



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I845521 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：108122887

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 28 日

(51)Int. Cl. : C12N15/115 (2010.01)

A61K31/712 (2006.01)

A61P19/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/06/29 日本

2018-124390

(71)申請人：日商力博美科股份有限公司 (日本) RIBOMIC INC. (JP)

日本

(72)發明人：中村義一 NAKAMURA, YOSHIKAZU (JP) ; 秋田一雅 AKITA, KAZUMASA

(JP) ; 阿里 優素福 ALI, YUSUF (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 106103719A

WO 2015200539A1

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：0 共 38 頁

(54)名稱

適配體製劑

(57)摘要

本發明提供能長期安定保持適配體(尤其是針對 FGF2 之適配體)之活性的製劑處方，再者，提供以適配體(尤其是 FGF2 適配體)作為有效成分之醫藥製劑。

The present invention provides a pharmaceutical formulation that can stably maintain the activity of an aptamer, particularly an aptamer against FGF2, over a long period of time, and provides a pharmaceutical formulation containing an aptamer, particularly an FGF2 aptamer as an active ingredient.

I845521

【發明摘要】

【中文發明名稱】 適配體製劑

【英文發明名稱】 APTAMER FORMULATION

【中文】

本發明提供能長期安定保持適配體(尤其是針對 FGF2 之適配體)之活性的製劑處方，再者，提供以適配體(尤其是 FGF2 適配體)作為有效成分之醫藥製劑。

【英文】

The present invention provides a pharmaceutical formulation that can stably maintain the activity of an aptamer, particularly an aptamer against FGF2, over a long period of time, and provides a pharmaceutical formulation containing an aptamer, particularly an FGF2 aptamer as an active ingredient.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

本案無圖式

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 適配體製劑

【英文發明名稱】 APTAMER FORMULATION

【技術領域】

【0001】 本發明係關於適配體製劑，尤其是以針對鹼性纖維母細胞增殖因子(FGF2)之適配體作為有效成分的適配體製劑。

【先前技術】

【0002】 近年，對 RNA 適配體之治療藥、診斷藥、試藥的應用受到矚目，有幾個 RNA 適配體正進入臨床階段或實用化階段。2004 年 12 月，世界上首次的 RNA 適配體醫藥的 Macugen(註冊商標)(一般名：哌加他尼(pegaptanib)鈉)係以作為老年性黃斑變性症之治療藥而被美國許可，在日本亦於 2008 年 7 月獲得許可。Macugen(註冊商標)係以針對 VEGF 之適配體作為活性本體。該適配體係由包含 28 個核酸分子之合成寡核苷酸所構成，在其 5' 末端與聚乙二醇(PEG)衍生物結合。

【0003】 Macugen(註冊商標)之劑型為預裝填注射器的注射劑，係注射至玻璃體內。其為無色至略為著色之澄清水性注射液，添加有磷酸氫鈉、磷酸二氫鈉、等張化劑及 pH 調整劑。藉由此製劑處方，在 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 之加速試驗中經過 6 個月、或於 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 之長期保存試驗下經過 36 個月，均顯示安定地存在(非專利文獻 1)。

【0004】 另一方面，在本案提出申請之時間點，除了 Macugen(註冊商標)以外，尚無以適配體作為有效成分之醫藥品存在，亦全然不知適配體製劑是以何種製劑處方為適宜。

【0005】 申請人以針對 FGF2 之適配體作為有效成分，開發以老年黃斑變性症、軟骨發育不全症、或癌性疼痛作為適應症的醫藥品(專利文獻 1 及 2)。本發明人等在 FGF2 適配體製劑之開發過程中，以被認為與 Macugen(註冊商標)大致相同之製劑處方、或以磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)作為介質之製劑處方，得到所謂「無法維持 FGF2 適配體之活性」的結果。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】

[專利文獻 1]國際公開第 2011/099576 號

[專利文獻 2]國際公開第 2015/147017 號

[非專利文獻]

【0007】

[非專利文獻 1]醫藥品訪談表格，老年黃斑變性症治療劑 Macugen(註冊商標)玻璃體內注射用套組 0.3mg，2015 年 3 月(改訂第 5 版)

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0008】 因此，本發明之目的係提供能長期安定地保持適配體(尤其是針對 FGF2 之適配體)之活性的製劑處方，再者，提供以適配體(尤其是 FGF2 適配體)作為有效成分的醫藥製劑。

[用於解決課題之手段]

【0009】 本發明人等為達成上述之目的而重覆專心檢討的結果，成功地發現 FGF2 適配體之最佳製劑條件，於是完成本發明。

【0010】 亦即，本發明提供下述者。

[1]一種水性液劑，係含有： 與 FGF2 結合之適配體或其鹽、以及作為非電解質之滲透壓調整劑；其中，該適配體或其鹽為長期安定者。

[2]如[1]記載之水性液劑，其中，除了前述適配體或其鹽以外，實質上不含電解質。

[3]如[1]或[2]記載之水性液劑，其中，前述適配體係包含下式(1)所示之核苷酸序列，



其中， N^1 及 N^6 各自獨立地表示 0 至複數個任意鹼基， N^2 、 N^3 、 N^4 及 N^5 各自獨立地表示 1 個任意鹼基，惟尿嘧啶亦可為胸腺嘧啶；

並且，前述適配體為下述 (a)或(b)之任一者，

(a)在該適配體所含之核苷酸中，

(i)各嘧啶核苷酸之核糖之 2'位為氟原子，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖之 2'位為羥基者；

(b)在該(a)之適配體中，

- (i) 各嘧啶核苷酸之核糖之 2'位的氟原子各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換，並且
- (ii) 各嘌呤核苷酸之核糖之 2'位的羥基各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、甲氧基及氟原子所構成之群組中的原子或基置換者。

[4]如[1]或[2]記載之水性液劑，其中，前述適配體係包含下式(3)所示的核苷酸序列，



其中， N^1 及 N^{62} 各自獨立地表示 0 至複數個任意鹼基。

[5]如[1]或[2]記載之水性液劑，其中，前述適配體係包含序列編號 3、8、9、10 或 12 所示的任一種核苷酸序列。

[6]如[1]至[5]中任一項記載之水性液劑，其中，適配體之濃度為 1 至 60mg/mL。

[7]如[1]至[6]中任一項記載之水性液劑，其中，滲透壓調整劑之調配比率為水性液劑總量的 2 至 7.5%(w/v)。

[8]如[1]至[7]中任一項記載之水性液劑，其中，滲透壓調整劑為甘露醇。

[9]如[8]記載之水性液劑，其中，相對於 1mg 之適配體，以 1 至 50mg 之比率含有甘露醇。

[10]如[1]至[9]中任一項記載之水性液劑，其係於 5°C 以下保存。

[11]如[1]至[10]中任一項記載之水性液劑，其於 4°C 保存 3 個月後的單體適配體的比率為 80%以上。

[12]如[1]至[11]中任一項記載之水性液劑，其為注射劑。

[13]如[1]至[12]中任一項記載之水性液劑，其係用於伴隨血管新生之疾病、骨/軟骨疾病或疼痛的預防或治療。

[14]一種伴隨血管新生之疾病、骨/軟骨疾病或疼痛的預防或治療方法，其包含將[1]至[12]中任一項記載之水性液劑投予至對象。

[15]如[1]至[12]中任一項記載之水性液劑，其係為了預防或治療伴隨血管新生之疾病、骨・軟骨疾病或疼痛而使用者。

[發明之效果]

