマーによる1-アドレナリン受容体AABの作用の中和を示す図である。

【図6】心筋細胞の拍動数に対する異なるアプタマー（2 μl）の効果を示す図である。

【図7】異なるGタンパク質共役受容体に対して向けられるAABに対する配列番号12のアプタマーの効果を示す図である。

【図8】100 nM、400 nM及び1000 nMの本発明による異なるアプタマー（配列番号1、4～9、11～14及び16～18）（2 μl）によるベータ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図9】本発明による所与の文法を使用して算定されたアプタマーの互いに（配列番号25～45）及び本発明によらない対照配列（配列番号46～50）との相互配列同一性を示す図である。

【図10】100 nMの本発明による異なるアプタマー（配列番号25～45）（2 μl）によるベータ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図11】400 nMの本発明による異なるアプタマー（配列番号31～34、44及び45）（2 μl）によるベータ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図12】100 nM、400 nM及び1000 nMの本発明によらない異なる対照配列（配列番号46～50）（2 μl）によるベータ1アドレナリン受容体AABの中和を示す図である。

【図13】100 nMの配列番号12の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）鬱病又はシャーガス心筋症に罹っている患者から単離されたベータ1アドレナリン受容体AABの活性を示す図である。

【図14】100 nMの配列番号12の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）緑内障、統合失調症、シャーガス心筋症、溶血性尿毒症症候群（EHEC）又はアルツハイマー病に罹っている患者から単離されたベータ2アドレナリン受容体AABの活性を示す図である。

【図15】100 nMの配列番号12の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）脱毛症、腎同種異系移植片拒絶反応又は腎性高血圧症に罹っている患者

10

20

30

40

50

から単離された A T 1 A A B の活性を示す図である。

【図 1 6】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）肺動脈性肺高血圧症、レイノー病、狭心症又は腎性高血圧症に罹っている患者から単離された E T A A A B の活性を示す図である。

【図 1 7】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）肺動脈性肺高血圧症、化学療法、多発性硬化症、脱毛症、円形脱毛症、溶血性尿毒症症候群（E H E C）、シェーグレン症候群、アルツハイマー病、神経皮膚炎、糖尿病 I 型又は乾癬に罹っている患者から単離されたアルファ 1 A A B の活性を示す図である。

【図 1 8】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）レイノー病、狭心症又はシェーグレン症候群に罹っている患者から単離された P A R A A B の活性を示す図である。

【図 1 9】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）化学療法、多発性硬化症又は糖尿病 I 型に罹っている患者から単離された M A S A A B の活性を示す図である。

【図 2 0】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）鬱病、統合失調症又は片頭痛 / パーキンソン病に罹っている患者から単離された 5 H T 4 A A B の活性を示す図である。

【図 2 1】 1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における（左から右に）シャーガス心筋症、円形脱毛症、片頭痛 / パーキンソン病又はシェーグレン症候群に罹っている患者から単離された M 2 A A B の活性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 6 】

本発明者らは、G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体と相互作用でき、かつそれらの 2 つの分子間の病原性の相互作用に干渉できるオリゴヌクレオチドが、定められた分子パターンを共有することを認識した。この認識から出発して、本発明者らは、G P C R - 自己抗体の有効な結合剤であるアプタマーの構造的なパターンを再現する請求項 1 による生成規則 P のセットによって定義される文法を案出するのに成功した。

これまで、G タンパク質共役受容体に対する自己抗体の結合に干渉するよう見えるきわめて限られた数のアプタマーのみが当技術分野において知られていた。G タンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療及び / 又は診断に好適な新しいアプタマーを同定するための試みは、特に、ヒト患者での診断又は療法におけるアプタマーの医薬適用のための厳しい必要条件の観点において、きわめて面倒であって最終的に好適なヌクレオチド配列を決定するのに有望であるにはほど遠い。この目的のために、これらの自己免疫疾患に対する使用のためのさらなるアプタマーを提供することがきわめて望まれた。

【 0 0 2 7 】

本発明者らは、現在、G タンパク質共役受容体自己抗体に関連する疾患に対して有効なアプタマーの構造的な共通性を初めて同定しており、アプタマーとして機能的で有効な 1 セットのヌクレオチド配列を定義するための 1 セットの生成規則を定義することができた。したがって、G P C R - 自己抗体と干渉するより多くの数のアプタマーを提供することが今初めて可能になった。

同一又はほぼきわめて同一の特性を共有している配列を同定するための一般的なアプローチは、このような特性を有する所与の配列と例えば少なくとも 8 0 又は 9 0 % の配列同一性を示すすべての配列を選別することである。このようなアプローチの背景にある概念は、きわめて類似した配列が、きわめて類似した特性を共有するはずであるということである。

【 0 0 2 8 】

この配列の類似性と機能的特性の保存との関係は、例えば、知識に基づいたモデリングの場面において、長年にわたって使用及び適用されてきた。しかし、低い相互の配列同一

10

20

30

40

50

性を共有しているが、依然としてきわめて類似した特性を有するヌクレオチド又はアミノ酸配列があることが知られている。低い配列類似性にもかかわらず機能を保持するそれらの配列を認識及び記載するために、より精巧な方法が必要とされる。

本明細書に示されている発明者らの認識は、配列同一性を考慮することなく、有効で機能的な配列を特異的に認識及び定義するための文法を開発及び使用することである。この文法を使用して、特異的な所望の配列特性を有する配列のみを算出することが可能である。同文法は、任意の配列のプールの中で望ましい特性を有する配列を特異的に認識するためにも使用されうる。

【0029】

一般に、文法の正確さは、たった1つの誤った文字又は誤った部位にある文字が、文法によって認識できない配列を導く可能性があるという事実によって反映される。これは、本発明及びその適用にきわめて重要である。特許請求されるアダプター配列の重要な部位に1つの誤ったヌクレオチドがあれば、それらの配列は文法によって認識されないこともある。

このアプローチを使用して、本発明は、文法による配列判定基準セットを満たさないすべての配列を特異的に除外することを可能にし、それによりGPCR自己抗体を結合できなくすると予想される。他方では、この方法は、所与の鑄型に対するいかなる複雑性又は配列同一性にも関係なく、セット判定基準を満たすすべての配列の算出及び/又は選別を可能にする。

算定された配列の機能的特性が、配列の同一性又は類似性ではなく、文法の機能である（低い相互の配列同一性を有する機能的配列が、等しい又はきわめて類似した特性を有する）ことを実証するために、所与の文法の規則は、低い相互の配列同一性を示すいくつかの配列を算定するための境界条件を考慮して適用される。それにもかかわらず、文法によってこうして生成されるすべての配列が、GPCR自己抗体に対する結合の特許請求される特性を有することが本明細書において実証されることになる。

【0030】

図9は、本発明によって算定されたアダプターのID（配列番号25～45）及びそれらの相互の配列同一性を示す。配列同一性は、オープンペナルティ値及び延長ペナルティ値のセットを最大にしてKalignソフトウェアを使用することによって決定される。このソフトウェアは、Lassmann and Sonnhammer, Kalign--an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. (2005) BMC bioinformatics 6 :298、Lassmann et al., Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. (2009 Feb) Nucleic acids research 37 (3) :858-65、Goujon et al., A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBL. (2010 Jul) Nucleic acids research 38 (Web Server issue) :W695-9、McWilliam et al., Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBL. (2013 Jul) Nucleic acids research 41 (Web Server issue) :W597-600及びLi et al., The EMBL-EBL bioinformatics web and programmatic tools framework. (2015 Jul 01) Nucleic acids research 43 (W1) :W580-4に記載されている。

【0031】

本発明の一実施形態によれば、2つのヌクレオチド配列間の同一性は、上述したようにして決定されうる。本発明の別の実施形態によれば、2つのヌクレオチド配列間の同一性は、上記で引用されている文献のうちの1つ又は複数によって決定されうる。

本発明による特許請求される広範囲の異なる配列は、基本的には、全範囲の理論的に可能な配列同一性を網羅して算定されている。図9から、90%（配列番号38から42の間又は40から41の間）～11%（配列番号28から29の間）の範囲に及び機能的なアダプター配列間の相互の配列同一性が認められる。

すべての配列は、配列番号12、3、10及び15の配列について以下に示されているような移動還元構文解析を使用して文法の所与の規則によって算出されうるかつ/又は認識される。

10

20

30

40

50

【0032】

本発明によらない無作為化されたオリゴヌクレオチドは、対照配列として使用されている（配列番号46～50）。これらの配列は、所与の文法によって認識されない。これらの対照は、機能的な本発明のアプタマーと10%（配列番号30から47の間）～60%（配列番号39から48の間）の範囲内の配列同一性を示す。

【0033】

特に、配列番号28の本発明のアプタマーは、以下に示されるように（例11及び図12を参照されたい）非機能的な対照配列の配列番号48と44%の配列同一性を有する。対照的に、配列番号29の本発明のアプタマーは、配列番号28とわずか11%というきわめて低い配列同一性を示すが、いずれの配列も以下に示されるように活性である（例9及び10ならびに図10及び11を参照されたい）。本発明の配列間でのきわめて低い配列同一性と、非機能的な配列に対する比較的高い同一性（すなわち、4倍高い）とを示すこの例は、配列の活性が、配列同一性ではなく文法によって表された配列の共通性の機能であることを明白に示している。

10

これらの結果は、所与の文法によってコードされる配列特性と、それによって生成又は認識されて自己抗体を阻害する配列の能力との間の明白な関係を示唆する。この関係は、配列同一性ではなく文法自体に基づいており、これは、きわめて低い相互の配列同一性を有する活性な配列を算定することによって実証された。同様の方法で、本発明のアプタマーの測定された活性と対照配列の結果との比較により、本明細書において特許請求されるすべてのアプタマー配列の機能に関する発見が確認される。

20

【0034】

本発明のアプタマーは、請求項1によってさらに定義されるような生成規則のセットによって定義される文法を満たすことを特徴とする。前記文法は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患に対して有効なアプタマーのための構造的な必要条件を反映している。

本発明の好ましい実施形態では、アプタマーは、文脈自由言語の特徴を表す文法（チョムスキー階層における2型文法）又は文脈依存言語の特徴を表す文法（チョムスキー階層における1型文法）又は句構造文法によって記載されている（帰納的可算）言語の特徴を表す文法（チョムスキー階層における0型文法）を満たすヌクレオチド配列を含む。より好ましい実施形態では、アプタマーは、文脈自由言語の特徴を表す文法（チョムスキー階層における2型文法）を満たすヌクレオチド配列を含む。

30

【0035】

本発明の目的では、「アプタマー」という用語は、特異的かつ高親和性で標的分子に結合するオリゴヌクレオチドを指す。定められた条件下で、アプタマーは、特異的な三次元構造に折りたたまれうる。

本発明のアプタマーは、一連の核酸分子、ヌクレオチドを含む又はからなる。好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、本発明による文法を満たすヌクレオチド配列からなる又はそれ以外の場合には本明細書において定義されているヌクレオチド配列からなる。

本発明のアプタマーは、好ましくは、未修飾の及び/又は修飾された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1文字コードによれば、「C」はすなわちシトシンを表し、「A」はすなわちアデニンを表し、「G」はすなわちグアニンを表し、かつ「T」はすなわちヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンを表し、「U」はすなわちヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを表す。以下にそうでないと示されていない場合、「ヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを指すものとする。

40

【0036】

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んでもよく又はからなってもよく、したがって、それぞれDNAアプタマー又はRNAアプタマーと呼ばれうる。本発明のアプタマーがRNAヌクレオチド配列を含む場合、

50

本発明の全体にわたって明記されている配列モチーフ内で「T」はウラシルを表すことが理解される。

本発明の全体にわたる簡潔性のために、参照は、明示のDNAヌクレオチド配列のみになされる。しかし、本発明によってそれぞれのRNAヌクレオチド配列も含まれることが理解される。

【0037】

一実施形態によれば、DNAアダプターの使用が好ましい。DNAアダプターは、通常、血漿中でRNAアダプターよりも安定である。しかし、代替の実施形態によれば、RNAアダプターが好ましい。

本発明のアダプターは、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、2'-メトキシエチル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むヌクレオチド配列を含んでいてもよい。本発明のアダプターは、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んでいてもよい。それぞれ、「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」、「2'-メトキシエチル修飾ヌクレオチド」及び/又は「2'-アミノ修飾ヌクレオチド」という用語は、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指す。

本発明のアダプターは、修飾を含んでいてもよい。このような修飾は、例えば、アルキル化、すなわち、少なくとも1つのヌクレオチドのメチル化、アリアル化もしくはアセチル化、鏡像異性体の包含及び/又は1つもしくは複数の他のヌクレオチドもしくは核酸配列とのアダプターの融合を包含する。このような修飾は、例えば、5'-PEG修飾及び/もしくは3'-PEG修飾又は5'-CAP修飾及び/もしくは3'-CAP修飾を含んでいてもよい。代替的に又は加えて、本発明のアダプターは、ロックド核酸、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ことが好ましい、修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0038】

ロックド核酸(LNA)は、高次構造が固定されているそれぞれのRNAヌクレオチドのアナログを表す。ロックド核酸のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の二環式リボヌクレオチドを含み、ここで、2'-OH基は、メチレン基を介してC₄-炭素原子と連結される。ロックド核酸は、それぞれの未修飾のRNAアダプター対応物と比較して、ヌクレアーゼに対する改良された安定性を示す。ハイブリダイゼーション特性も改良され、それにより、親和性の促進及びアダプターの特異性が可能となる。

