

(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2004-503214

(P2004-503214A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.C1.⁷**C12N 15/09****A61K 47/48****C12Q 1/68**

F1

C12N 15/00

A61K 47/48

C12Q 1/68

Z N A A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4

4 B 0 6 3

4 C 0 7 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁)

(21) 出願番号	特願2001-577520 (P2001-577520)	(71) 出願人	502057407 エーバーハルト・カルルス-ウニヴェルズ イテート テュービンゲン ウニヴェルズ イテートクリーニクム ドイツ連邦共和国, D-72076 テュ ービンゲン, ガイスヴェーク 3番地
(86) (22) 出願日	平成13年4月17日 (2001.4.17)	(74) 代理人	100087701 弁理士 稲岡 耕作
(85) 翻訳文提出日	平成14年10月16日 (2002.10.16)	(74) 代理人	100101328 弁理士 川崎 実夫
(86) 國際出願番号	PCT/EP2001/004340	(72) 発明者	シュリュセナー, ヘルマン ドイツ連邦共和国, 72076 テュービ ンゲン, ハオスザー シュトラーセ 15 番地
(87) 國際公開番号	W02001/079538		
(87) 國際公開日	平成13年10月25日 (2001.10.25)		
(31) 優先権主張番号	100 19 154.1		
(32) 優先日	平成12年4月18日 (2000.4.18)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP, US		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞結合核酸分子(アプタマー)

(57) 【要約】

【課題】内皮細胞に選択的に結合し標識できる新規な核酸分子を提供する。

【解決手段】配列番号1～29に示される内皮細胞を選択的に標識する核酸分子、ならびにそれを用いて腫瘍疾患を検出する方法。本特異的核酸分子(アプタマー)は、種々の「ヘアピンループ」または「ふくらみ」中に位置する活性結合部位を有する図1の仮設構造モデルで示され、リンカー部分(n)を介して5'末端がビオチン標識(BBB)され、黒丸は塩基対を表す。

【選択図】図1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

添付の配列表の配列番号 1 から配列番号 2 1 のヌクレオチド配列の少なくとも 1 つを含む核酸分子。

【請求項 2】

添付の配列表の配列番号 1 から配列番号 2 1 のヌクレオチド配列の 1 つを有する核酸分子。

【請求項 3】

上記非機能性部分の少なくとも 1 つのヌクレオチドが置換または欠失している、請求項 1 または請求項 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

治療および / または診断薬と連結される、請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

組織切片の組織検査のための、請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 6】

腫瘍疾患の検出のための、添付の配列表のヌクレオチド配列番号 9 を含む核酸分子の使用。

【請求項 7】

上記検出をネズミ / ウシタンパク質「p i g p e n」に対するヒト相同体を介して行う、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 8】

核酸分子を内皮細胞に選択的に結合する、または内皮細胞を選択的に標識する方法であって、その核酸分子が添付の配列表の配列番号 1 から配列番号 2 1 のヌクレオチド配列の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする方法。

【請求項 9】

核酸分子が添付の配列表の配列番号 1 から配列番号 2 1 のヌクレオチド配列の 1 つを有する核酸分子であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 生物材料を準備し、

(b) 腫瘍マーカーを検出する

工程を含んでなる、腫瘍疾患の検出方法であって、その検出を添付の配列表の配列番号 9 のヌクレオチド配列を含む核酸分子を用いて行うことの特徴とする腫瘍疾患の検出方法。

【請求項 11】

検出をネズミ / ウシ「p i g p e n」に対するヒト相同体を介して行うことの特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

上記核酸分子の非機能性部分の少なくとも 1 つのヌクレオチドが置換または欠失していることを特徴とする請求項 8 ないし 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

上記核酸分子が治療薬と連結されていることを特徴とする請求項 8 ないし 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

上記核酸分子が診断薬と連結されていることを特徴とする請求項 8 ないし 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

上記診断薬が FITC、ビオチン、ジゴキシゲニンおよびそれらの誘導体、ならびにさらなる蛍光物質、酵素マーカー、赤外線マーカーおよびキレート剤からなる群から選択されることの特徴とする請求項 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

核酸分子が天然複合生物材料に選択的に結合することを特徴とする、請求項 8 ないし 15 のいずれか一項に記載の方法における、添付の配列表の配列番号 1 から配列番号 21 の又クレオチド配列の 1 つを含む核酸分子の使用。

【請求項 17】

(a) 生物材料を準備し、

(b) 腫瘍マーカーを検出する

工程を含んでなる、腫瘍疾患の検出方法であって、

その検出をネズミ / ウシタンパク質「pig pen」に対するヒト相同体を介して行うことと特徴とする腫瘍疾患の検出方法。 10

【発明の詳細な説明】

本発明は内皮細胞に選択的に結合する、または内皮細胞を選択的に標識する核酸分子、腫瘍疾患を同定する方法、かかる方法で使用される核酸分子ならびにかかる核酸分子の使用法に関する。 20

【0001】

この種の方法およびそこで使用される核酸分子は公知のものであって、アプタマーとも呼ばれる。関連する総説は Osborne ら、"Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects", Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1: 5 - 9. に見出せる。 20

アプタマーは高親和性の RNA および DNA オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであり、それらの特異的な空間的構造により標的分子に高い親和性を有する。かかるアプタマーを見出すためには、全く異なる配列および二次構造を有する多数のオリゴヌクレオチドを無作為かつ酵素的に生成し、これから標的分子に高い親和性を示すオリゴヌクレオチドを選択、濃縮するといったコンビナトリアルアプローチがしばしば用いられる。この技術はまた SEL EX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) とも呼ばれる。 30