【0011】若依照本發明，由於能將作為有效成分的針對 FGF2 之適配體或其鹽以水性液劑之形態長期安定地保存，因此可提供操作容易的適配體製劑。

【實施方式】

【0012】本發明提供以針對 FGF2 之適配體或其鹽作為有效成分且可將該適配體或其鹽長期安定保持的醫藥製劑(以下，亦稱為「本發明之適配體製劑」)。其中，所謂「長期安定」意指在玻璃瓶中封入該製劑並於 4℃ 保存 3 個月後的單體適配體之比率為 70%以上。單體適配體之比率，係使用尺寸排除層析法(size exclusion chromatography)，依照以下之條件，將單體及多聚體予以分離/檢測而算出(單體之峰面積)/(單體及多聚體之峰面積之和)×100(%)的值。

裝置：Waters 公司製 ACQUITY UPLC H-Class Bio

檢測器：Waters 公司製 TUV 檢測器

管柱：Waters 公司製 ACQUITY UPLC BEH200 SEC 管柱

樣本濃度：0.2mg/mL

注入量：5μL

溶離液：10%乙腈/PBS

流速：0.3mL/分鐘

管柱溫度：25°C

本發明之適配體製劑係含有：作為有效成分的針對 FGF2 之適配體或其鹽、以及作為非電解質之滲透壓調整劑。

【0013】 適配體意指對預定之標的分子具有結合活性的核酸分子。適配體藉由結合於預定之標的分子，可阻礙該標的分子之活性。作為本發明之適配體製劑之有效成分的適配體，為對於 FGF2 具有結合活性的適配體。在較佳之實施態樣中，該適配體為能與 FGF2 結合而阻礙 FGF2 與 FGF 受體結合的適配體。亦即，該適配體具有對 FGF2 之阻礙活性。

【0014】 本發明中所用的適配體為與 FGF2 結合之適配體，更佳者為能與 FGF2 結合而阻礙 FGF2 與 FGF 受體之結合的適配體。本發明中所用的適配體是否能阻礙 FGF2 與 FGF 受體之結合，可藉由利用例如實施例 1 等之表面電漿子共振法的試驗而評價。

【0015】 針對 FGF2 之適配體係無特別限制，例如為國際公開第 2015/147017 號記載之適配體，具體而言，該適配體係包含下式(1)所表示之核苷酸序列，惟尿嘧啶亦可為胸腺嘧啶，



並且，該適配體為下述(a)或(b)之任一者，

(a)在該適配體所含之核苷酸中，

(i)各嘧啶核苷酸之核糖的 2'位為氟原子，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖的 2'位為羥基者；

(b)在該(a)之適配體中，

- (i) 各嘧啶核苷酸之核糖之 2' 位的氟原子各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換，並且
- (ii) 各嘌呤核苷酸之核糖之 2' 位的羥基各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、甲氧基及氟原子所構成之群組中的原子或基置換者。

【0016】 上述式(1)中， N^1 及 N^6 各自獨立地表示 0 至複數個任意鹼基， N^2 、 N^3 、 N^4 及 N^5 獨立地表示 1 個任意鹼基。在本說明書中「鹼基」意指構成核酸的腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)或胸腺嘧啶(T)之任一種。

N^1 之鹼基數，只要包含式(1)所示之核苷酸序列的適配體可與 FGF2 結合，將無特別限定，例如，可為 0 至約 10 個、0 至 9 個、0 至 8 個、0 至 7 個、0 至 6 個、0 至 5 個、0 至 4 個、0 至 3 個、0 至 2 個等，較佳為 0 至 2 個。

關於 N^6 之鹼基數，亦與 N^1 同樣地無特別限定，例如，可為 0 至約 10 個、0 至 9 個、0 至 8 個、0 至 7 個、0 至 6 個、0 至 5 個、0 至 4 個、0 至 3 個等，較佳為 0 至 10 個、3 至 9 個、或 5 至 8 個。

【0017】 在較佳之實施態樣中，上述式(1)中，

N^1 為 G、GG、AG、C 或空白，

N^2 為 A 或 U，

N^3 為 G、C 或 A，

N^4 為 G、C 或 U，

N^5 為 G 或 U，

N^6 為 $UUCN^{61}$ 或 $AGUCN^{62}$ (式中， N^{61} 及 N^{62} 各自獨立地為 0 至複數個任意鹼基)。其中， N^1 為「空白」時係意指式(1)中 N^1 不存在，亦即 N^1 為 0 個鹼基。

N^{61} 之鹼基數係無特別限定，例如，可為 0 至約 10 個、0 至 7 個、0 至 6 個、0 至 5 個、0 至 4 個等，較佳可為 0 至 5 個、1 至 5 個、或 2 至 4 個。

關於 N^{62} 之鹼基數，亦無特別限定，例如，可為 0 至約 10 個、0 至 7 個、0 至 5 個、0 至 4 個、0 至 3 個等，較佳可為 0 至 5 個、0 至 4 個、或 0 至 3 個。

【0018】 在其他較佳實施態樣中，上述式(1)中，

N^1 為 G、GG、AG 或空白，

N^2 為 A 或 U，

N^3 為 G 或 A，

N^4 為 C 或 U，

N^5 為 G 或 U，

N^6 為 $UUCN^{61}$ 或 $AGUCN^{62}$ (式中， N^{61} 及 N^{62} 與上述同義)。

【0019】 在較佳之實施態樣中，本發明中所用的適配體係包含下式(2)或(3)所示之核苷酸序列，更佳為包含式(3)所示之核苷酸序列，



式中， N^1 、 N^{61} 及 N^{62} 與前述同義。

【0020】 在較佳之實施態樣中，本發明中所用的適配體係包含序列編號 1 至 12 之任一項所表示的核苷酸序列。以下，展示序列編號 1 至 12 所示之核苷酸序列(惟尿嘧啶亦可為胸腺嘧啶)。以下，A、G、C 及 U 分別表示核苷酸之鹼基為腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶及尿嘧啶。

序列編號 1：



序列編號 2：

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCUCGA

序列編號 3：

GGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCCC

序列編號 4：

GGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCC

序列編號 5：

GGGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCCCC

序列編號 6：

AGGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCCC

序列編號 7：

GGGAAACUAGGGCGUUAACGUGACCAGUGUUUCCC

序列編號 8：

CGGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCCG

序列編號 9：

CCGAUACUAGGGCAUUA AUGUUACCAGUGUAGUCGG

序列編號 10：

GGGAUACUAGGGCGUUAACGUUACCAGUGUAGUCCC

序列編號 11：

GGGAUACUAGGGCCUUAAGGUUACCAGUGUAGUCCC

序列編號 12：

GGGAUACUAGGGCAUUUAUGUUACCAGUGUAGUCCC

在較佳之一實施態樣中，本發明中所用的適配體係包含序列編號 1、3、4、5、6、8、9、10 或 12，更佳為包含序列編號 3、8、9、10 或 12 所示之核苷酸序列。