【0039】

もう1つの好ましい修飾は、アダプターの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。3'末端及び/又は5'末端のこのような修飾は、アダプターがヌクレアーゼによる急速な分解から保護されるという効果を有する。

代替的に又は加えて、本発明のアダプターは、ペグ化された3'末端又は5'末端を示していてもよい。3'-PEG又は5'-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、PEG基は、1~900のエチレン基、より好ましくは、1~450のエチレン基を含む。好ましい実施形態では、アダプターは、HO-(CH₂CH₂O)_n-Hを有する直鎖状PEG単位を含み、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。

【0040】

本発明のアダプターは、ホスホチオエート主鎖を有する核酸配列を含んでいてもよく、もしくはそれからなってもよく、又は完全にもしくは部分的にペプチド核酸(PNA)として構成されていてもよい。本発明によるアダプターは、Keefe AD et al., Nat Rev Drug Discov. 2010 Jul;9(7):537-50 に又はMayer G, Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48(15):2672-89 に又はMayer, G. and Famulok M., Pharmazie in unserer Zeit 2007; 36: 432-436に記載のようにさらに修飾されていてもよい。

10

20

30

40

50

さらに、アプタマーは、その構造的な完全性を保護するためならびに細胞内でのその送達を促進するための好適なビヒクル中にカプセル封入されていてもよい。好ましいビヒクルとしては、リポソーム、脂質小胞、マイクロ粒子などが含まれる。

【0041】

脂質小胞は、形質膜に似ており、細胞膜と融合させるために作製されうる。ほとんどのリポソーム及び多層小胞は、容易には融合性ではなく、その理由は、主に、小胞曲率半径の蓄積エネルギーが最小であるからである。好ましい脂質小胞としては、小単層小胞が含まれる。本発明のアプタマーをカプセル封入することが意図される小単層小胞は、それらがきわめて強固な曲率半径を有するのできわめて融合性である。小単層小胞の平均直径は、5 nm ~ 500 nmである；好ましくは10 nm ~ 100 nm、より好ましくは20 nm ~ 60 nmであり、40 nmを含む。このサイズは、小胞が内皮細胞間のギャップを通過するのを可能にし、それによって静脈内投与後のアプタマー含有小胞の全身性送達が可能となる。有用な小胞は、サイズが大きく変化してもよく、かつアプタマーとの特異的な適用によって選択される。

10

【0042】

小単層小胞は、当技術分野において利用可能な（例えば国際公開第2005/037323号に開示されているような）手順を使用して *in vitro* で容易に調製されうる。小胞を形成する組成物は、好ましくは、別の極性脂質、及び任意選択で1種又は複数のさらなる極性脂質及び/又はラフト形成剤と一緒に、安定な小胞形成剤であるリン脂質を含む。安定な小胞形成剤である好ましいリン脂質としては、1 - パルミトイル - 2 - ドコサヘキサエノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン及び1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリンが含まれる。好ましい極性脂質としては、以下：1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - 1 - セリン]、典型的なスフィンゴミエリン、1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロール、及び1 - パルミトイル - 2 - ヒドロキシ - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリンが含まれる。

20

【0043】

他の好ましい極性脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、混合鎖ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノール、及びドコサヘキサエン酸含有リン脂質が含まれる。好ましいラフト形成剤の1つの例は、コレステロールである。

30

上述の方法のうちの一つによって本発明のアプタマーを修飾する一つの利点は、アプタマーが、例えば、アプタマーが使用される環境中に存在するヌクレアーゼのような、有害な影響に対して安定化されうることである。前記修飾は、アプタマーの薬理学的特性に適合するためにも好適である。修飾は、好ましくは、アプタマーの親和性又は特異性を変えない。

【0044】

本発明のアプタマーは、担体分子及び/又はレポーター分子にコンジュゲートされてもよい。担体分子には、アプタマーにコンジュゲートされたときに、ヒト血漿において、コンジュゲートされたアプタマーの血漿中半減期を、例えば、安定性を促進することによってかつ/又は排出速度に影響を及ぼすことによって、延長させるような分子が含まれる。好適な担体分子の1つの例は、PEGである。

40

レポーター分子は、コンジュゲートされたアプタマーの検出を可能にする分子を含む。このようなレポーター分子の例は、GFP、ビオチン、コレステロール、色素、例えば蛍光染料など、放射性残基を含む電気化学的に活性なレポーター分子及び/又は化合物、特に、PET（陽電子放出断層撮影）検出に好適な放射性核種、例えば、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{82}Rb 又は ^{68}Ga などを含むものである。当業者は、好適な担体及びレポーター分子ならびにそれらを本発明のアプタマーにコンジュゲートする方法を十分に認識している。

50

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態では、本発明のアプタマーのヌクレオチド配列は、少なくとも4ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも8ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも12ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも16ヌクレオチドの長さを有する。別の好ましい実施形態では、本発明のアプタマーのヌクレオチド配列は、最大で120ヌクレオチド、より好ましくは最大で100ヌクレオチド、さらにより好ましくは最大で80ヌクレオチド、さらにより好ましくは最大で60ヌクレオチドの長さを有する。一実施形態によれば、本発明のアプタマーのヌクレオチド配列は、最大で40ヌクレオチド、特に最大で20ヌクレオチドの長さを有する。

本発明によれば、アプタマーは、ヌクレオチド配列GGTTGGTGTGGTTGG(配列番号22)、GGTTGGTGTGGT(配列番号23)又はCGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG(配列番号24)のうちのいずれから成るもの又はそれを含まない。この条件は、本明細書に記載又は定義されているような本発明によるアプタマー又は一群のアプタマーのいかなる定義にも適用されなければならない。

【 0 0 4 6 】

好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれか又は配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれかと90%を超える同一性であるいかなる配列から成るもの又はそれを含まない。別の好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれか又は配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれかと85%を超える同一性であるいかなる配列から成るもの又はそれを含まない。特定の一実施形態によれば、本発明のアプタマーは、配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれか又は配列番号22、23もしくは24のヌクレオチド配列のいずれかと少なくとも80%の同一性であるいかなる配列から成るもの又はそれを含まない。

【 0 0 4 7 】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、アプタマー配列は、本明細書に開示されている個別的なアプタマー配列と少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性である核酸配列から成るもの又はそれを含む本発明の部分形成する。

【 0 0 4 8 】

2つの配列間でのパーセント同一性の決定は、Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 5873-5877)の数学的アルゴリズムを使用することによって本発明に従って達成される。このようなアルゴリズムは、Altschul et al. (J. Mol. Biol. (1990) 215: 403-410)のBLASTN及びBLASTPプログラムの基礎である。BLASTヌクレオチド探索は、BLASTNプログラムで行われる。比較の目的でギャップがあるアライメントを得るために、Altschul et al. (Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402)によって記載されているようにギャップ有りBLASTが利用される。BLAST及びギャップ有りBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーターが使用される。

【 0 0 4 9 】

本発明の好ましい実施形態によれば、アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列は、以下の配列のうちのいずれか1つである：(5'-GTTGTTTGGGGTGG-3'配列番号1)、(5'-GTTGTTTGGGGTGGT-3'配列番号2)、(5'-GGTTGGGGTGGGGTGGGGTGGG-3'配列番号3)、(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号4)、(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号5)、(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号6)、(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'配列番号7)、(5'-TTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG-3'

10

20

30

40

50

しい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、上記のヌクレオチド配列のうちの1つを有する。

【0053】

より好ましい実施形態によれば、アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列は、以下の配列のうちのいずれか1つである：5' - GGTGGGTCGGTAGGGTTT - 3' 配列番号27)、(5' - TTGGCTGGATCGGACGGT - 3' 配列番号28)、(5' - GGTCTGGGTTCTGGTGGTTA - 3' 配列番号29)、(5' - TGGCGGTGGT - 3' 配列番号38)、(5' - TGGAGGTGGA - 3' 配列番号39)、(5' - AGGTGGTGGGA - 3' 配列番号40)、(5' - AGGTGGCGGA - 3' 配列番号41)。別のより好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、上記のヌクレオチド配列のうちの1つを有する。

10

別のより好ましい実施形態によれば、アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列は、以下の配列のうちのいずれか1つである：5' - GGTGGGTCGGTAGGGTTT - 3' 配列番号27)、(5' - GGTCTGGGTTCTGGTGGTTA - 3' 配列番号29)、(5' - TGGCGGTGGT - 3' 配列番号38)、(5' - TGGAGGTGGA - 3' 配列番号39)、(5' - AGGTGGTGGGA - 3' 配列番号40)、(5' - AGGTGGCGGA - 3' 配列番号41)。別のより好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、上記のヌクレオチド配列のうちの1つを有する。

【0054】

別のより好ましい実施形態によれば、アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列は、以下の配列のうちのいずれか1つである：5' - GGTGGGTCGGTAGGGTTT - 3' 配列番号27)、(5' - GGTCTGGGTTCTGGTGGTTA - 3' 配列番号29)、(5' - TGGCGGTGGT - 3' 配列番号38)、(5' - TGGAGGTGGA - 3' 配列番号39)。別のより好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、上記のヌクレオチド配列のうちの1つを有する。

20

特に好ましい実施形態によれば、アプタマーは、ヌクレオチド配列(5' - TGGCGGTGGT - 3' 配列番号38)を含む。別の特に好ましい実施形態によれば、アプタマーは、ヌクレオチド配列(5' - TGGCGGTGGT - 3' 配列番号38)を有する。

【0055】

本発明のアプタマーは、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療及び/又は診断に有用である。本発明の文脈において、アプタマーは、ヒト対象ならびに動物対象に有用であるとみなされる。一実施形態によれば、アプタマーは、ヒト対象における使用のためのものである。別の実施形態によれば、アプタマーは、動物対象における使用のためのものである。好ましい一実施形態によれば、本発明のアプタマーは、本明細書において定義されるような自己免疫疾患の治療における使用のためのものである。

30

【0056】

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する疾患は、当技術分野において知られているような標準的な方法を使用して、このような疾患に罹患した患者においてこのような自己抗体が検出されうる疾患である。好ましい実施形態によれば、疾患は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体によって惹起される。一実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体が検出されうるがさらなる症状は認められない患者の状態は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患と考えられうる。

40

したがって、本発明のアプタマーは、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に対する抗体を体液中に有する患者の治療における使用のためのものである。本発明の好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーを使用して治療又は診断される患者は、Gタンパク質共役受容体に対する抗体が検出される可能性がある患者である。

いくつかの疾患は、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連することが文献においてすでに報告されている又は知られている。本発明者らは、このような関連を考慮し

50

てさらに調査を行っており、以前に報告されているよりも多くの疾患がこのような自己抗体に関連することを発見している（データは示されていない）。

【0057】

特許請求されるアプタマーの、GPCR自己抗体に対する親和性により、このような自己抗体の存在に関連するいずれの疾患も、本明細書において提供されかつ特許請求されるアプタマーで効果的に治療されるのはもっともらしいことである。したがって、本発明の好ましい実施形態によれば、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症（DCM）、虚血性心筋症（iCM）、周産期心筋症（PPCM）、特発性心筋症、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患（PAOD）、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス（SLE）、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、先天性心ブロック、糖尿病I型、乾癬、アルツハイマー病、疲労、神経皮膚炎、腎疾患、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、レーベル遺伝性視神経症（LHON症候群）、アレルギー性喘息、不整脈、難治性高血圧症、糖尿病2型、血管性認知症、非シャーガス巨大結腸症(non-Chagas megacolon)及び/又は起立性高血圧のうちの一つである。

10

【0058】

本明細書中に示されているデータは、広範囲の疾患についての、本発明によるアプタマーの標的分子との関連を実証しているが、原則として、本明細書において言及される疾患のすべては、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連することが本発明者らによって認識されており、したがって、本発明によるアプタマーで治療される有望な標的疾患である。

20

【0059】

本発明の好ましい実施形態によれば、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症（DCM）、虚血性心筋症（iCM）、周産期心筋症（PPCM）、特発性心筋症、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患（PAOD）、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス（SLE）、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックのうちの一つであり、より好ましくは、自己免疫疾患は、拡張型心筋症（DCM）である。

30

【0060】

本発明の別の実施形態によれば、自己免疫疾患は、心疾患、神経疾患、血管疾患、結合組織疾患（CTD）、皮膚疾患又はシャーガス病であり、特に、自己免疫疾患は、心疾患、神経疾患又は血管疾患である。特定の一実施形態によれば、自己免疫疾患は、心疾患である。

40

本発明の意味の範囲内の心疾患は、心筋症、拡張型心筋症、虚血性心筋症、特発性心筋症、周産期心筋症、シャーガス心筋症、心房細動、急性心筋炎、慢性心筋炎、先天性心ブロック、不安定狭心症、化学療法誘発性心筋症又は肥大型心筋症であってもよい。

本発明の意味の範囲内の神経疾患は、片頭痛、鬱病、癲癇、パーキンソン病、多発性硬化症、群発頭痛、統合失調症、スティッフマン症候群、シャーガス神経障害又は複合性局所痛症候群であってもよい。

本発明の意味の範囲内の血管疾患は、高血圧症、肺高血圧症、末梢動脈閉塞性疾患、悪性高血圧症又はレイノー症候群であってもよい。

【0061】

50

本発明の意味の範囲内の結合組織疾患（CTD）は、強皮症、全身性エリテマトーデス SLE 又はシェーグレン症候群であってもよい。本発明の意味の範囲内の皮膚疾患は、円形脱毛症、脱毛症又は白斑であってもよい。本発明の意味の範囲内のシャーガス病は、シャーガス巨大結腸症又はシャーガス巨大食道症であってもよい。

代替の実施形態では、自己免疫疾患は、緑内障、メタボリックシンドローム、歯周炎、溶血性尿毒症症候群、妊娠高血圧腎症、良性前立腺肥大症又は腎同種異系移植片拒絶反応のうちの1つである。

もう1つの代替の実施形態によれば、自己免疫疾患は、拡張型心筋症、特発性心筋症、急性心筋炎、慢性心筋炎、シャーガス心筋症、周産期心筋症、肺高血圧症、高血圧症、妊娠高血圧腎症、悪性高血圧症、不安定狭心症、虚血性心筋症、片頭痛、鬱病、多発性硬化症、パーキンソン病又は癲癇のうちの1つ、特に、拡張型心筋症、特発性心筋症、急性心筋炎、慢性心筋炎、シャーガス心筋症、周産期心筋症、肺高血圧症又は高血圧症のうちの1つであり、拡張型心筋症、特発性心筋症、急性心筋炎又は慢性心筋炎のうちの1つであってもよい。

【0062】

特に、本発明のアプタマーは、自己抗体、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体、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アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A 受容体、ムスカリンM2受容体、アンギオテンシンI I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び/又はM3受容体のうちのいずれか1つに特異的な自己抗体と相互作用する能力があり、より好ましくは、これらの自己抗体とその標的タンパク質との特異的な相互作用を阻害する能力がある。

【0063】

本明細書において、アドレナリン作動性ベータ1受容体は、ベータ1受容体、1 - A R 又はベータ1 - R として表示されることもある。さらに、アドレナリン作動性ベータ2受容体も、ベータ2受容体、2 - A R 又はベータ2 - R として表示されることもある。加えて、アンギオテンシンI I 受容体、I型は、アンギオテンシンI I A T 1 受容体、アンギオテンシンA T 1 受容体又はA T 1 - R と呼ばれることもある。エンドセリン1 E T A 受容体は、E T A - R 又はE T A - 1 - R として表示されることもあり、アドレナリン作動性アルファ1受容体は、アルファ1受容体、1 - A R 又はアルファ1 - R として表示されることもある。プロテアーゼ活性化型受容体は、P A R - R と呼ばれることもある。アンギオテンシンI I 代謝産物アンギオテンシン（1~7）結合受容体は、本明細書において、m a s 関連Gタンパク質共役受容体A、M A S 受容体、M A S - R 又はM A S 1 と呼ばれることもある。5 - ヒドロキシトリプタミン受容体4は、5 H T 4 - R と略記されることもあり、一方では、ムスカリン受容体は、M_x - R として表示されることもあり、xはムスカリン受容体のサブタイプを示す。

本発明の一実施形態によれば、ムスカリンM受容体は、M1、M2、M3及び/又はM4受容体を包含することを意味する。別の実施形態によれば、ムスカリンM1、M2、M3及び/又はM4受容体は、自己抗体が向かうGタンパク質共役受容体についての一例としてM3受容体が挙げられる特定の例として有用である。

【0064】

配列番号12の配列を有するアプタマーについて例示的に以下に示されているように、本発明のアプタマーは、Gタンパク質共役受容体に特異的な全範囲の自己抗体を中和するために使用されうる。本明細書中の例12~20において、このアプタマーは、これらの自己抗体に関連する自己免疫疾患に罹っている患者から採取された多様な自己抗体を特異的に中和することが示される（図13~21を参照されたい）。したがって、本発明によるアプタマーが、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体を中和することができ、かつしたがって、疾患の治療において有効であることは、もっともらしいことであり、ここで、このような自己抗体はこのような疾患に罹っている患者内に存在する。

【0065】

10

20

30

40

50

Gタンパク質共役受容体に対して向けられる自己抗体の病理学的な挙動を阻害することにより、本発明のアプタマーの中和効果は、それぞれのGタンパク質共役受容体の恒久的な活性化を低減するか又はさらに無効にする。結果として、これらの抗体の困難な除去の必要性がない。したがって、本発明は、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アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM2受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM3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に好適な一まとまりの化合物を提供する。

10

さらに、固定化後、本発明のアプタマーは、上記に示されている自己抗体を捕捉又は固定化する能力がある。したがって、患者の血清から自己抗体を取り除くためのアフエレーション技術を確立するため、及び自己抗体の測定用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。後者は、特に、自己免疫疾患の診断のために使用されうる。

【0066】

好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、本明細書において定義されるような自己免疫疾患の診断における使用のためのものである。特に、アプタマーは、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アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM3受容体に特異的な抗体の*in vitro*検出における使用のためのものである。別の好ましい実施形態によれば、本発明のアプタマーは、本明細書において定義されるような自己免疫疾患の*in vivo*診断における使用のためのものである。より好ましい実施形態によれば、検出される抗体は、自己抗体である。

20

【0067】

本明細書中で使用される場合、「自己抗体」とは、患者の自身の組織の抗原性の要素に応答、及び反応して形成される抗体を意味する。このような抗体は、それが形成された生物の細胞、組織、又は天然タンパク質を攻撃する可能性があり、通常、前記生物における病原性のプロセスと提携する。

30

好ましい実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に特異的な抗体は、体液、好ましくは、ヒトの体液、より好ましくは、ヒトの血液、血漿、血清、尿、大便、関節液、間質液、リンパ液、唾液、髄液及び/又は涙液の中に存在する又はそれに由来する。より好ましくは、体液は、自己免疫疾患、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患、より好ましくは、アドレナリン作動性アルファ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-1受容体、アドレナリン作動性ベータ-2受容体、エンドセリン1 E T A受容体、ムスカリンM受容体、アンギオテンシンI I A T 1受容体、P A R受容体、M A S受容体、5 H T 4受容体及び/又はM3受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患に罹っている又は罹っている疑いがある個体から採取される。

40

【0068】

本発明のアプタマーは、自己免疫疾患の治療又は診断のために使用される場合、個体又は患者に必ずしも投与されなければならないわけではない。治療的又は診断的な効果は、例えば、身体から又は体液からの自己抗体のような、抗体の除去のために本発明のアプタマーを使用することによって達成されてもよい。

このような除去は、本発明のアプタマーが、例えば、免疫吸着及び/又はアフエレーション中に、単に*ex vivo*において体液と接触するだけであり、それによって、本発明のアプタマーが、治療される個体又は患者の体内に入らない設定における本発明のアプタマーの適用を含みうる。したがって、本発明は、本発明のアプタマーを含むアフエーションカラムも目的とする。

50

【0069】

アフエーシスは、ドナー又は患者の血液を、ある特定の要素を分離して残りをそのドナー又は患者の循環に戻す装置に通す医療技術である。したがって、アフエーシスは、患者の血漿を結合することによって行われ、患者の身体及びこの手段は、閉鎖循環において治療効果を達成する、すなわち、アプタマーがカラムに結合される。本発明のアプタマーは、アフエーシス中に選択的成分として使用されうる。選択的成分は、試料又は血液中に存在し本発明のアプタマーによって特異的に標的化される望ましい特定の要素、すなわち、抗体又は自己抗体を特異的に分離して取り出す役割を果たす。

好ましくは、本発明のアプタマーは、自己免疫疾患の治療及び/又は診断のために使用され、自己免疫疾患は、心筋症、拡張型心筋症(DCM)、虚血性心筋症(iCM)、周産期心筋症(PPCM)、特発性心筋症、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患(PAOD)、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス(SLE)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックである。さらに好ましくは、本発明のアプタマーは、本明細書においてさらに定義されているような自己免疫疾患に罹っている患者に由来する血液又はその要素の治療的アフエーシスのための選択的成分として使用される。

10

20

【0070】

本発明は、固体支持体に結合された本発明のアプタマーにも関する。当業者は、固体支持体に結合されたこのようなアプタマーを作製するために使用されうる技術及び材料を十分に認識している。好ましい実施形態では、固体支持体は、医学的、生化学的又は生物学的なアッセイにおいて適用可能である固体材料を含む。

前記固体材料は、医学的、生化学的又は生物学的な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、アフエーシスに好適なカラム、好ましくは、Gタンパク質共役受容体に特異的な抗体を液体試料から、好ましくは体液から、除去するためのアフエーシスにおける使用に好適なカラムの製造において結果として生じる製品の使用を可能にする固体支持体に連結されてもよい。

30

【0071】

本発明のアプタマーの製造又は大量生産は、当技術分野においてよく知られており、単なる慣例の作業にすぎない。

本発明は、本発明の少なくとも1種のアプタマーを含み、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい、医薬組成物も目的とする。本発明は、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的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物も目的とする。

【0072】

好ましくは、本発明のアプタマーは、医薬組成物の活性成分を構成するかつ/又は有効量で存在する。「有効量」という用語は、疾患又は病態に対する、予防的、診断的又は治療的に重要な効果を有する本発明のアプタマーの量を表す。予防的効果は、疾患の発症を予防する。治療的に重要な効果は、疾患の1つ又は複数の症状をある程度まで軽減させるか、又は疾患もしくは病態に関連するかもしくはその原因となる1つ又は複数の生理学的もしくは生化学的なパラメーターを部分的に又は完全にのいずれかで正常まで回復させる。

40

【0073】

本発明のアプタマーを投与するためのそれぞれの量は、望ましい予防的、診断的又は治療的な効果を達成するために十分に高いものである。任意の特定の哺乳動物に対する投与の具体的な用量レベル、頻度及び期間は、採用される特定の成分の活性、年齢、体重、総

50

合的な健康状態、性別、食事、投与の時間、投与の経路、薬物の組合せ、及び特定の療法の過酷性を含む多様な要因によって決まることは、当業者によって理解されるであろう。よく知られている手段及び方法を使用して、正確な量は、当業者によって慣例の実験法の一事項として決定されうる。

本発明の医薬組成物の一実施形態によれば、総アプタマー含量のうちの少なくとも20%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは少なくとも95%は、本発明のアプタマーでできている。

療法に使用される場合、医薬組成物は、一般に、1種又は複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられた製剤として投与されることになる。「賦形剤」という用語は、本明細書において、本発明のアプタマー以外の任意の成分を記載するために使用される。賦形剤の選択は、特定の投与様式に大きく依存することになる。賦形剤は、好適な担体及び/又は希釈剤でありうる。

本発明の医薬組成物は、経口で投与されてもよい。経口投与は、嚥下を含んでいてもよく、それによって組成物は消化管に入り、又は頬側もしくは舌下の投与が用いられてもよく、それによって組成物は口腔から直接血流に入る。

【0074】

経口投与に好適な製剤としては、以下：錠剤；コーティング錠；粒子、液体、又は粉末を含むカプセル剤；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；リボソーム；フィルム、腔坐剤、噴霧剤及び液体製剤が含まれる。

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られてもよく、典型的には、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、又は好適なオイルなど、ならびに1種又は複数の乳化剤及び/又は懸濁化剤を含む。液体製剤は、例えば、サシェ剤からの、固体の再構成によっても調製されうる。

【0075】

錠剤剤形の場合、用量に依存して、本発明のアプタマーは、剤形の0.1質量%~80質量%、より典型的には、剤形の5質量%~60質量%を構成しうる。本発明のアプタマーに加え、錠剤は、一般に、崩壊剤を含む。

崩壊剤の例には、デンプングリコール酸ナトリウム、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、微結晶性セルロース、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含まれる。

一般に、崩壊剤は、剤形の1質量%~25質量%、好ましくは、5質量%~20質量%を含むことになる。

【0076】

錠剤は、例えば、結合剤、界面活性剤、滑沢剤のようなさらなる賦形剤ならびに/又は、例えば、抗酸化剤、着色剤、香味剤、保存剤及び/もしくは矯味剤のような他の可能な成分を含んでいてもよい。

錠剤ブレンドは、錠剤を形成するために直接に又はローラーによって圧縮されてもよい。錠剤ブレンド又はブレンドの一部は、代替的に、錠剤成形前に湿式造粒、乾式造粒、溶融造粒、溶融凝固、又は押出成形されてもよい。最終的な製剤は、1つ又は複数の層を含んでいてもよく、かつコーティングされていても又はコーティングされていなくてもよい；それは、さらにカプセル封入されていてもよい。

経口投与用の固体製剤は、即時型及び/又は改変型の放出であるように製剤化されてもよい。改変型の放出製剤は、遅延型、持続型、パルス型、調節型、標的化型及びプログラム型の放出を含む。

本発明の医薬組成物は、血流中、筋肉内、又は内部器官内に直接に投与されてもよい。

10

20

30

40

50

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、髄腔内、心室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内及び皮下が含まれる。非経口投与のための好適な装置としては、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。

【0077】

非経口製剤は、典型的には、塩、炭水化物及び（好ましくは3～9のpHにする）緩衝剤などの賦形剤を含みうる水溶液であるが、一部の適用では、それらは無菌の非水溶液として、又は無菌の発熱物質を含まない水などの好適なビヒクルと組み合わせて使用される乾燥形態としてより好適に製剤化されうる。