在其他較佳之實施態樣中，本發明中所用的適配體係包含序列編號 2 或 7 所示之核苷酸序列(包含於上述式(2))。

在進一步其他較佳之實施態樣中，本發明中所用的適配體係包含序列編號 1、3、4、5、6 或 8 所示之核苷酸序列(包含於上述式(3))。

【0021】 在一實施態樣中，本發明中所用的適配體，可包含在上述任一核苷酸序列中之 1 或複數個核苷酸被置換、刪除、插入或附加而成的核苷酸序列，只要其依然能與 FGF2 結合，亦即該適配體可為下述(a)或(b)中之任一者：

(a)在該適配體所含之核苷酸中，

(i)各嘧啶核苷酸之核糖的 2'位為氟原子，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖的 2'位為羥基者；

(b)在該(a)之適配體中，

(i) 各嘧啶核苷酸之核糖之 2'位的氟原子各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖之 2'位的羥基各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、甲氧基及氟原子所構成之群組中的原子或基置換者。

【0022】 其中，上述置換、刪除、插入或附加之核苷酸數，只要在置換、刪除、插入或附加後依然能與 FGF2 結合，將無特別限定，可為例如 1 至約 10 個，較佳為 1 至 6 個，更佳為 1 至 5 個，進一步更佳為 1 至 4 個，再進一步更佳為 1 至 3 個、最佳為 1 個或 2 個。核苷酸被置換、刪除、插入或附加之部位，亦

只要在置換、刪除、插入或附加後依然能與 FGF2 結合，將無特別限定，不過在上述式(1)、(2)及(3)中，在以 1 種核苷酸(亦即，A、G、C 或 U)所特定的部位，係於 1 至 3 處(較佳為 1 或 2 處，更佳為 1 處)進行核苷酸置換、刪除、插入或附加。另一方面，式(1)、(2)及(3)中，於可採取複數種核苷酸之部位(亦即，N¹、N²、N³、N⁴、N⁵、N⁶、N⁶¹ 或 N⁶²)，亦容許更多核苷酸(例如 1 至約 10 個，較佳為 1 至 6 個，更佳為 1 至 5 個，進一步更佳為 1 至 4 個)之置換、刪除、插入或附加。例如，若將以序列編號 3 表示之核苷酸序列作為原始序列，則序列編號 1 為序列編號 3 之 3' 末端之 CC 被 UCGA 置換者，序列編號 4 為序列編號 3 之兩末端分別各刪除 1 核苷酸者，序列編號 5 為分別在序列編號 3 之 5' 末端附加 G 並在 3' 末端附加 C 者，序列編號 6 為序列編號 3 之 5' 末端附加 A 者，序列編號 8 為分別將序列編號 3 之 5' 末端之 G 置換為 C 並將 3' 末端之 C 置換為 G 者，序列編號 9 為分別將序列編號 3 之 5' 末端之 GG 置換為 CC 並將 3' 末端之 CC 置換為 GG 者，序列編號 10 為分別將序列編號 3 之 14 號的 A 置換為 G 並將 19 號之 U 置換為 C 者，序列編號 12 為將序列編號 3 之 17 號的 A 置換為 U 者。

【0023】本發明中所用的適配體之長度無特別限定，通常可為約 10 至約 200 個核苷酸，例如，可為約 20 個核苷酸以上(例如 25 個核苷酸以上、30 個核苷酸以上、31 個核苷酸以上、32 個核苷酸以上、33 個核苷酸以上)，較佳為 25 個核苷酸以上，更佳為 30 個核苷酸以上，進一步更佳為 33 個核苷酸以上。此外，例如，可為約 100 個核苷酸以下，通常為約 80 個核苷酸以下，較佳為約 70 個核苷酸以下，更佳為約 60 個核苷酸以下，進一步更佳為約 50 個核苷酸以下，再進一步更佳為約 45 個核苷酸以下(例如 44 個核苷酸以下、43 個核苷酸以下、42 個核苷酸以下、41 個核苷酸以下、40 個核苷酸以下)。若總核苷酸數少，則更

容易進行化學合成及大量生產，且成本方面之優點亦大。另外，可認為化學修飾亦容易，活體內安定性亦高，毒性亦低。

因此，就本發明中所用的適配體之長度而言，通常可為約 10 至約 200 個核苷酸，較佳為 20 至 80 個核苷酸，更佳為 25 至 60 個核苷酸，進一步更佳為 25 至 50 個核苷酸，最佳為 30 至 45 個核苷酸。

【0024】此外，本發明中所用的適配體可為選自由「包含上述式(1)所示之核苷酸序列之適配體(適配體(A))的複數個連結物」、「包含在上述式(1)所示之核苷酸序列中 1 或複數個核苷酸被置換、刪除、插入或附加之核苷酸序列之適配體(適配體(B))的複數個連結物」、以及「由 1 或複數個適配體(A)與 1 或複數個適配體(B)所成之連結物」所構成之群組中的連結物。此等連結物亦可與 FGF2 結合。

其中，連結可藉由串聯結合而進行。此外，連結時亦可利用連接子(linker)。就連接子而言，可列舉核苷酸鏈(例如 1 至約 20 個核苷酸)、非核苷酸鏈(例如-(CH₂)_n-連接子、-(CH₂CH₂O)_n-連接子、六聚乙二醇連接子、TEG 連接子、包含肽之連接子、包含-S-S-鍵之連接子、包含-CONH-鍵之連接子、包含-OPO₃-鍵之連接子)。上述複數個連結物中之複數個只要為 2 個以上，即無特別限定，例如可為 2 個、3 個或 4 個。

【0025】本發明中所用的適配體所含之各核苷酸，可分別相同或相異，可為在核糖(例如嘧啶核苷酸之核糖、嘌呤核苷酸之核糖)之 2'位中含有羥基之核苷酸(亦即，天然之核糖核苷酸)，或可為在核糖之 2'位中羥基被任意之原子或基置換(修飾)的核苷酸(在本說明書中，有時被記載為「修飾核苷酸」)。

【0026】就此等任意之原子或基而言，例如，可列舉氫原子、氟原子或-O-烷基(例如-O-Me 基)、-O-醯基(例如-O-CHO 基)、胺基(例如-NH₂ 基)。此外，本發明中所用的適配體中，至少 1 種(例如 1、2、3 或 4 種)核苷酸可為在核糖之 2' 位中包含上述之任意之原子或基(例如選自由氫原子、氟原子、羥基及-O-Me 基所構成之群組中的至少 2 種(例如 2、3 或 4 種)基)的修飾核苷酸。

【0027】另外，本發明中所用的適配體中，全部的嘧啶核苷酸可皆為核糖之 2' 位為氟原子的核苷酸，或者是該氟原子可相同或相異地未被置換或被上述之任意之原子或基(較佳為選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基)置換的核苷酸。尤其，就本發明中所用的適配體之製造方法而言，當採取使用 DuraScribe™ T7 Transcription Kit(Epicentre 公司製)之製造方法時，可得到全部的嘧啶核苷酸之核糖 2' 位皆氟化的適配體。氟原子被其他上述原子或基置換之適配體，可依照後述之方法製造。