例えば凍結乾燥による、無菌条件下での非経口製剤の調製は、当業者によく知られている標準的な製薬技術を使用して容易に達成されうる。

非経口溶液の調製において使用される本発明の医薬組成物の溶解性は、溶解促進剤の配合のような、適切な製剤技術の使用によって増大させることができる。

非経口投与用の製剤は、即時型及び/又は改変型の放出であるように製剤化されてもよい。改変型の放出製剤は、遅延型、持続型、パルス型、調節型、標的化型及びプログラム型の放出を含む。したがって、本発明の化合物は、有効化合物の改変型放出を提供するインプラント型デポーとして投与するための固体、半固体、又はチキソトロピー液体として製剤化されてもよい。このような製剤の例には、薬物コーティングステント及びPGLAポリ（DL-乳酸-コグリコール）酸（PGLA）マイクロスフェアが含まれる。

【0078】

本発明の医薬組成物はまた、皮膚又は粘膜、すなわち皮膚又は経皮的に局所的に投与されうる。この目的のための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、オブラート、インプラント、スポンジ、繊維、絆創膏及びマイクロエマルジョンが含まれる。

リポソームも使用されうる。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。浸透促進剤が配合されてもよい。局所投与の他の手段としては、エレクトロポレーション、イオントフォレーシス、フォノフォレーシス、ソノフォレーシス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）の注射による送達が含まれる。局所投与用の製剤は、即時型及び/又は改変型の放出であるように製剤化されてもよい。改変型の放出製剤は、遅延型、持続型、パルス型、調節型、標的化型及びプログラム型の放出を含む。

【0079】

ヒト患者への投与では、本発明のアプタマー及び/又は本発明の医薬組成物の総日用量は、当然、投与の様式に、依存して典型的には0.001mg～5000mgの範囲内である。例えば、静脈内の日用量は、0.001mg～40mgのみを必要としうる。総日用量は、単回用量又は分割用量で投与されてもよく、かつ、医師の判断で、本明細書に示されている典型的な範囲から外れていてもよい。

これらの用量は、約75kg～80kgの体重を有する平均的なヒト対象に基づいている。医師は、小児及び高齢者のように、体重がこの範囲外にある対象に対する用量を容易に決定することができることになる。

本発明は、本発明のアプタマー、医薬組成物、容器及び任意選択で書面による使用説明書を含み、かつ/又は投与のための手段を有するキットも包含する。

【0080】

疾患の治療及び/又は診断のために、投与の経路にかかわらず、本発明のアプタマーは、20mg/kg体重以下の、好ましくは、10mg/kg体重以下の、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、治療サイクル当たりの日用量で投与される。

【0081】

一実施形態では、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

10

20

30

40

50

受容体であるアドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 2 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体に特異的な、例えば自己抗体のような、抗体の *i n v i t r o* 検出及び / 又は特徴付けにおける使用のための本発明のアプタマーを目的とする。したがって、本発明の好ましい一実施形態は、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アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体に特異的な抗体の *i n v i t r o* 検出のための請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に定義されているようなアプタマーの使用を目的とする。

10

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非存在下でのラット心筋細胞拍動頻度アッセイにおける試料の試験を含みうる。試料及び本発明のアプタマーが拍動頻度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づけることができる。試料中のこのような抗体の総量又は相対量についてのデータも、このような抗体の他の特性についてのデータとともに得られうる。

【 0 0 8 2 】

いわゆるラット心筋細胞拍動頻度アッセイは、例えば、ヒトアドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 2 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体のようなくつかのヒト G タンパク質共役受容体に特異的な抗体、例えば、患者由来の自己抗体の検出及び特徴付けのための十分に確立されたアッセイである。

20

【 0 0 8 3 】

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 muscle 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. Col. Cardiol. 55, 463 - 468 において詳細に説明されている。したがって、当業者はこのアッセイの性質を十分に認識しており、その適用方法を知っている。

30

【 0 0 8 4 】

このような抗体の検出及び / 又は特徴付けのために、本発明のアプタマーは、溶液中で又は固定化形態で使用されうる。

本発明のアプタマーは、前記抗体の直接的又は間接的な検出及び / 又は特徴付けのために使用されてもよい。

40

【 0 0 8 5 】

本発明の別の態様によれば、アプタマーオリゴヌクレオチドを調製するための方法であって、

アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップであって、

a .) Q は、自然数のセットであり、

b .) F は、

$$F := \{ X \quad Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c .) F を使用して、

50

【数 3】

(1) $\forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$

(2) $\forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$

(3) $\forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$

(4) $\forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$

(5) $\forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$

と定義され、

d.) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c.) の通りであり、

e.) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで G^X は、b.) 及び c.) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f.) S U は、開始記号である

という条件での、生成規則 P のセット：

$$P = \{$$

$$S \quad M | Y | D | E | H \quad (1)$$

$$M \quad N R M \quad (2)$$

$$M \quad M R \quad (3)$$

$$M \quad R M \quad (4)$$

$$N \quad M \quad (5)$$

$$D \quad Y M \quad (6)$$

$$E \quad V M \quad (6 a)$$

$$Y \quad K | K L | L K | L K L \quad (7)$$

$$H \quad L V | V \quad (8)$$

$$R \quad L \quad (9)$$

$$Z \quad A | C | G | T \quad (10)$$

$$L \quad Z L | Z \quad (11)$$

$$B X \quad G^X \quad (12)$$

$$C X \quad B X L B X \quad (13)$$

$$M \quad C X L C X \quad (14)$$

$$K \quad C X L B X \quad (15)$$

$$V \quad C X L \quad (16)$$

}

の適用を含み、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が DNA 配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が RNA 配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味する、ステップと、第 1 のステップ

10

20

30

40

50

で得られたヌクレオチド配列を有するアプタマーオリゴヌクレオチドを作製するステップとを含む、方法が提供される。

【0086】

好ましい実施形態によれば、アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップは、以下のコンセンサス配列

$$S_i - (GGG - S - GGG - S)_n - (GGG - S - GGG)_k - S_m \quad (1)$$

の適用を含み、

式中、 $n > 1$ ；

$i, m, k = 0, 1$ であり；

$S = \{A, C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C, G\}^+$ 又は $\{A, C, T\}^+$ 又は $\{A, G, T\}^+$ 又は $\{C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C\}^+$ 又は $\{A, G\}^+$ 又は $\{A, T\}^+$ 又は $\{C, G\}^+$ 又は $\{C, T\}^+$ 又は $\{G, T\}^+$ 又は $\{A\}^+$ 又は $\{C\}^+$ 又は $\{T\}^+$ であり、ここで $\{ \}^+$ は、所与のアルファベットセットの正クリーネ閉包を表す。

正クリーネ閉包という用語は、有限な、空集合でない記号のセット（語彙又はアルファベット）のメンバーの連結の方法を説明するものである。このプロセスの結果として、新しい単語（記号の配列）が生成されることになる。それぞれの単語は、ゼロより大きい長さを有する。

【0087】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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式（1）のコンセンサス配列を満たすヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供され、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、該アプタマーは、ヌクレオチド配列CGCCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG（配列番号24）を含まない。

【0088】

さらに別の好ましい実施形態によれば、アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップは、以下のコンセンサス配列

$$S_i - (GG - S - GG - S)_n - (GG - S - GG)_k - S_m \quad (2)$$

の適用を含み、

式中、 $n > 1$ ；

$i, m, k = 0, 1$ であり；

$S = \{A, C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C, G\}^+$ 又は $\{A, C, T\}^+$ 又は $\{A, G, T\}^+$ 又は $\{C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C\}^+$ 又は $\{A, G\}^+$ 又は $\{A, T\}^+$ 又は $\{C, G\}^+$ 又は $\{C, T\}^+$ 又は $\{G, T\}^+$ 又は $\{A\}^+$ 又は $\{C\}^+$ 又は $\{T\}^+$ であり、

ここで $\{ \}^+$ は、所与のアルファベットセットの正クリーネ閉包を表す。

【0089】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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式（2）のコンセンサス配列を満たすヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供され、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、該アプタマーは、ヌクレオチド配列GGTTGGTGGTGGTGGTGG（配列番号22）、GGTTGGTGGTGGTGGTGG（配列番号23）又はCGCCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG（配列番号24）を含まない。

【0090】

別の好ましい実施形態によれば、アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップは、以下のコンセンサス配列

10

20

30

40

50

$$S_i - P - (LM)_j - E_k; \quad (3)$$

の適用を含み、

式中、 $i, k = 0, 1$ であり；

$j \geq 0$ であり；

$P = (G_m - (X) - G_m - (Y) - G_m - (Z) - G_m)$ であり；

$M = (G_m - (X) - G_m - (Y) - G_m - (Z) - G_m)$ であり；

$m > 1$ であり；

$S, L, E, X, Y, Z = \{A, C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C, G\}^+$ 又は $\{A, C, T\}^+$ 又は $\{A, G, T\}^+$ 又は $\{C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C\}^+$ 又は $\{A, G\}^+$ 又は $\{A, T\}^+$ 又は $\{C, G\}^+$ 又は $\{C, T\}^+$ 又は $\{G, T\}^+$ 又は $\{A\}^+$ 又は $\{C\}^+$ 又は $\{T\}^+$ であり、ここで $\{\}^+$ は、所与のアルファベットセットの正クリーネ閉包を表す。

10

【0091】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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式(3)のコンセンサス配列を満たすヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供され、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、該アプタマーは、ヌクレオチド配列GGTTGGTGTGGTTGG(配列番号22)、GGTTGGTGTGGT(配列番号23)又はCGCCTAGGTTGGGTAAGGGTGGTGGCG(配列番号24)を含まない。

20

【0092】

別の好ましい実施形態によれば、アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップは、以下のコンセンサス配列

$$S_i - P - E_j; \quad (4)$$

の適用を含み、

式中、 $i, j = 0, 1$ であり；

$P = (G_m - (X) - G_m - (Y) - G_m)$ の適用を含む；

$m > 1$ の適用を含む；

$X, Y, S, E = \{A, C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C, G\}^+$ 又は $\{A, C, T\}^+$ 又は $\{A, G, T\}^+$ 又は $\{C, G, T\}^+$ 又は $\{A, C\}^+$ 又は $\{A, G\}^+$ 又は $\{A, T\}^+$ 又は $\{C, G\}^+$ 又は $\{C, T\}^+$ 又は $\{G, T\}^+$ 又は $\{A\}^+$ 又は $\{C\}^+$ 又は $\{T\}^+$ であり、ここで $\{\}^+$ は、所与のアルファベットセットの正クリーネ閉包を表す。

30

【0093】

本発明の別の好ましい実施形態によれば、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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式(4)のコンセンサス配列を満たすヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供され、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がDNA配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列がRNA配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、該アプタマーは、ヌクレオチド配列GGTTGGTGTGGTTGG(配列番号22)、GGTTGGTGTGGT(配列番号23)又はCGCCTAGGTTGGGTAAGGGTGGTGGCG(配列番号24)を含まない。

40

本発明の方法を使用して、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体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治療及び/又は診断用のアプタマーとして有効であるために必要かつ十分な構造パターンを有するヌクレオチド配列を決定することが可能である。

【0094】

本発明のアプタマーの配列は、本発明による方法の使用によって生成されうる。以下において、本発明による配列番号12の配列の由来が例示的に示される：

50

配列 # 1 2 の由来 : (5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G -
3 ')

X = 2

S M

N R M

M R M

C 2 L C 2 R M

C 2 L C 2 R C 2 L C 2

B 2 L B 2 L C 2 R C 2 L C 2

B 2 L B 2 L B 2 L B 2 R C 2 L C 2

B 2 L B 2 L B 2 L B 2 R B 2 L B 2 L C 2

B 2 L B 2 L B 2 L B 2 R B 2 L B 2 L B 2 L B 2

G G L B 2 L B 2 L B 2 R B 2 L B 2 L B 2 L B 2

G G L G G L B 2 L B 2 R B 2 L B 2 L B 2 L B 2

G G L G G L G G L B 2 R B 2 L B 2 L B 2 L B 2

G G L G G L G G L G G R B 2 L B 2 L B 2 L B 2

G G L G G L G G L G G R G G L B 2 L B 2 L B 2

G G L G G L G G L G G R G G L G G L B 2 L B 2

G G L G G L G G L G G R G G L G G L G G L B 2

G G L G G L G G L G G R G G L G G L G G L G G

G G Z G G L G G L G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G L G G L G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G Z G G L G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G L G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G Z G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G R G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G L G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G Z L G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G Z Z G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G T Z G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G L G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G Z G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G T G G L G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G T G G Z G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G T G G T G G L G G

G G T G G T G G T G G T T G G T G G T G G Z G G

G G T G G T G G T G G T T G G T G G T G G T G G

配列番号 1 2

【 0 0 9 5 】

移動還元構文解析を使用して、配列番号 1 2 の配列は、以下の表に挙げられる文法の規則を適用した後に、無作為化された配列のプールにおいて有効な配列として認識もされる。入力配列が開始記号 S まで還元されるので、この配列は、定義された文法について有効な文字列である。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

【表 1】

配列	動作	スタック	規則
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGG	開始	\$	
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGG	移動	GG	
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGT	還元	B2	12a
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGT	移動	TB2	
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG	還元	ZB2	10
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG	還元	LB2	11
GGTGGTGGTGGTTGGTGGTGG	移動	GGLB2	
GGTGGTGGTGGTTGGTGGT	還元	B2LB2	12a
GGTGGTGGTGGTTGGTGGT	還元	C2	13a
GGTGGTGGTGGTTGGTGGT	移動	TC2	
GGTGGTGGTGGTTGGTGG	還元	ZC2	10
GGTGGTGGTGGTTGGTGG	還元	LC2	11
GGTGGTGGTGGTTGGTGG	移動	GGLC2	
GGTGGTGGTGGTTGGT	還元	B2LC2	12a
GGTGGTGGTGGTTGGT	移動	TB2LC2	
GGTGGTGGTGGTTGG	還元	ZB2LC2	10
GGTGGTGGTGGTTGG	還元	LB2LC2	11
GGTGGTGGTGGTTGG	移動	GGLB2LC2	
GGTGGTGGTGGTT	還元	B2LB2LC2	12a
GGTGGTGGTGGTT	還元	C2LC2	13a
GGTGGTGGTGGTT	還元	M	14a
GGTGGTGGTGGTT	移動	TM	
GGTGGTGGTGGT	還元	ZM	10
GGTGGTGGTGGT	還元	LM	11
GGTGGTGGTGGT	移動	TLM	
GGTGGTGGTGG	還元	ZLM	11
GGTGGTGGTGG	還元	LM	11
GGTGGTGGTGG	還元	RM	9

10

20

30

40

GGTGGTGGTGG	移動	GGRM	
GGTGGTGGT	還元	B2RM	12a
GGTGGTGGT	移動	TB2RM	
GGTGGTGG	還元	ZB2RM	11
GGTGGTGG	還元	LB2RM	11
GGTGGTGG	移動	GGLB2RM	
GGTGGT	還元	B2LB2RM	12a
GGTGGT	還元	C2RM	13a
GGTGGT	移動	TC2RM	
GGTGG	還元	ZC2RM	11
GGTGG	還元	LC2RM	11
GGTGG	移動	GGLC2RM	
GGT	還元	B2LC2RM	12a
GGT	移動	TB2LC2RM	
GG	還元	ZB2LC2RM	11
GG	還元	LB2LC2RM	11
GG	移動	GGLB2LC2RM	
\$	還元	B2LB2LC2RM	12
\$	還元	C2LC2RM	13a
\$	還元	MRM	14a
\$	還元	NRM	5
\$	還元	M	2
\$	還元	S	1
\$	受理		

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

本発明による配列番号 3、10 及び 15 の特許請求されるアプタマー配列の由来のさらなる実例は、以下に示される：

配列 # 3 の由来：(5' - G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G T G G G - 3')

X = 3
S M
R M
L M
L C 3 L C 3
Z L C 3 L C 3
Z Z L C 3 L C 3
Z Z Z L C 3 L C 3

Z Z Z Z L C 3 L C 3
 Z Z Z Z Z L C 3 L C 3
 Z Z Z Z Z Z L C 3 L C 3
 Z Z Z Z Z Z Z L C 3 L C 3
 Z Z Z Z Z Z Z Z L C 3 L C 3
 Z Z Z Z Z Z Z Z Z C 3 L C 3
 G Z Z Z Z Z Z Z Z C 3 L C 3
 G G Z Z Z Z Z Z Z C 3 L C 3
 G G T Z Z Z Z Z Z C 3 L C 3
 G G T T Z Z Z Z Z C 3 L C 3
 G G T T G Z Z Z Z C 3 L C 3
 G G T T G G Z Z Z C 3 L C 3
 G G T T G G G Z Z C 3 L C 3
 G G T T G G G G Z C 3 L C 3
 G G T T G G G G T B 3 L B 3 L C 3
 G G T T G G G G T B 3 L B 3 L B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G L B 3 L B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G Z B 3 L B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T B 3 L B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G L B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G Z Z B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G Z B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G T B 3 L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G L B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G Z B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G T B 3
 G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G T G G G

10

20

配列番号 3

配列 # 1 0 の由来 : (5 ' - G G T G G T G G T G G - 3 ')

X = 2
S M

30

C 2 L C 2
 B 2 L B 2 L C 2
 G G L B 2 L C 2
 G G Z B 2 L C 2
 G G T B 2 L C 2
 G G T G G L C 2
 G G T G G Z C 2
 G G T G G T C 2
 G G T G G T B 2 L B 2
 G G T G G T G G L B 2
 G G T G G T G G Z B 2
 G G T G G T G G T B 2
 G G T G G T G G T G G

40

配列番号 1 0

配列 # 1 5 の由来 : (5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T
G G T T T - 3 ')

X = 2
S M
R M
R N R M

50

R N R M R
R M R M R
L M R M R
Z L M R M R
Z Z L M R M R
Z Z Z M R M R
T Z Z M R M R
T T Z M R M R
T T T M R M R
T T T C 2 L C 2 R M R 10
T T T B 2 L B 2 L C 2 R M R
T T T G G L B 2 L C 2 R M R
T T T G G L B 2 L C 2 R M R
T T T G G Z B 2 L C 2 R M R
T T T G G T B 2 L C 2 R M R
T T T G G T G G L C 2 R M R
T T T G G T G G Z C 2 R M R
T T T G G T G G T C 2 R M R
T T T G G T G G T B 2 L B 2 R M R
T T T G G T G G T G G L B 2 R M R 20
T T T G G T G G T G G Z B 2 R M R
T T T G G T G G T G G T B 2 R M R
T T T G G T G G T G G T G G R M R
T T T G G T G G T G G T G G L M R
T T T G G T G G T G G T G G Z L M R
T T T G G T G G T G G T G G Z Z L M R
T T T G G T G G T G G T G G Z Z Z M R
T T T G G T G G T G G T G G T Z Z Z M R
T T T G G T G G T G G T G G T T Z Z M R 30
T T T G G T G G T G G T G G T T G Z M R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T M R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T C 2 L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T B 2 L B 2 L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G L B 2 L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G Z B 2 L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T B 2 L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G L C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G Z C 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T C 2 R 40
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T B 2 L B 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G L B 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G Z B 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T B 2 R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G R
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G L
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G Z L
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G Z Z L
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G Z Z Z
T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T Z Z 50

T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T T Z
 T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T T T 配列番

号 1 5

【 0 0 9 8 】

本明細書中に記載のような本発明のすべての実施形態は、当業者がこのような組合せをいかなる技術的意味もなさないと考えない限り、あらゆる組合せで組み合わされるものとみなされる。

【 実施例 】

【 0 0 9 9 】

自己抗体活性の評価のための機能アッセイ（Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体、A A B）

本発明のアプタマーのA A B中和能の評価のために、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体（A A B）を同定及び定量することができる機能アッセイを利用した。

【 0 1 0 0 】

この機能アッセイでは、患者のA A Bに応答することができる自発的に拍動しているラット心筋細胞を利用し、精製されたI g G画分の一定分量を添加したときに、それらの拍動頻度における変化、すなわち変時反応を示した。変時反応は、アドレナリン作動性のベータ1受容体、ベータ2受容体又はアルファ1受容体、ムスカリンM2受容体及びエンドセリン受容体A型（E T A受容体）を標的とするもののようなA A Bを刺激することによって引き起こされる陽性変時作用又は陰性変時作用の合計であり、基礎拍動頻度に対する差であるデルタ拍動/時間として表される。

【 0 1 0 1 】

アレルギー性喘息を有する患者において見出されるベータ2アドレナリン受容体A A BなどのA A Bを阻害することは、ベータ2アドレナリン作動性アゴニストによって誘発される陽性変時効果に拮抗する。

A A B種を変時反応（陽性又は陰性の変時作用）に対するそれらの寄与に関して区別するために、ベータ2 - A A BについてはI C I - 1 1 8 . 5 5 1、M 2 - A A Bについてはアトロピン、ベータ1 / ベータ2 - A A Bについてはプロプラノロール、E T A受容体についてはB Q 6 1 0 又はB Q 1 2 3、アルファ1アドレナリン受容体についてはプラゾシン又はウラピジル、及びA T 1受容体についてはイベサルタン又はロサルタンなどの特異的なアンタゴニストの存在下で、解析を行った。特異的に遮断されたものを除き、残りの活性変化は、A A Bによって引き起こされる。

【 0 1 0 2 】

さらに、A A B活性を中和することができる受容体の細胞外構造に対応するGタンパク質共役受容体のペプチドを使用して、A A Bの特異性をより詳細に解析した。同様の方法で、アプタマーをそれらのA A B中和能について試験した。

この機能アッセイは、すべてのヒト血清A A B、及びその配列がヒト受容体に対するホモログであり（A A B標的化のための前提条件）かつGタンパク質系などの細胞の拍動頻度（収縮性、変時作用）を調節するタンパク質カスケードに関連する細胞表面上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。

【 0 1 0 3 】

新生仔心筋細胞の調製

新生仔心筋細胞の調製のために、1～3日齢のラットの心臓を滅菌条件下で摘出し、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むリン酸緩衝生理食塩水溶液（P B S）に移した。心室組織の分離後、それを断片に切断し、10 m lのP B Sで2回洗浄した。その後、切断した心室断片を、30 m lのP B S / 0 . 2 %トリプシン中に懸濁して37 で15分間インキュベートした。トリプシン処理プロセスを、5 m lの氷冷された熱失活された新生仔ウシ血清を添加することによって停止した。得られた懸濁液を遠心分離し（130 × g、15分）、ペレットを20 m lのS M 2 0 - I培地に移した。得られた懸濁液の一定量を同量のトリパンブルー溶液で希釈して、細胞を計数した。

湿り空気で平衡されて10%の熱失活された新生仔ウシ血清、2 μ Mのフルオロデオキシウリジンで補われたSM20-I培地を含む2.0 mlのグルコース中に懸濁された 2.4×10^6 個の細胞を、単層として37 で4日間培養するために12.5 cm²のFalconフラスコに移した。培地を、1日目及びその後2日毎に新しいものと交換した。実験は、フラスコ内で実施された。

【0104】

AAA測定のための血清試料の調製

AAA測定に好適なIgG画分の調製のために、1 mlの血清及び660 μ lの飽和硫酸アンモニウム溶液を混合し(最終濃度40%の硫酸アンモニウム)、4 で18時間インキュベートし、6,000 \times gで15分間遠心分離した。

ペレットを750 μ lのPBS中に再懸濁し、750 μ lの飽和硫酸アンモニウム溶液と混合して(最終濃度50%の硫酸アンモニウム)、再び遠心分離した。ペレットを700 μ lのPBS中に懸濁し、100倍容量のPBSに対して透析した。得られたIgG画分はAAAを含んでおり、測定まで-20 で保存された。

【0105】

AAA測定原理及びアプタマー試験セットアップ

実験は、12.5 cm²のFalconフラスコ内で実施された。測定のために使用された6つの独立した細胞クラスターに印をつけ、印をつけた領域における基礎心筋細胞拍動数を記録した。

AAA活性の測定のために、調製されたIgG試料を、図面内に示されているような最終希釈率(例えば、AAA 1:50、これは、2000 μ lの細胞培地中に上記のように調製された40 μ lのIgG溶液に相当する)で細胞に添加した。IgG試料の添加後、フラスコを37 で60分間インキュベートし、印をつけた領域における心筋細胞の拍動数を再び計数し、基礎拍動数に対する差を算定したところ、これは、陽性変時又は陰性変時のAAA活性についてそれぞれ陽性又は陰性であった。

アプタマー効果を試験するために、AAAを含むIgG試料を、混合物が心筋細胞に添加される前に15分間、対応するアプタマー(図面内に示されているような配列番号)と共にプレインキュベートした。60分(37)のインキュベーション時間後、拍動頻度を評価し、基礎拍動数に対する差を算定した。2 μ lのアプタマーの添加は、最終細胞フラスコ(2000 μ lの総容量)における100 nMのアプタマーの添加に相当した。

【0106】

(例1)

アルファ1アドレナリン受容体AAAの活性を、新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした(図1参照、カラム1: AAA 1:50)。図1のカラム2~5、及び7は、それぞれの配列(それぞれ配列番号2、3、10、15、及び20)の100 nMのアプタマーとのAAAのプレインキュベーション後に低減したAAA活性を示す。図1のカラム6の結果は、本発明によるアプタマー配列ではない100 nMの対照アプタマー配列(配列番号19: TCGAGAAACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCA)を使用することによって得られた。

【0107】

(例2)

ベータ1アドレナリン受容体AAAの活性を、新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした(図2参照、カラム1: AAA 1:50)。図2のカラム2~5、及び7は、それぞれの配列(それぞれ配列番号2、3、10、15、及び20)の100 nMのアプタマーとのAAAのプレインキュベーション後に低減したAAA活性を示す。図2のカラム6の結果は、本発明によるアプタマー配列ではない100 nMの対照アプタマー配列(配列番号19)を使用することによって得られた。

【0108】

(例3)

PAR1/PAR2受容体AAAの活性を、新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録する

ことによりモニターした（図3参照、カラム1：A A B 1：50）。図3のカラム2～5、及び7は、それぞれの配列（それぞれ配列番号2、3、10、15、及び20）の100nMのアプタマーとのA A Bのプレインキュベーション後に低減したA A B活性を示す。図3のカラム6の結果は、本発明によるアプタマー配列ではない100nMの対照アプタマー配列（配列番号19）を使用することによって得られた。