【0028】此外，在本發明中所用的適配體中，全部的嘌呤核苷酸可皆為核糖之 2' 位為羥基的核苷酸，或者是該羥基可相同或相異地未被置換或被上述之任意之原子或基(較佳為選自由氫原子、甲氧基及氟原子所構成之群組中的原子或基)置換之核苷酸。羥基被其他上述原子或基置換之適配體，可依照後述之方法製造。

【0029】另外，本發明中所用的適配體中，全部的嘧啶核苷酸可皆為核糖之 2' 位的氟原子被上述之任意之原子或基(例如選自由氫原子、羥基及-O-Me 基所構成之群組中的相同的原子或基)置換之核苷酸。

再者，本發明中所用的適配體中，全部的嘌呤核苷酸可皆為核糖之 2' 位的羥基被上述之任意之原子或基(例如選自由氫原子、氟原子及-O-Me 基所構成之群組中的相同的原子或基)置換之核苷酸。

【0030】 在較佳之實施態樣中，本發明中所用的適配體所含之各嘧啶核苷酸皆為核糖之 2' 位中含有氟原子的核苷酸，且各嘌呤核苷酸皆為核糖之 2' 位中含有羥基的核苷酸。在其他實施態樣中，上述各嘧啶核苷酸之核糖之 2' 位的氟原子可各自獨立地被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換，且上述各嘌呤核苷酸之核糖的 2' 位之羥基可各自獨立地被選自由氫原子、甲氧基及氟原子構成之群組的原子或基置換。

【0031】 再者，在本說明書中，雖然將構成適配體之核苷酸假設為 RNA(亦即將糖基假設為核糖)來說明對核苷酸中之糖基修飾的態樣，然而，此並非意指欲將 DNA 從構成適配體之核苷酸中排除，亦可改解讀為對 DNA 作適宜的修飾。例如，在構成適配體之核苷酸為 DNA 之情況下，「將核糖之 2' 位之羥基置換成 X」可改解讀為「將去氧核糖之 2' 位的氫原子置換成 X」。

在本發明中所用的適配體中，藉由將尿嘧啶置換為胸腺嘧啶，可提高對 FGF2 之結合性、FGF2 與 FGF 受體之結合阻礙活性、適配體之安定性、藥物送達性、血液中之安定性等。

【0032】 此外，在本發明中所用的適配體中，核苷酸中之磷酸二酯鍵之 1 或複數個(例如，1 至 2 個、1 至 3 個、1 至 4 個、1 至 5 個)核苷酸可被任意之置換基修飾或置換。例如，磷酸二酯鍵可被置換成硫代磷酸酯(phosphorothioate)鍵、二硫代磷酸酯(phosphorodithioate)鍵、烷基磷酸酯鍵、胺基磷酸酯(phosphoroamidate)鍵等。其中，例如「核苷酸被置換成硫代磷酸酯鍵」意指為在

鄰接的核苷酸之間之鍵結部位的磷酸基被硫化，亦即表示磷酸二酯鍵被改變為硫代磷酸酯鍵。

【0033】 另外，在本發明中所用的適配體中，為了將適配體安定化並使其活性提高，可將 1 或複數個(例如，1 至 2 個、1 至 3 個、1 至 4 個、1 至 5 個)核苷酸以架橋化核酸(Bridged Nucleic Acid(BNA)或鎖核酸 (Locked Nucleic Acid(LNA)))置換。其中，「架橋化核酸」意指將核酸之自由度藉由分子內架橋來拘束，而提高對互補序列之結合親和性，且保持獲得核酸酶耐性之構造者，例如，可列舉 2',4'-BNA(LNA)、2'-O,4'-C-伸乙基-架橋化核酸(ENA)等，惟不受此等限定。

【0034】 本發明中所用的適配體，為了提高對 FGF2 之結合性、安定性、藥物送達性等，亦可為各核苷酸之糖殘基(例如核糖)被修飾者。就糖殘基中被修飾之部位而言，例如，可列舉將糖殘基之 2'位、3'位及/或 4'位之氧原子置換為其他原子者等。就修飾之種類而言，例如，可列舉氟化、O-烷基化(例如 O-甲基化、O-乙基化)、O-烯丙基化、S-烷基化(例如 S-甲基化、S-乙基化)、S-烯丙基化、胺基化(例如-NH₂)。另外，可列舉將 4'位之氧置換為硫的 4'-SRNA、將 2'位及 4'位經由亞甲基而架橋之 LNA(鎖核酸)、將 3'位之羥基置換為胺基之 3'-N-胺基磷酸酯核酸等例子。本發明中所用的適配體，視其製造方法而有將嘧啶核苷酸之核糖 2'位的氧原子進行一定之修飾而製造的情況，例如，在採取使用 DuraScribe™T7 Transcription Kit(Epicentre 公司製)之製造方法的情況下，較佳為製造全部的嘧啶核苷酸之核糖 2'位經氟化的適配體。因此，藉由對所得到之適配體隨後施加此種糖殘基之改變，可製造鹼基序列相同但活性提高的各種變異之適配體。依據以上之說明，本發明中所用的適配體較佳可為至少一個核苷酸之

糖殘基被修飾的適配體。此種糖殘基之改變可藉由本身周知之方法進行(例如請參照 Sproat et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 733-738; Cotton et al., (1991), Nucl. Acid. Res. 19, 2629-2635; Hobbs et al., (1973), Biochemistry 12, 5138-5145)。具體而言，以全部嘧啶核苷酸之核糖 2' 位的羥基均被置換為氟之適配體為基礎，可製造將核糖 2' 位之羥基被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換之適配體。

【0035】此外，本發明中所用的適配體，為了提高對 FGF2 之結合性、多聚體化之防止、安定性、藥物送達性等，亦可為將核酸鹼基(例如嘌呤、嘧啶)改變(例如化學性置換)者。就此種改變而言，例如，可列舉 5 位嘧啶改變、6 及/或 8 位嘌呤改變、藉由環外胺之改變、藉由 4-硫代尿苷之置換、藉由 5-溴或 5-碘-尿嘧啶之置換。另外，為了能對核酸酶及水解具有耐性，亦可將本發明中所用的適配體所含之磷酸基改變。例如， $P(O)O$ 基亦可被 $P(O)S$ (硫代)、 $P(S)S$ (二硫代)、 $P(O)N(R)R'$ (醯胺化)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR$ 、 CO 或 CH_2 (甲縮醛)或 3'-胺($-NH-CH_2-CH_2-$)置換[其中各個 R 或 R' 獨立地為 H ，或者是經取代或未經取代之烷基(例如甲基、乙基)]。

就連結基而言，可例示-O-、-N-或-S-，經由此等連結基，可與鄰接之核苷酸結合。

此外，所謂改變可包含如封端(capping)的 3' 及 5' 之改變。

【0036】就改變而言，可進一步藉由將聚乙二醇(PEG)、胺基酸、肽、反向 dT (inverted dT)、核酸、核苷、肉豆蔻醯基、石膽酸-油基(Lithocolic-oleyl)、二十二醯基(Docosanyl)、月桂醯基、硬脂醯基、棕櫚醯基、油醯基、亞麻油醯基(Linoleoyl)、其他脂質、類固醇、膽固醇、咖啡因、維生素、色素、螢光物質、