（例4）

エンドセリン1 E T A受容体A A Bの活性を、新生仔心筋細胞の拍動数の減少を記録することによりモニターした（図3参照、カラム1：A A B 1：50）。図3のカラム2～5、及び7は、それぞれの配列（それぞれ配列番号2、3、10、15、及び20）の100nMのアプタマーとのA A Bのプレインキュベーション後に低減したA A B活性を示す。図4のカラム6の結果は、本発明によるアプタマー配列ではない100nMの対照アプタマー配列（配列番号19）を使用することによって得られた。

10

【0109】

（例5）

1-アドレナリン受容体A A Bに対する配列番号10及び配列番号20のアプタマーの濃度依存的な影響を、新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした（x軸の表示におけるデータポイント「なし」は、A A B 1：50に相当する）。これらの曲線は、アプタマー配列番号10及び20のアプタマー効果の用量依存性を可視化する。配列番号19は本発明によるアプタマー配列ではないので、配列番号19を使用して得られた曲線は対照として役立った。

20

（例6）

例6では、心筋細胞の基礎拍動数に対する、本発明のアプタマー（カラム1, 2, 3, 4, 6, 及び7において示されるそれぞれ配列番号2, 3, 10, 15, 20, 及び12）のそれ自体での効果が示される。図6のカラム5の結果は、本発明によるアプタマー配列ではない対照アプタマー配列（配列番号19）を使用することによって得られた。

（例7）

A A Bの活性を、新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした（図7参照、カラム1：1-A A B 1番、1：50、カラム3：1-A A B 2番、1：50、カラム5：1-A A B 3番、1：50、カラム7：アルファ1-A A B 1番、1：50、カラム8：アルファ1-A A B 2番、1：50、カラム11：2-A A B 1番、1：50、カラム13：2-A A B 2番、1：50）。図7のカラム2、4、6、8、10、12、14は、100nMの配列番号12のアプタマーにおける低減したA A B活性を示す（1-A A B 1、1-A A B 2、1-A A B 3、アルファ1-A A B 1、アルファ1-A A B 2、2-A A B 1、2-A A B 2）。A A B 1、2、及び3番は、異なる患者の材料から調製されたA A Bである。

30

【0110】

（例8）

例8は、上記の例2のように行われた。ベータ1アドレナリン受容体A A Bの活性を、アプタマーの添加なし（図8参照、カラム1：A A B 1：50）及び本発明によるアプタマーの添加に応じての新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした。本発明のアプタマーで処理されたすべての試料は、それぞれの配列（それぞれ図8内の配列番号1、4～7～9、11～14、及び16～18）の100nM、400nM又は1000nMのアプタマーとのA A Bのプレインキュベーション後に低減したA A B活性を示す。

40

【0111】

（例9）

例9は、上記の例2のように行われた。ベータ1アドレナリン受容体A A Bの活性を、アプタマーの添加なし（図10参照、カラム1：A A B 1：50）及び本発明によるアプタマーの添加に応じての新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした。本発明のアプタマーで処理されたすべての試料は、それぞれの配列（それぞれ図8

50

内の配列番号 25 ~ 45 ; これらの配列の相互の同一性については、図 9 を参照されたい) の 100 nM のアプタマーとの A A B のプレインキュベーション後に低減した A A B 活性を示す。配列番号 31 ~ 34、44 及び 45 の配列のアプタマーでの実験は、400 nM の各アプタマー (以下の例 10 内を参照されたい) を使用してさらに繰り返されている。

【 0 1 1 2 】

(例 1 0)

例 10 は、上記の例 2 のように行われた。ベータ 1 アドレナリン受容体 A A B の活性を、アプタマーの添加なし (図 11 参照、カラム 1 : A A B 1 : 50) 及び本発明によるアプタマーの添加に応じての新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした。本発明のアプタマーで処理されたすべての試料は、それぞれの配列 (それぞれ配列番号 31 ~ 34、44 及び 45) の 400 nM のアプタマーとの A A B のプレインキュベーション後に低減した A A B 活性を示す。

10

【 0 1 1 3 】

(例 1 1)

例 11 は、上記の例 2 のように行われた。ベータ 1 アドレナリン受容体 A A B の活性を、アプタマーの添加なし (図 12 参照、カラム 1 : A A B 1 : 50) 及び本発明によらない対照配列の添加に応じての新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした。対照配列で処理されたすべての試料は、それぞれの配列 (それぞれ配列番号 46 : 5' - A C C T C T C C T T C C T T C C T C T C C T C T C A A A A G A G C T - 3' , 配列番号 47 : 5' - T C C C A T C T A T T A T T T T T C T T C T A A T C A T C - 3' , 配列番号 48 : 5' - A T C T C A T G A A C G T A A A G C C A T T C A A A C G - 3' , 配列番号 49 : 5' - A C A C T A G T A G C C A C A C T G A G - 3' , 配列番号 50 : 5' - C C T G C C C C C T A A A - 3') の 100 nM、400 nM 又は 1000 nM の対照との A A B のプレインキュベーション後に影響されない A A B 活性を示す。

20

【 0 1 1 4 】

(例 1 2)

例 12 は、上記の例 2 のように行われた。(図 13 において左から右に) 鬱病又はシャーガス心筋症に罹っている患者から単離されたベータ 1 アドレナリン受容体 A A B の活性を、アプタマーの添加なし (図 13 参照、カラム 1 : A A B 1 : 50) 及び 100 nM の本発明による配列番号 12 のアプタマーの添加に応じての新生仔心筋細胞の拍動数の増加を記録することによりモニターした。本発明のアプタマーで処理された試料は、アプタマーが添加されていない対照試料と比較して、100 nM の配列番号 12 との A A B のプレインキュベーション後に低減した A A B 活性を示す。

30

【 0 1 1 5 】

(例 1 3)

例 13 は、上記の例 12 のように行われ、ここで、この例では、100 nM の配列番号 12 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 14 において左から右に) 緑内障、統合失調症、シャーガス心筋症、溶血性尿毒症症候群 (E H E C) 又はアルツハイマー病に罹っている患者から単離されたベータ 2 アドレナリン受容体 A A B の活性をモニターした。

40

(例 1 4)

例 14 は、上記の例 12 のように行われ、ここで、この例では、100 nM の配列番号 12 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 15 において左から右に) 脱毛症、腎同種異系移植片拒絶反応又は腎性高血圧症 (high blood pressure at kidney disease) に罹っている患者から単離された A T 1 A A B の活性をモニターした。

(例 1 5)

例 15 は、上記の例 12 のように行われ、ここで、この例では、100 nM の配列番号 12 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 16 において左から右に)

50

肺動脈性肺高血圧症、レイノー病、狭心症又は腎性高血圧症に罹っている患者から単離された E T A A A B の活性をモニターした。

【 0 1 1 6 】

(例 1 6)

例 1 6 は、上記の例 1 2 のように行われ、ここで、この例では、1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 1 7 において左から右に) 肺動脈性肺高血圧症、化学療法、多発性硬化症、脱毛症、円形脱毛症、溶血性尿毒症症候群 (E H E C)、シェーグレン症候群、アルツハイマー病、神経皮膚炎、糖尿病 I 型又は乾癬に罹っている患者から単離されたアルファ 1 A A B の活性をモニターした。

(例 1 7)

例 1 7 は、上記の例 1 2 のように行われ、ここで、この例では、1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 1 8 において左から右に) レイノー病、狭心症又はシェーグレン症候群に罹っている患者から単離された P A R A A B の活性をモニターした。

【 0 1 1 7 】

(例 1 8)

例 1 8 は、上記の例 1 2 のように行われ、ここで、この例では、1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 1 9 において左から右に) 化学療法、多発性硬化症又は糖尿病 I 型に罹っている患者から単離された M A S A A B の活性をモニターした。

(例 1 9)

例 1 9 は、上記の例 1 2 のように行われ、ここで、この例では、1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 2 0 において左から右に) 鬱病、統合失調症又は片頭痛 / パーキンソン病に罹っている患者から単離された 5 H T 4 A A B の活性をモニターした。

【 0 1 1 8 】

(例 2 0)

例 2 0 は、上記の例 1 2 のように行われ、ここで、この例では、1 0 0 n M の配列番号 1 2 の本発明のアプタマーの非存在下又は存在下における (図 2 1 において左から右に) シャーガス心筋症、円形脱毛症、片頭痛 / パーキンソン病又はシェーグレン症候群に罹っている患者から単離された M 2 A A B の活性をモニターした。