抗癌劑、毒素、酵素、放射性物質、生物素等附加於末端而進行。關於此種改變，例如請參照美國專利第 5,660,985 號及第 5,756,703 號。

【0037】 尤其，在藉由 PEG 之末端附加而進行改變的情況下，PEG 之分子量無特別限定，惟較佳為 1000 至 100000，更佳為 30000 至 90000。PEG 可為直鏈狀，亦可為分枝成二個以上之鏈者(多臂 PEG)。PEG 之末端附加係有用於防止後述的適配體之多聚體化。

就此種 PEG 而言，無特別限定，若為本發明所屬技術領域中具有通常知識者，可適宜選擇市售或周知之 PEG 而使用(例如請參照 http://www.peg-drug.com/peg_product/branched.html)，就適合本發明中所用之適配體的 PEG 之較佳例而言，具體言之，可列舉分子量 40000 之 2 分枝 GS 型 PEG(SUNBRIGHT GL2-400GS 日油製)、分子量 40000 之 2 分枝 TS 型 PEG(SUNBRIGHT GL2-400TS 日油製)、分子量 40000 之 4 分枝 TS 型 PEG(SUNBRIGHT GL4-400TS 日油製)、分子量 80000 之 2 分枝 TS 型 PEG(SUNBRIGHT GL2-800TS 日油製)、或分子量 80000 之 4 分枝 TS 型 PEG(SUNBRIGHT GL4-800TS 日油製)等。

【0038】 在此情況下，本發明中所用的適配體中，PEG 雖可直接附加於末端，但較佳係於其末端附加具有可與 PEG 結合之基的连接子等，再經由該连接子，將 PEG 附加於本發明中所用的適配體。

【0039】 就 PEG 與本發明中所用的適配體之连接子而言，無特別限定，可依據結合部位或 PEG 之種類等而適宜選擇碳鏈數或官能基等。就此種连接子而言，可列舉如具有胺基之连接子，具體而言，在附加於 5'末端之情況下可例示 ssH Linker (SAFC)或 DMS(O)MT-AMINO-MODIFIER (GLENRESEARCH)，在附加於 3'末端之情況下可例示 TFA Amino C-6 lcaa CPG(ChemGenes)等。在選擇此

連接子之情況下，對於 PEG，例如藉由附加 N-羥基琥珀醯亞胺之活性基並使其與連接子側之胺基進行反應，而可將本發明中所用的適配體與 PEG 藉由連接子而結合。

【0040】再者，就 PEG 或連接子而言，較佳係可使用市售者。此外，關於 PEG、連接子及本發明中所用的適配體之結合的反應條件等，若為本發明所屬技術領域中具有通常知識者，即可適宜設定。

【0041】就本發明中所用的適配體之更佳實施態樣而言，包含序列編號 3 所表示之核苷酸序列的適配體 ID1：

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

包含序列編號 8 所表示之核苷酸序列的適配體 ID2：

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

包含序列編號 9 所表示之核苷酸序列的適配體 ID3：

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

包含序列編號 10 所表示之核苷酸序列的適配體 ID4：

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

包含序列編號 12 所表示之核苷酸序列的適配體 ID5 :

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

包含序列編號 3 所表示之核苷酸序列的適配體 ID6 :

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

(上述各式中，各核苷酸中之括弧表示核糖之 2' 位的修飾，F 表示氟原子，M 表示甲氧基)。

此等適配體中，由於使用任一者均可在本發明之適配體製劑的構成中安定地存在，故可適合作為本發明之適配體製劑的有效成分。

【0042】 本發明中所用的適配體，可為游離體，亦可為其醫藥上容許之鹽。就此種鹽而言，可列舉金屬鹽、銨鹽、有機胺加成鹽、胺基酸加成鹽等。就金屬鹽而言，可列舉鈉鹽、鉀鹽等鹼金屬鹽，鎂鹽、鈣鹽等鹼土金屬鹽，鋁鹽、鋅鹽等。就銨鹽而言，可列舉銨、四甲基銨等之鹽。就有機胺加成鹽而言，可列舉參羥基胺基甲烷等之鹽。就胺基酸加成鹽而言，可列舉離胺酸、精胺酸、組胺酸、色胺酸、鳥胺酸等之鹽。

【0043】本發明中所用的針對 FGF2 之適配體的濃度，無特別限定，只要能使本發明之適配體製劑可達到目的之效能效果，含有多少均可。在本說明書中，「適配體之濃度」意指構成適配體分子之以 5'→3'磷酸鍵所連結的核酸部分之重量在製劑之總體積中所佔的比率(mg/mL)。就該適配體之濃度而言，例如，可列舉 1 至 60mg/mL。

【0044】若針對 FGF2 之適配體的濃度超過 20mg/mL，則即使在通常之保存溫度(即 4 至 5°C)，亦有容易生成該適配體之多聚體的傾向。針對 FGF2 之適配體，雖然在以單體存在的情況會結合於 FGF2 而阻礙 FGF2 之功能並發揮其藥效，但若多聚體化，則在使用 BIAcore 之檢定中會未觀察到與 FGF2 的結合，而可認為並未阻礙 FGF2 之功能(請參照實施例 4)。在適配體之濃度低的情況，分子間距離遠，多聚體化之傾向低，但若適配體濃度超過 20mg/mL，則即使在通常之保存溫度(即 4 至 5°C)下亦會多聚體化，結果對 FGF2 之結合活性就整體而言有降低之傾向(請參照實施例 5)。因此，本發明之適配體製劑中的 FGF2 適配體濃度之上限，期望為不超過 20mg/mL 之濃度。此外，在本發明之適配體製劑之適配體濃度低時，有無法得到作為注射劑之效果的情況。因此，本發明之適配體製劑中的 FGF2 適配體濃度之下限，只要為能得到作為注射劑之效果的濃度，即無特別限定，例如期望為 1mg/mL 以上之濃度。

【0045】本發明之適配體製劑的劑型，只要為水性液劑，無特別限定，而較佳為注射劑。由於本發明之適配體製劑為水性液劑，故作為有效成分的針對 FGF2 之適配體係溶解於溶劑中而存在。

【0046】通常周知，適配體為了維持其高次構造，必須加入作為強電解質之無機鹽。在現今上市的唯一的適配體醫藥品之 Macugen(註冊商標)中，有添加

磷酸氫鈉、磷酸二氫鈉、等張化劑及 pH 調整劑。在此狀態下，Macugen 於 25 ± 2 °C 之加速試驗中顯示安定地存在歷經 6 個月，於 5 ± 3 °C 之長期保存試驗中顯示安定地存在歷經 36 個月。因此，本發明所屬技術領域中具有通常知識者自然會認為，為了在保持適配體之高次構造之情況下使其安定地存在於注射劑中，無機鹽(電解質)係為必要者。

【0047】 然而，如後述之實施例所示，可知本發明之有效成分(即上述針對 FGF2 之適配體)若使用 PBS 或生理食鹽水作為溶劑，則在作為強電解質之無機鹽的影響下會失去安定性，有形成多聚體之傾向，結果失去對 FGF2 之結合活性。於是，本發明人等使用不含無機鹽(電解質)之水作為溶劑時，意外地發現可抑制 FGF2 適配體之多聚體化，並使 FGF2 適配體以單體存在的比率增大(請參照實施例 3)。

【0048】 雖不期望拘泥於任何理論，然而，在將 FGF2 適配體溶解於水中之情況下，會如實施例 1 所示而無法測定 FGF2 適配體之 T_m 值，此外，如實施例 2 所示而無法觀測到 NMR 中之質子位移，所以，可推測溶解於水中之 FGF2 適配體係以單體伸展之狀態存在。亦即，可推測藉由使用不含無機鹽之水作為溶劑，使被視為活性構築所需的適配體的高次構造被破壞、變性，而以單股狀態存在，因此而可防止失活(多聚體化)。並且，由於如實施例 4 及 5 所示，若溶解於含有電解質之溶液中並實施表面電漿子共振(SPR)檢定時， FGF2 適配體會保持與 FGF2 之結合活性，所以，若將溶解於水中之 FGF2 適配體投予至體內，則藉由體液中所存在的電解質之作用，可再構築適配體活性所需之高次構造，而發揮活性。

【0049】如此，藉由溶解在不含電解質之溶劑中，刻意使 FGF2 適配體的高次構造崩壞並成為伸展的狀態，而可於長期保存中防止多聚體化，在投予後藉由調整至生理之鹽濃度，使高次構造再構築，而發揮藥效的製劑處方，其結果可使 FGF2 適配體之活性長期維持。本發明係藉由對此種溶液中的適配體之存在形式進行詳細地驗證而完成，即使本發明所屬技術領域中具有通常知識者亦無法輕易地完成之。

【0050】依照以上所述，就本發明之適配體製劑中所用的溶劑而言，係以不含無機鹽(電解質)之水性溶劑為較佳，特佳為水。

【0051】本發明之適配體製劑，如上所述，由於使用不含無機鹽(電解質)之溶劑，故滲透壓低，無法直接以原樣作為注射劑使用。因此，本發明之適配體製劑，為了將對於血漿滲透壓之滲透壓比調至 1 以上(較佳為 1 至 3)，係以包含作為非電解質之滲透壓調整劑(滲透劑(osmolyte))為其特徵。

【0052】就本發明之適配體製劑中所用的滲透壓調整劑而言，若為非電解質，即無特別限定，只要排除無機離子類(鉀離子、氯化物離子等)，即可使用任何一般所用的滲透壓調整劑。就此種滲透壓調整劑而言，可列舉多元醇(甘油、甘露醇、海藻糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、肌醇等)、胺基酸類(丙胺酸、甘胺酸、麩胺酸、脯胺酸、GABA、牛磺酸、四氫嘧啶(ectoine)等)、甲基銨類(TMAO、膽鹼、乙醯基膽鹼、甘胺酸甜菜鹼、GPC、DMSP 等)、尿素類等，較佳係使用多元醇，更佳係使用甘露醇。

【0053】滲透壓調整劑之量無特別限定，若為本發明所屬技術領域中具有通常知識者，即可依據製劑中所含的 FGF2 適配體之量、所使用的滲透壓調整劑之種類(分子量)、目標滲透壓而適宜變更。例如使用甘露醇作為滲透壓調整劑並

將對於生理食鹽水之滲透壓比設定為約 1 的情況下，滲透壓調整劑於注射劑總量中的調配比率為 2 至 7.5%(w/v)。更具體而言，在對於生理食鹽水之滲透壓比調成 1 的情況下，若上述 FGF2 適配體之濃度為 2mg/ml，則甘露醇之調配比率為 4.9%，若上述 FGF2 適配體之濃度為 20mg/ml，則甘露醇之調配比率成為 3.6%。

【0054】本發明之適配體製劑中，除了作為有效成分之針對 FGF2 之適配體或其鹽以外，以實質上不含電解質為較佳。其中，所謂「實質上不含」意指在能使製劑中之 FGF2 適配體長期安定地保存的範圍內亦可含有少量之電解質。更佳為本發明之適配體製劑中，除了含有作為有效成分之針對 FGF2 之適配體或其鹽以外，不含電解質。

【0055】本發明之適配體製劑，視需要可進一步含有醫藥上容許之添加劑。就此種添加劑而言，例如，可列舉安定化劑、保存劑、助溶劑、緩衝劑、pH 調整劑、無痛化劑等，較佳係可使用以往作為注射劑用之添加劑而周知慣用的屬於非電解質類的醫藥添加物。

【0056】本發明之適配體製劑之 pH 無特別限制，不過在作為注射劑使用時則期望為中性附近之 pH，例如可適宜選擇 pH5 至 9，較佳為 6 至 8 之範圍內。若將作為有效成分的針對 FGF2 之適配體或其鹽溶解於水中，由於溶液之 pH 成為上述範圍內，故本發明之適配體製劑中不需要刻意添加作為電解質之 pH 調整劑、緩衝劑。

【0057】在本發明之適配體製劑中，只要不對 FGF2 適配體之活性或安定性有不良影響，亦可調配其他活性成分。就此種活性成分而言，亦可含有作為伴隨血管新生之疾病等之治療藥的 McGen(註冊商標)、樂舒晴(Lucentis(註冊商標))、Airia(註冊商標)、癌思停(Avastin(註冊商標))等 VGEF 阻礙劑、類固醇等抗

炎症劑，作為骨疾病治療藥等之諾德欣(Norditropin(註冊商標))、增若托平(Genotropin(註冊商標))等人類成長荷爾蒙製劑、嗎啡等鎮痛/鎮靜劑。可列舉老年黃斑變性症等伴隨血管新生的疾病、骨質疏鬆症、風濕性關節炎、變形性關節症、骨折等骨/軟骨疾病、疼痛之治療用或預防用的醫藥化合物。

【0058】 本發明之適配體製劑，藉由採取上述之構成，即使於 4℃ 中，亦可有 3 個月以上為安定。其中，所謂「安定」意指如上述般在玻璃瓶中將該製劑封入並於 4℃ 保管後，製劑中所存在的單體適配體之比率為 70%以上。較佳為本發明之適配體製劑於 4℃ 下保存 3 個月後，製劑中之單體適配體的比率為 80%以上。此外，本發明之適配體製劑，在暴露於白色螢光燈或近紫外螢光燈之狀態下亦安定。

因此，本發明之適配體製劑係以維持原樣之水性液劑的形態，較佳為以已預充填之注射器劑或藥筒(cartridge)劑等注射劑的劑型，藉由冷藏保存於 5℃ 以下而可長期安定地保存，操作極為容易。

【0059】 本發明之適配體製劑，較佳可使用於作為例如老年黃斑變性症等伴隨血管新生的疾病、骨質疏鬆症、風濕性關節炎、變形性關節症、骨折等骨/軟骨疾病、疼痛之治療用或預防用的醫藥。