10

20

30

【 図 1 】

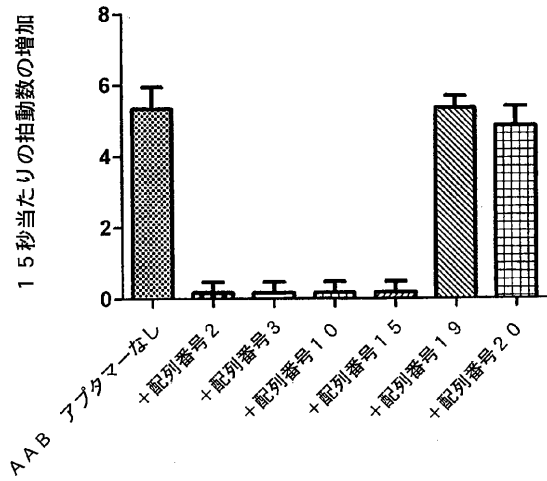


Figure 1

【 図 2 】

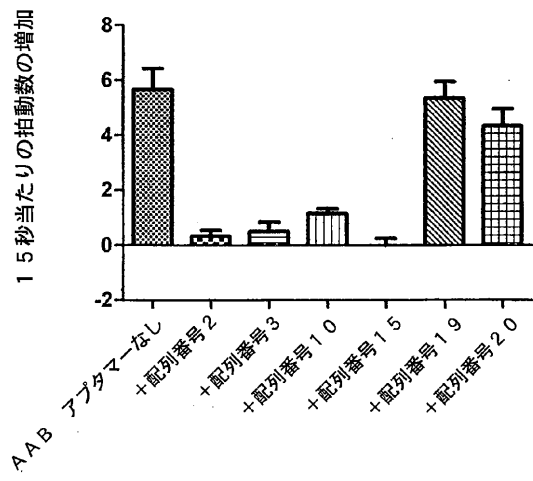


Figure 2

【 図 3 】

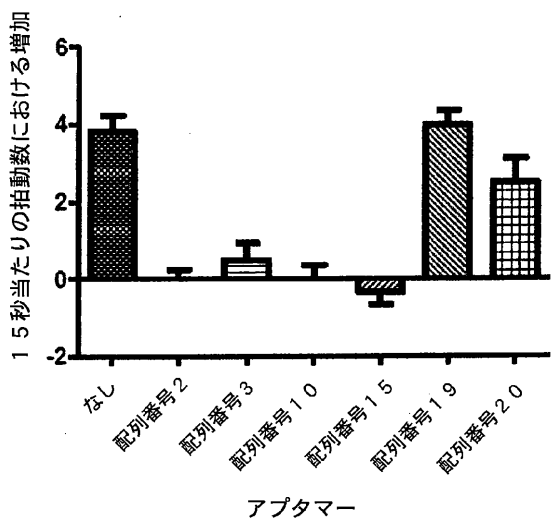


Figure 3

【 図 4 】

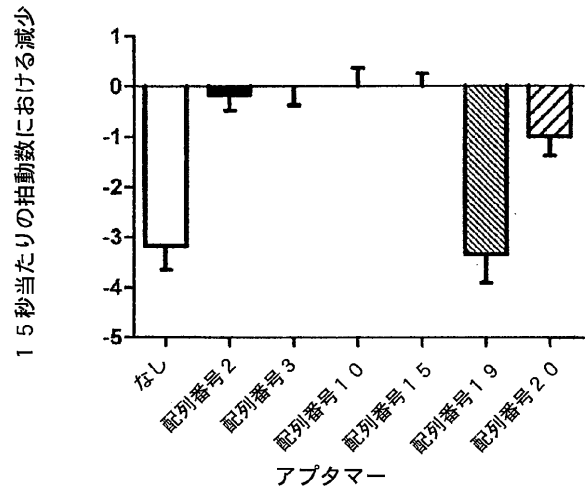


Figure 4

【 図 5 】

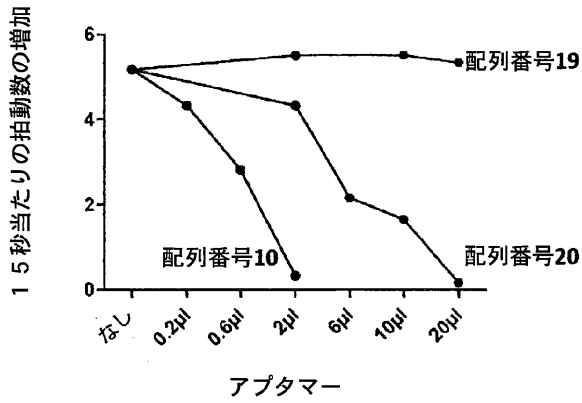


Figure 5

【 図 6 】

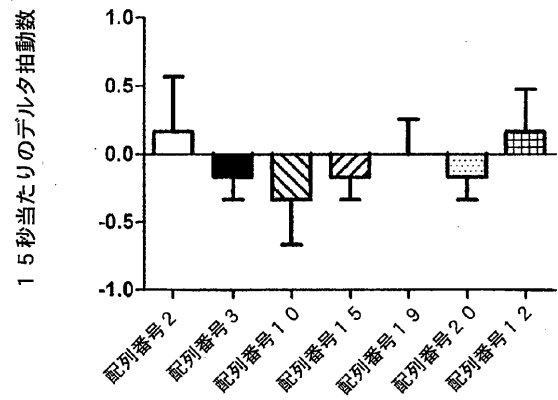


Figure 6

【 図 7 】

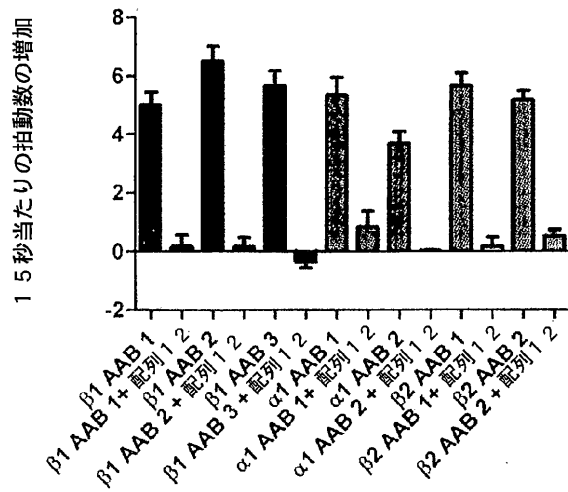


Figure 7

【 図 8 】

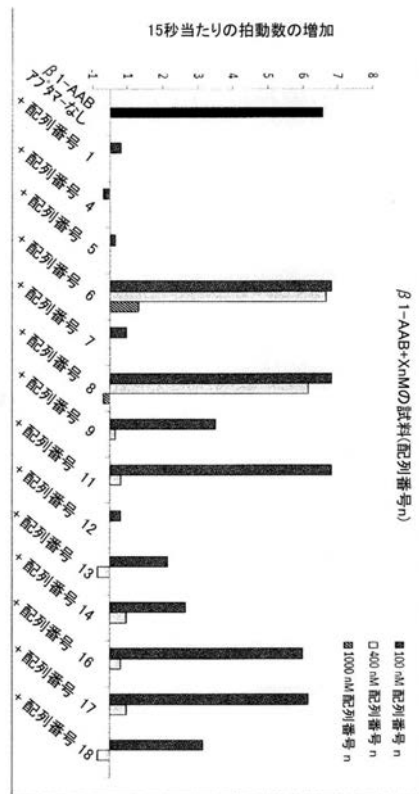


Figure 8

【 図 1 3 】

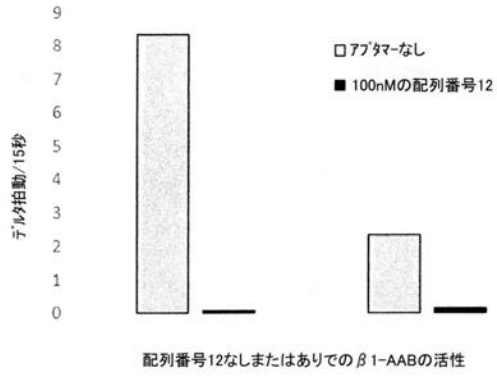


Figure 13

【 図 1 4 】

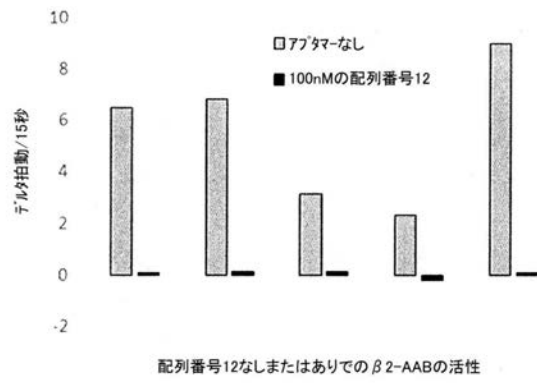


Figure 14

【 図 1 5 】

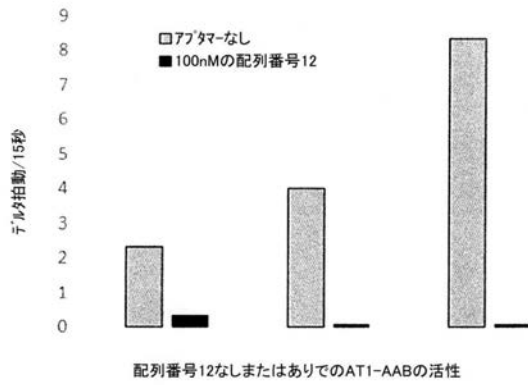


Figure 15

【 図 1 6 】

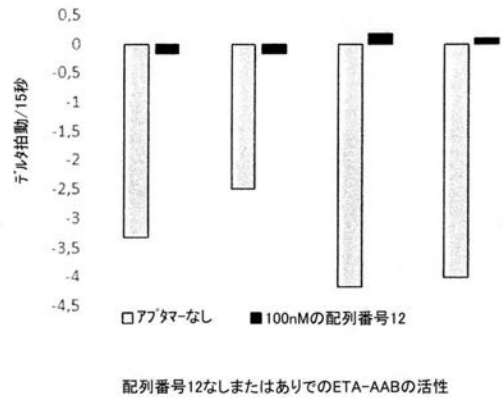


Figure 16

【 図 1 7 】

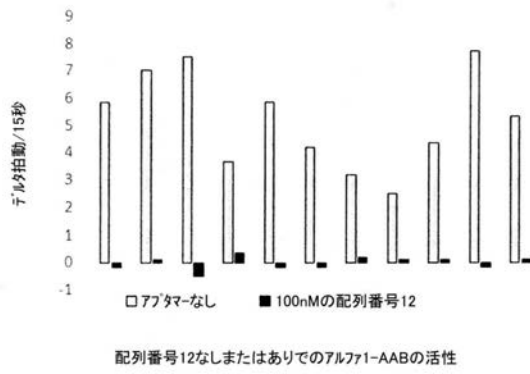


Figure 17

【 図 1 8 】

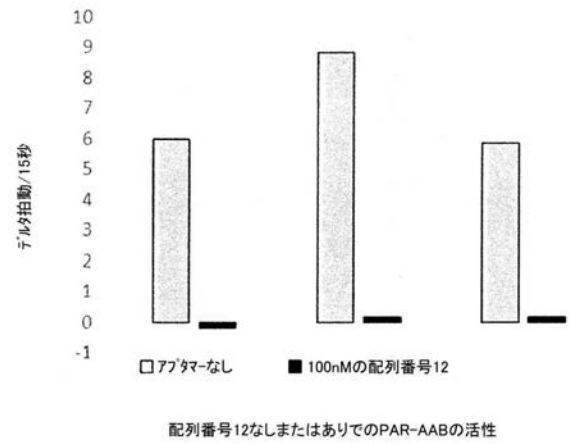


Figure 18

【 図 1 9 】

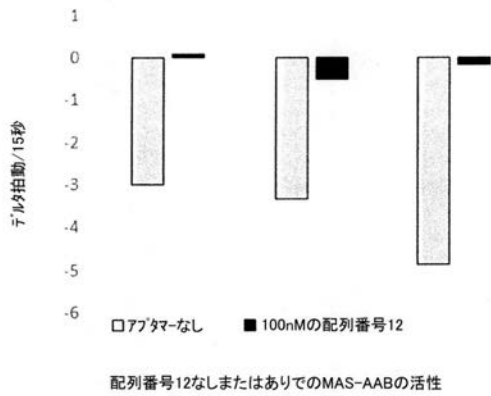


Figure 19

【 図 2 0 】

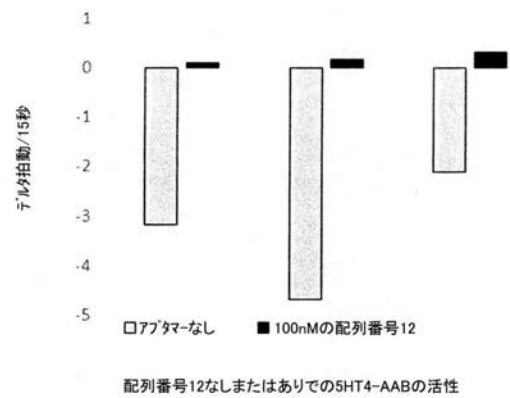


Figure 20

【図 2 1】

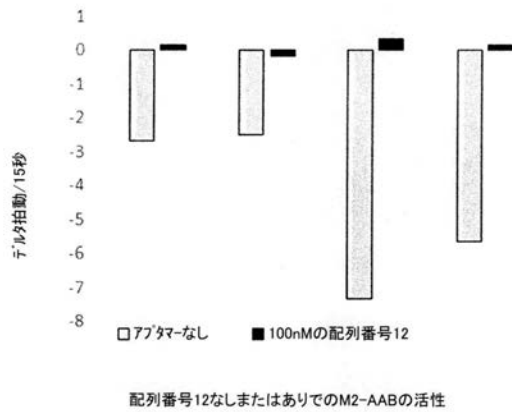


Figure 21

【配列表】

2017529872000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月26日(2017.5.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体に関連する自己免疫疾患の治療における使用のためのアプタマーであって、

a.) Qは、自然数のセットであり、

b.) Fは、

$$F := \{ X \quad Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c.) Fを使用して、

【数 1】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

と定義され、

d.) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c.) の通りであり、

e.) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

と定義される 1 セットの終端であり、

ここで G^X は、b.) 及び c.) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f.) S U は、開始記号である

という条件での、生成規則 P のセット：

P = {

S	M Y D E H	(1)
M	NR M	(2)
M	MR	(3)
M	RM	(4)
N	M	(5)
D	YM	(6)
E	VM	(6 a)
Y	K KL LK LKL	(7)
H	LV V	(8)
R	L	(9)
Z	A C G T	(1 0)
L	ZL Z	(1 1)
BX	G^X	(1 2)
CX	BXL BX	(1 3)
M	CXLCX	(1 4)
K	CXL BX	(1 5)
V	CXL	(1 6)

}

によって定義される文法を満たすヌクレオチド配列を含み、

式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が DNA 配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が RNA 配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、

前記アプタマーが、ヌクレオチド配列 GGTTGGTGTGGTTGG (配列番号 2 2)、GGTTGGTGTGGT (配列番号 2 3) 又は CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG (配列番号 2 4) を含まず、

前記アプタマーが、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体が検出できる患者の治療に使用され、

前記ヌクレオチド配列が、最大で 5 9 3 ヌクレオチドの長さを有する、

ことを特徴とするアプタマー。

【請求項 2】

G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体とその標的タンパク質との相互作用を阻害するために使用される、請求項 1 に記載のアプタマー。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列が、DNA 配列であるか、又はヌクレオチド配列が RNA 配列である、請求項 1 又は 2 に記載のアプタマー。

【請求項 4】

前記アプタマー内に含まれるヌクレオチド配列が、以下の配列、

(5 ' - G T T G T T T G G G G T G G - 3 ' 配列番号 1)、

(5 ' - G T T G T T T G G G G T G G T - 3 ' 配列番号 2)

(5 ' - G G T T G G G G T G G G T G G G G T G G G T G G G - 3 ' 配列番号 3)

、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G - 3 ' 配列番号 4)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 5)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T T T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 6)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 7)、

(5 ' - T T T G G T G G T G G T G G T T T G G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 8)、

(5 ' - T G G T G G T G G T G G T - 3 ' 配列番号 9)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 10)、

(5 ' - G G T G G T T G T G G T G G - 3 ' 配列番号 11)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 12)、

(5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 13)、

(5 ' - G G T G G T T G T G G T G G T T G T G G T G G T T G T G G T G G - 3 ' 配列番号 14)、

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

(5 ' - G G T G G T G G T G T T G T G G T G G T G G T G G T T T - 3 ' 配列番号 16)、

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

(5 ' - T G G T G G T G G T - 3 ' 配列番号 18)、

(5 ' - T T A G G G T T A G G G T T A G G G T T A G G G (配列番号 20)

のうちのいずれか 1 つである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記アプタマーのヌクレオチド配列が、少なくとも 4 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 8 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 12 ヌクレオチドの長さを有し、かつ/又はアプタマーのヌクレオチド配列が、最大で 120 ヌクレオチド、好ましくは最大で 100 ヌクレオチド、より好ましくは最大で 80 ヌクレオチドの長さを有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 6】

自己抗体、好ましくは、G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体、好ましくは、ヒト G タンパク質共役受容体アドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性

ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体のうちのいずれか 1 つに特異的な自己抗体と相互作用することができる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 7】

G タンパク質共役受容体に対する自己抗体の出現に関連する自己免疫疾患に罹っている患者の血液又はその要素の治療的アフェレーシス中の選択的成分としての使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 8】

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、虚血性心筋症 (i C M)、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、妊娠高血圧腎症、末梢動脈閉塞性疾患 (P A O D)、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス (S L E)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び / 又は先天性心ブロックのうちの 1 つである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 9】

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アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体に特異的な抗体の *in vitro* 検出のための、請求項 1 ~ 6 又は 8 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの使用であって、検出される前記抗体が、自己抗体であることを特徴とする使用。

【請求項 10】

前記抗体が、体液、好ましくは、ヒトの体液、より好ましくは、ヒトの血液、血漿、血清、尿、大便、関節液、間質液、リンパ液、唾液、髄液及び / 又は涙液の中に存在する又はそれに由来する、請求項 9 に記載のアプタマーの使用。