【0060】 本發明之適配體製劑可藉由非經口方式(例如靜脈內投予、皮下投予、肌肉內投予、局部投予、腹腔內投予、經鼻投予、經肺投予、點眼投予等)來投予。本發明之適配體製劑的投予量，係依據 FGF2 適配體之種類/活性、疾病之嚴重度、作為投予對象之動物種類、投予對象之藥物接受性、體重、年齡等而異，通常，就成人每 1 日有效成分(適配體之寡核苷酸部分)量而言，可為約 0.0001 至約 100mg/kg，例如約 0.0001 至約 10mg/kg，較佳為約 0.005 至約 1mg/kg。

[實施例]

【0061】 以下，雖然藉由展示實施例而更詳細地說明，然而本發明不受此等實施例所限定。

【0062】 實施例 1(溶劑中之 FGF2 適配體的構造解析：T_m 值之決定)

將適配體 ID1 所表示之適配體的構造展示如下。大寫文字表示 RNA，小寫文字表示 DNA，idT 表示反向 dT(inverted dT)。再者、各核苷酸中之括弧表示其 2' 位之修飾，F 表示氟原子，M 表示 O-甲基。C6 為-(CH₂)₆-連接子，PEG40TS2 為分子量 40000 之 2 分枝 TS 型聚乙二醇(SUNBRIGHT GL2-400TS 日油製)。

適配體 ID1：

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

【0063】 將適配體 ID1 所表示之適配體，以水溶解成為 0.1mg/mL，或以 PBS 或生理食鹽水溶解成為 0.06mg/mL。將所得之溶液於 95℃ 加熱 5 分鐘後，冷卻至室溫，充填於石英玻璃製之光析管(cuvette)中。將溫度從 20℃ 變化至 90℃，同時以分光光度計測定 UV 吸收，決定 T_m 值。

結果，在 PBS 中為 60.1℃，在生理食鹽水中為 69.6℃。另一方面，在水中則未觀測到特定之 T_m 值。由此可推想，適配體 ID1 所表示之適配體，在通常可成為注射劑之溶劑的 PBS 或生理食鹽水中，會藉由分子間相互作用而形成高次構造。此外，推想適配體 ID1 所表示之適配體，在不含電解質之水中，於分子間、分子內未形成鹼基對，並且未產生高次構造。

【0064】 實施例 2(重水中之 FGF2 適配體的構造解析：NMR 光譜之測定)

將 20mg 之適配體 ID1 所表示之適配體充填於玻璃製小瓶(vial)中，使其溶解於約 1mL 之重水中，作為測定樣本。使用 Bruker Avance 600 MHz NMR spectrometer 進行測定。結果，未觀測到原本應能在小於 8ppm 之低磁場觀測到之來自鹼基對的亞胺基質子信號。

由此可推想，適配體 ID1 所表示之適配體，在不含電解質之水中，分子間、分子內並未形成鹼基對，並且未產生高次構造。

【0065】 實施例 3(於含有電解質之溶液中的 FGF2 適配體之構造解析：SEC-MALS 測定)

將適配體 ID1 所表示之適配體溶解於生理食鹽水中而成為 20mg/mL，於 37℃ 培育 2 週，調製以人工方式形成高次構造的 FGF2 適配體製劑。將其與調製後立即冷凍保存而以最小限度形成高次構造的樣本，分別用生理食鹽水稀釋成為 0.2mg/mL，供於分析。

藉由尺寸排除層析法而分離單體及多聚體，使用 Wyatt Technology 公司之 MALS(Multi Angle Light Scattering)檢測器分別測定該等之分子量。尺寸排除層析法係以 Waters 公司製 ACQUITY UPLC 並使用 BEH200 SEC 管柱而實施。

結果，測得被認為是單體的峰之分子量為約 64000，被認為是由多聚體所構成之高次構造的峰之分子量為約 122000。從此結果可知，適配體 ID1 所表示之適配體在含有電解質之水中所形成的高次構造為二聚體。

【0066】 實施例 4(適配體之單體含有率與結合活性之關係)

將適配體 ID1 所表示之適配體溶解於 PBS、生理食鹽水或 3.3%之甘露醇水溶液而成為 20mg/mL 或 2mg/mL，在表 1 所示之保存條件下，調製顯示各種單

體含有率的 FGF2 適配體製劑。其中，調製之各 FGF2 適配體製劑的單體含量係藉由尺寸排除層析法而決定。其結果亦示於表 1。

調製之各 FGF2 適配體製劑對 FGF2 蛋白質之結合活性，係使用 GE 公司製之 Biacore T200 並藉由表面電漿子共振 (SPR) 而測定。感應器芯片係使用與胺基反應之 CM4。人類 FGF2 係溶解於固定化溶液 (10mM 醋酸鈉，pH6) 而成為 10 μ g/mL。在蛋白質側之胺基與芯片側之羧基的反應中，使用乙基-3-碳化二亞胺鹽酸鹽及 N-羥基琥珀醯亞胺。反應後，藉由乙醇胺進行封阻 (blocking)。FGF2 之固定化量係設為約 1000RU。將分析物用之適配體調製成 5 μ M。運作緩衝液 (running buffer) 係使用含有 295mM 氯化鈉、5.4mM 氯化鉀、0.8mM 氯化鎂、1.8mM 氯化鈣、20mM Tris、0.05% Tween20 之 pH7.6 者，再生用液係使用 2M 氯化鈉。FGF2 係固定化於流動槽 (flow cell) FC2 或 FC4 中，減去 FC1 或 FC3 之結果，形成最終之感應圖譜 (sensorgram)。活性係以相對於「在不含電解質之溶液中於使用時才調製的多聚體含量極低的 FGF2 適配體製劑標準」的相對值來進行評價。

將各 FGF2 適配體製劑之調製方法、單體含有率及對 FGF2 蛋白質之結合活性的測定結果示於表 1 中。從此結果可知，FGF2 適配體製劑的單體之含量係與對 FGF2 蛋白質之結合活性有相關關係。

【0067】 [表 1]

FGF2 適配體製劑之單體含有率與對 FGF2 蛋白質之結合活性

FGF2 適配體製劑	調製方法 (保存條件)	單體含有率 (%)	結合活性 (%)
2mg/mL 3.3%甘露醇製劑	於使用時才調製	98.7	98.1
20mg/mL 3.3%甘露醇製劑	於使用時才調製	91.3	91.6
20mg/mL 3.3%甘露醇製劑	25℃ 1 週	80.5	75.7
20mg/mL 3.3%甘露醇製劑	25℃ 2 週	71.5	65.2
20mg/mL 3.3%甘露醇製劑	25℃ 1 個月	63.4	57.2
20mg/mL 3.3%甘露醇製劑	25℃ 3 個月	50.2	50.2
2mg/mL 生理食鹽水	37℃ 2 日	56.9	56.2
2mg/mL PBS	37℃ 2 日	57.2	60.6
20mg/mL 生理食鹽水	37℃ 2 日	12.1	18.3
20mg/mL PBS	37℃ 2 日	11.3	13.1

【0068】 實施例 5(FGF2 適配體製劑之安定性試驗)

將適配體 ID1 所表示之適配體以成為 20mg/mL 或 2mg/mL 之方式溶解於 3.3%或 3.6%或 4.9%之甘露醇溶液，並依照表 2 所示的各種溫度條件保存 3 個月後，藉由尺寸排除層析法及 SPR 法測定單體含有率及結合活性。將結果示於表 2。

從此結果可知，藉由不含電解質之甘露醇水溶液所調製的 FGF2 適配體製劑為安定的。

【0069】 [表 2]

FGF2 適配體製劑之安定性試驗結果

製劑濃度 (mg/mL)	溶液	保存溫度	單體含有率 (%)	結合活性 (%)
2	3.3%甘露醇	-20℃	98.4	102.0
2	3.3%甘露醇	5℃	99.1	102.7
20	3.3%甘露醇	-20℃	89.2	91.0
20	3.3%甘露醇	5℃	88.5	90.8
2	4.9%甘露醇	-20℃	98.3	101.0
2	4.9%甘露醇	5℃	98.0	103.1
20	3.6%甘露醇	-20℃	88.8	84.1
20	3.6%甘露醇	5℃	88.0	81.8

【0070】 實施例 6(其他 FGF2 適配體製劑之結果)

將適配體 ID2 至 6 所表示之適配體以適當之濃度溶解於水(甘露醇水溶液)、生理食鹽水或 PBS，調製成 FGF2 適配體製劑。將所得到的各 FGF2 適配體製劑於各種溫度條件及保存溫度下保存數個月後，藉由尺寸排除層析法及 SPR 法測定單體含有率及結合活性。

適配體 ID2：

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

適配體 ID3：

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

適配體 ID4：

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

適配體 ID5：

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

適配體 ID6：

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

從此等結果可知，關於其他 FGF2 適配體，藉由不含電解質之甘露醇水溶液所調製的 FGF2 適配體製劑亦為安定的。

【0071】 比較例 1(FGF2 適配體製劑之安定性試驗)

將適配體 ID1 所表示之適配體以生理食鹽水或 PBS 溶解而成為 20mg/mL，調製成 FGF2 適配體製劑。將所得到的各 FGF2 適配體製劑於表 3 所示之各種溫度條件下保存 3 個月後，藉由尺寸排除層析法測定單體含有率。將結果示於表

3。從此結果可知，藉由包含電解質之生理食鹽水或 PBS 所調製的 FGF2 適配體製劑為不安定的。

【0072】 [表 3]

以包含電解質之溶液所調製的 FGF2 適配體製劑之安定性試驗

製劑濃度 (mg/mL)	溶液	保存溫度	單體含有率(%)
20	生理食鹽水	-20℃	65.4
20	生理食鹽水	5℃	44.5
20	PBS	-20℃	68.2
20	PBS	5℃	36.8

[產業上之可利用性]

【0073】 本發明之適配體製劑，係即使將針對 FGF2 之適配體或其鹽以注射劑等水性液劑的形式予以冷藏保存亦能長期安定地保存，所以，就作為對於藉由阻礙 FGF2 而可發揮藥效的疾病(例如老年黃斑變性症等伴隨血管新生之疾病、骨質疏鬆症、風濕性關節炎、變形性關節症、骨折等骨/軟骨疾病、疼痛)之治療或預防劑而言，從可提供操作上優良之製劑的觀點，極為有用。

本申請案係以在日本所申請的特願 2018-124390(申請日：平成 30 年 6 月 29 日)為基礎，其內容全部包含於本說明書中。

【序列表】

<110> 日商力博美科股份有限公司 (RIBOMIC INC.)

<120> 適配體製劑

<130> 092922

<140> TW 108122887

<141> 2019-06-28

<150> JP 2018-124390

<151> 2018-06-29

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 38

<212> RNA

<213> 人造序列

<220>

<223> FGF2 適配體

<400> 1

gggauacuag ggcauuaaug uuaccagugu agucucga 38

<210> 2

<211> 37

<212> RNA

<213> 人造序列

<220>

<223> FGF2 適配體

<400> 2

gggaaacuag ggcguaaacg ugaccagugu uucucga 37

<210> 3

<211> 36

<212> RNA

<213> 人造序列

<220>

<223> FGF2 適配體

<400> 3

gggauacuag ggcauuaaug uuaccagugu agucce	36
<210> 4	
<211> 34	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> FGF2 適配體	
<400> 4	
gggauacuagg gcauuaaugu uaccagugua gucc	34
<210> 5	
<211> 38	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> FGF2 適配體	
<400> 5	
ggggauacua gggcauuaau guuaccagug uagucce	38
<210> 6	
<211> 37	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> FGF2 適配體	
<400> 6	
agggauacua gggcauuaau guuaccagug uagucc	37
<210> 7	
<211> 35	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> FGF2 適配體	
<400> 7	
gggaaacuag ggcguuaacg ugaccagugu uuccc	35

<210>	8	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	FGF2 适配體	
<400>	8	
	cggauacuag ggcauuaaug uuaccagugu aguccg	36
<210>	9	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	FGF2 适配體	
<400>	9	
	ccgauacuag ggcauuaaug uuaccagugu agucgg	36
<210>	10	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	FGF2 适配體	
<400>	10	
	gggauacuag ggcguaaacg uuaccagugu aguccc	36
<210>	11	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	FGF2 适配體	
<400>	11	
	gggauacuag ggccuaaagg uuaccagugu aguccc	36

<210> 12
<211> 36
<212> RNA
<213> 人造序列

<220>
<223> FGF2 適配體

<400> 12
gggauacuag ggcauuuaug uuaccagugu aguc

36

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種水性液劑，係含有：與 FGF2 結合之適配體或其鹽、以及甘露醇；

其中，該適配體係包含下式(1)所示之核苷酸序列，



在此， N^1 及 N^6 各自獨立地表示 0 至複數個任意鹼基， N^2 、 N^3 、 N^4 及 N^5 獨立地表示 1 個任意鹼基，惟尿嘧啶亦可為胸腺嘧啶；

並且，該適配體係下述(a)或(b)之任一者，

(a)在該適配體所含之核苷酸中，

(i)各嘧啶核苷酸之核糖之 2' 位為氟原子，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖之 2' 位為羥基者；

(b)在該(a)之適配體中，

(i)各嘧啶核苷酸之核糖之 2' 位的氟原子各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、羥基及甲氧基所構成之群組中的原子或基置換，並且

(ii)各嘌呤核苷酸之核糖之 2' 位的羥基各自獨立地未被置換或被選自由氫原子、甲氧基及氟原子所構成之群組中的原子或基置換者；

前述適配體之濃度為 1 至 20mg/mL；

甘露醇的調配比率為水性液劑總量之 2 至 7.5%(w/v)；

除了前述適配體或其鹽以外，實質上不含電解質。

【第2項】 如申請專利範圍第 1 項所述之水性液劑，其中，該適配體係包含下式(3)所示之核苷酸序列，



其中， N^1 及 N^{62} 各自獨立地表示 0 至複數個任意鹼基。

【第3項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之水性液劑，其中，該適配體係包含序列編號 3、8、9、10 或 12 所示的任一個核苷酸序列。

【第4項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之水性液劑，其中，相對於 1mg 之該適配體，以 1 至 50mg 之比率含有甘露醇。

【第5項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之水性液劑，其係保存於 5°C 以下。

【第6項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之水性液劑，其於 4°C 保存 3 個月後的單體適配體的比率為 80% 以上。

【第7項】如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之水性液劑，其為注射劑。