【請求項 11】

前記体液が、自己免疫疾患、好ましくは、G タンパク質共役受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患、より好ましくは、アドレナリン作動性アルファ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 1 受容体、アドレナリン作動性ベータ - 2 受容体、エンドセリン 1 E T A 受容体、ムスカリン M 受容体、アンジオテンシン I I A T 1 受容体、P A R 受容体、M A S 受容体、5 H T 4 受容体及び / 又は M 3 受容体に特異的な自己抗体が患者の血清中に存在することに関連する自己免疫疾患に罹っているか又は罹っている疑いがある個体から採取される、請求項 10 に記載のアプタマーの使用。

【請求項 12】

以下のヌクレオチド配列 (5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 12) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 13】

前記アプタマーが、以下のヌクレオチド配列 (5 ' - G G T G G T G G T G G T T G T G G T G G T G G T G G - 3 ' 配列番号 12) を含む、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの使用。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項で規定される少なくとも 1 種のアプタマーを含み、少なくとも 1 種の薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい医薬組成物であって、

Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体と関連する自己免疫疾患の治療に使用され、前記アプタマーが、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体を検出できる患者の治療に使用されることを特徴とする医薬組成物。

【請求項 15】

Gタンパク質共役受容体に特異的な自己抗体とその標的タンパク質との相互作用を阻害するために使用される前記アプタマーを含む、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

自己免疫疾患の治療における使用のための請求項 1 ~ 8 及び 12 のいずれか 1 項に記載の アプタマーを含むアフエレーシスカラムであって、前記自己免疫疾患が、心筋症、拡張型心筋症 (DCM)、周産期心筋症 (PPCM)、特発性心筋症、虚血性心筋症 (iCM)、シャーガス心筋症、化学療法誘発性心筋症、シャーガス巨大結腸症、シャーガス巨大食道症、シャーガス神経障害、良性前立腺肥大症、強皮症、レイノー症候群、末梢動脈閉塞性疾患 (PAD)、妊娠高血圧腎症、腎同種異系移植片拒絶反応、心筋炎、緑内障、高血圧症、肺高血圧症、悪性高血圧症、メタボリックシンドローム、脱毛症、円形脱毛症、片頭痛、パーキンソン病、癲癇、群発頭痛、多発性硬化症、鬱病、局所痛症候群、不安定狭心症、全身性エリテマトーデス (SLE)、統合失調症、シェーグレン症候群、歯周炎、心房細動、白斑、溶血性尿毒症症候群、スティッフパーソン症候群、及び/又は先天性心ブロックであり、

前記アプタマーが、Gタンパク質共役受容体に対する自己抗体を検出できる患者の治療に使用されることを特徴とする、アフエレーシスカラム。

【請求項 17】

前記アプタマーが、該アプタマーによって特異的に標的化される自己抗体を特異的に分離して取り出すための選択的成分として使用される、請求項 16 に記載の使用のためのアフエレーシスカラム。

【請求項 18】

アプタマーオリゴヌクレオチドを調製するための方法であって、

I) アプタマー配列として使用されるヌクレオチド配列を決定するステップであって、

a.) Q は、自然数のセットであり、

b.) F は、

$$F := \{ X \mid Q \mid (X > 1) \}$$

と定義される自然数のサブセットであり、

c.) F を使用して、

【数 2】

$$(1) \quad \forall X \in F \exists M : M \rightarrow CXL CX$$

$$(2) \quad \forall X \in F \exists K : K \rightarrow CXL BX$$

$$(3) \quad \forall X \in F \exists V : V \rightarrow CXL$$

$$(4) \quad \forall X \in F : CX \rightarrow BXL BX$$

$$(5) \quad \forall X \in F : BX \rightarrow \prod_1^X G$$

と定義され、

d.) U は、

$$U = \{ S, M, N, D, E, Y, H, R, Z, L, BX, CX, K, V \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで BX 及び CX については c.) の通りであり、

e.) W は、

$$W = \{ A, C, G, T, G^X \}$$

と定義される 1 セットの非終端であり、

ここで G^X は、b.) 及び c.) の (5) に従って導き出せるすべての終端を表し、

f.) S U は、開始記号である
 という条件での、以下の生成規則 P のセット :

P = {		
	S	M Y D E H (1)
	M	N R M (2)
	M	M R (3)
	M	R M (4)
	N	M (5)
	D	Y M (6)
	E	V M (6 a)
	Y	K K L L K L K L (7)
	H	L V V (8)
	R	L (9)
	Z	A C G T (1 0)
	L	Z L Z (1 1)
	B X	G ^x (1 2)
	C X	B X L B X (1 3)
	M	C X L C X (1 4)
	K	C X L B X (1 5)
	V	C X L (1 6)
	}	

の適用を含み、式中、「A」はアデニンヌクレオチドを意味し、「C」はシトシンヌクレオチドを意味し、「G」はグアニンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が DNA 配列である場合にはチミンヌクレオチドを意味し、「T」はヌクレオチド配列が RNA 配列である場合にはウラシルヌクレオチドを意味し、

アプタマー配列として使用される前記ヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列 G G T T G G T G T G G T T G G (配列番号 2 2)、G G T T G G T G T G G T (配列番号 2 3) 又は C G C C T A G G T T G G G T A G G G T G G T G G C G (配列番号 2 4) を含まず

アプタマー配列として使用される前記ヌクレオチド配列が、最大で 5 9 3 ヌクレオチドの長さを有するステップと、

I I) ステップ I) で得られた前記ヌクレオチド配列を有するアプタマーオリゴヌクレオチドを作製するステップと、
を含むことを特徴とする方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP2015/067951
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. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/067951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/115 G06F19/00 A61K31/713 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 G06F A61K		
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, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SEARLS DAVID B: "The language of genes", NATURE (LONDON), vol. 420, no. 6912, 14 November 2002 (2002-11-14), pages 211-217, XP002735331, ISSN: 0028-0836 the whole document	1-5, 7-14, 17-24
Y	----- WO 2012/119938 A2 (CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]; MAX DELBRUECK CENTRUM [DE]; SCHIMKE) 13 September 2012 (2012-09-13) cited in the application the whole document ----- -/--	1-24
<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 14 October 2015		Date of mailing of the international search report 28/10/2015
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 Andres, Serge

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/067951

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/61597 A1 (UAB RESEARCH FOUNDATION [US]; MILLER DONALD M [US]; BATES PAULA J [US]) 19 October 2000 (2000-10-19) the whole document -----	1-19
A	WO 2011/133142 A1 (UNIV LOUISVILLE RES FOUND [US]; BATES PAULA J [US]; ISLAM MD ASHRAFUL) 27 October 2011 (2011-10-27) the whole document -----	1-19
A	WO 2012/000889 A1 (CHARITE UNIVERSITAETSMEDIZIN [DE]; MAX DELBRUECK CENTRUM [DE]; APTARES) 5 January 2012 (2012-01-05) cited in the application the whole document -----	1-23
A	SEARLS DAVID B: "Linguistic approaches to biological sequences", CABIOS, vol. 13, no. 4, 1997, pages 333-344, XP002735332, the whole document -----	1-24
A	DAVID CHIANG ET AL: "Grammatical Representations of Macromolecular Structure", JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 13, no. 5, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 1077-1100, XP055165085, the whole document -----	1-24
A	LIU QI ET AL: "RNACompress: Grammar-based compression and informational complexity measurement of RNA secondary structure", BMC BIOINFORMATICS, vol. 9, no. 1, 31 March 2008 (2008-03-31), page 176, XP021031746, ISSN: 1471-2105 the whole document -----	1-23
A	GERD WALLUKAT ET AL: "Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases", SEMINARS IN IMMUNOPATHOLOGY, vol. 36, no. 3, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 351-363, XP055165175, ISSN: 1863-2297, DOI: 10.1007/s00281-014-0425-9 the whole document -----	1-23
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/067951

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GERD WALLUKAT ET AL: "The First Aptamer-Apheresis Column Specifically for Clearing Blood of beta1-Receptor Autoantibodies", CIRCULATION JOURNAL, vol. 76, no. 10, October 2012 (2012-10), pages 2449-2455, XP055165177, ISSN: 1346-9843, DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0212 the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/067951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012119938 A2	13-09-2012	AU 2012224729 A1	24-10-2013
		CA 2828896 A1	13-09-2012
		CN 103608456 A	26-02-2014
		EP 2497828 A1	12-09-2012
		EP 2683826 A2	15-01-2014
		JP 2014509849 A	24-04-2014
		US 2014155466 A1	05-06-2014
		WO 2012119938 A2	13-09-2012
		WO 0061597 A1	19-10-2000
AU 775412 B2	29-07-2004		
AU 4212900 A	14-11-2000		
CA 2370000 A1	19-10-2000		
CY 1106991 T1	26-09-2012		
DE 60036700 T2	24-07-2008		
DK 1181304 T3	11-02-2008		
EP 1181304 A1	27-02-2002		
ES 2296615 T3	01-05-2008		
JP 2002541264 A	03-12-2002		
PT 1181304 E	23-01-2008		
US 7314926 B1	01-01-2008		
US 2009326047 A1	31-12-2009		
WO 0061597 A1	19-10-2000		
WO 2011133142 A1	27-10-2011		
WO 2012000889 A1	05-01-2012	EP 2402016 A1	04-01-2012
		EP 2588115 A1	08-05-2013
		WO 2012000889 A1	05-01-2012

International Application No. PCT/ EP2015/ 067951

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-24

Aptamers against autoantibodies

1.1. claims: 1-14, 17-23(all partially)

An aptamer defined by SEQ ID 1, an apheresis column or a composition comprising it, and their use in the treatment of autoimmune diseases associated with autoantibodies against GPCRs.

1.2. claims: 1-14, 17-23(all partially)

As for subject 1.1, but concerning SEQ IDs 2-11,13-18 and 20 respectively

1.3. claims: 15, 16(completely); 1-14, 17-23(partially)

As for subject 1.1, but concerning SEQ ID 12.

1.4. claim: 24

A method for producing an aptamer.

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 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 30/88	J

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72)発明者 ミュラー ヨハンネス

ドイツ連邦共和国 ベルリン 1 0 7 1 7 ギュントツェルシュトラッセ 6 3

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA22 AA25 AA40 BA13 BB03 CA25 CA26 CB03

CB04 CB07 CB11 DA12 DA36 DA37 FB02 FB05 FB06 FB08

FB12 FB13 FB15 GC12 GC15 JA01

4C084 AA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA081 ZA082 ZA121 ZA122 ZA181 ZA182

ZA331 ZA332 ZA361 ZA362 ZA421 ZA422 ZA661 ZA662 ZA671 ZA672

ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZA921 ZA922 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082

ZC211 ZC212 ZC411 ZC412

4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA08	ZA12
	ZA18	ZA33	ZA36	ZA42	ZA66	ZA67	ZA81	ZA89	ZA92	ZB07
	ZB08	ZC21	ZC41							

专利名称(译)	用于抗自身抗体相关疾病的适体		
公开(公告)号	JP2017529872A	公开(公告)日	2017-10-12
申请号	JP2017526761	申请日	2015-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	BERLIN CURES控股		
[标]发明人	ミュラーヨハネス		
发明人	ミュラー ヨハネス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/115 A61K48/00 A61K31/7088 A61P1/02 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/14 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/08 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/50 G01N33/15 G01N30/88		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/02 A61P3/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/14 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2330/00 G16B99/00 Y02A90/26 G01N33/6854		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.H A61K48/00 A61K31/7088 A61P1/02 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/14 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/16 A61P25/08 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/06 A61P43/00.111 G01N33/53.N G01N33/566 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N30/88.J		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA22 2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/DA12 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC12 2G045/GC15 2G045/JA01 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA081 4C084/ZA082 4C084/ZA121 4C084/ZA122 4C084/ZA181 4C084/ZA182 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA421 4C084/ZA422 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA671 4C084/ZA672 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA921 4C084/ZA922 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZC211 4C084/ZC212 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086/ZA18 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA42 4C086/ZA66 4C086/ZA67 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA92 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZC21 4C086/ZC41		
代理人(译)	田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 山崎 一夫 服部博信		
优先权	2014179715 2014-08-04 EP		
其他公开文献	JP6630356B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于治疗 and/或 诊断与针对G蛋白偶联受体的自身抗体相关的自身免疫疾病的新型适体分子，包含此类适体分子的药物组合物，例如适体分子。本发明涉及一种单采血液分离柱，以及一种确定用作适体分子序列的核苷酸序列的方法。

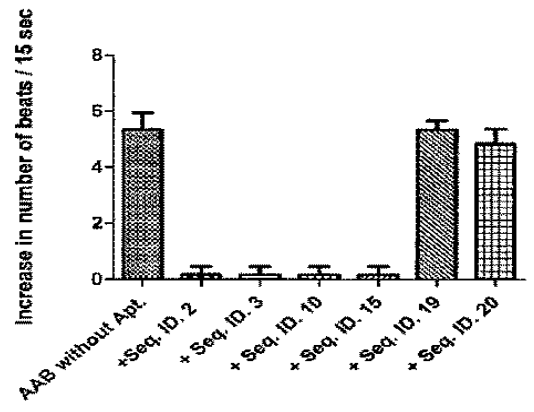


Figure 1