【0002】

一次構造が公知の場合、かかるオリゴ - ポリヌクレオチド(アプタマー)は例えば DNA / RNA 合成機を使って合成してもよい。 30

アプタマーに対する標的構造は、レセプターまたは他のタンパク質、脂質構造もしくは炭水化物構造であってよい。テオフィリン(Jenison ら、"High-resolution molecular discrimination by RNA", Science 1994; 263 (5152): 1425 - 9 を参照)、ATP(Tang ら、"Rational design of allosteric ribozymes", Chem. Biol. 1997; 4 (6): 453 - 9 を参照)、アルギニン(Geiger ら、"RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantio-selectivity" Nucl. Acids Res. 1996; 24 (6): 1029 - 36 を参照)のような小分子に対して高い親和性を示すアプタマーがすでに発見されている。同様に、自然環境では通常いずれの核酸にも結合しないタンパク質結合アプタマーも見出されている。Morriss ら、"High affinity ligands from in vitro selection: Complex targets"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95: 2902 - 2907 は、細胞膜に対して向けられるアプタマーの開発に成功した。 40

【0003】

当技術分野の現状は、引用した文献の著者らは複合生体材料に結合するまたはそれを標識する核酸分子の完全な配列を示していないという欠点をもつ。比較的高分子量の構造の標識について研究しているMorriss らは、単に配列モチーフを示しているに過ぎない。 50

この刊行物によれば、かかる配列モチーフを含む核酸分子は赤血球細胞膜から人工的に生成した小胞（赤血球ゴースト）に結合する。

上記の点から、本発明の1つの目的は最初に記載したタイプとはまた別の核酸分子、特に内皮細胞に選択的に結合し標識できる核酸分子を提供することである。

【0004】

本発明によれば、この目的は添付の配列表の配列番号1から配列番号21のヌクレオチド配列の少なくとも1つを含む核酸分子により達成される。

その結果、本発明の基礎をなす目的は完全に達成される。それは発明者らが、上記ヌクレオチド配列の少なくとも1つを含む核酸分子は、天然の生物材料のみならず技術的方法により生成したその一部分までも認識および結合し、かつ内皮細胞に特異的であるということを認識しているからである。発明者らの発見によれば表中の配列の少なくとも1つを含む核酸分子は使用される生物材料に対する高い特異性により識別される。10

【0005】

しかし、添付した配列表の配列番号1から配列番号21のヌクレオチド配列の1つを有する核酸分子が好ましい。

発明者らのデータから、クレームのヌクレオチド配列の1つを有する核酸分子を最初に記載した方法で使用する場合に本発明の根拠であるかかる目的が完全に達成されることが明らかになった。驚くべきことにヌクレオチド配列によりあらかじめ決定されている核酸分子の二次構造は生物材料に特異性の高い結合を付与するに十分な状態である。

【0006】

さらに核酸分子内の非機能性部分の少なくとも1つのヌクレオチドが置換または欠失している場合が好ましい。20

これは、発明者らが特定の核酸分子の配列中の特定の機能性領域が生物組織との選択的結合を司っていることを見出したことによる。これらの領域は「ヘアピンループ」または「ふくらみ」の二次構造中に折りたたまれた配列とともに位置する。これらの機能性領域の塩基配列がマッチする場合、非機能性部分の配列が互いに異なる2つの核酸分子またはアプタマーは、同じ構造に結合できる。かかる相違には単一または複数のヌクレオチドのヌクレオチド交換および欠失の双方、ならびに鎖の末端切断または末端修飾が含まれる。

【0007】

本発明のさらなる目的は、配列番号1から配列番号21のヌクレオチド配列の1つを含む核酸分子を使用して内皮細胞に選択的に結合するまたは内皮細胞を選択的に標識する方法であり、またこれらの配列に関しては核酸分子の非機能性部分の少なくとも1つのヌクレオチドが置換または欠失している配列変異が包含される。30

配列番号1から配列番号21の配列は内皮細胞に特異的に結合する。血管の管腔側を裏打ちするこれらの細胞はとりわけ脈管形成、血管形成および血液・組織閥門を経た物質のトランクサイトーシスにおいて重要な役割を担う。これに関連して、かかる方法は内皮細胞の分化および腫瘍供給血管または炎症性内皮細胞の特異的病変の標識を研究するために特に好適である。

【0008】

この核酸分子が治療薬と連結されている場合もまた好ましい。

クレームの核酸分子は治療薬をその標的位置に輸送するための標的特異的担体として機能する可能性を有する。この「薬剤標的化」により非病原性組織との望ましくない相互作用の大部分は避けられるため、発明者らは治療薬を標的特異的に使用することにより、特に用量の低減または望ましくない副作用の徹底的な遮断を期待している。40

【0009】

比較的最近の癌研究試験では腫瘍の血液供給の遮断が治療のための有望なアプローチであることが示されたため、好適な標的組織は特に腫瘍組織である（総説文献Ceresh, D. A., "Death to a blood vessel, death to a tumor", Nat. Med. 1998, 4(4): 395-6; Molenaar, "Rocking the foundations of solid tumor

growth by attacking the tumor's blood supply", Immunol. Today 1998, 19(9): 392-4を参照)。かかる方法はまた、新規の核酸配列を用いて有利に行うことができる。

【0010】

本発明に至る実験中、発明者らは添付の配列表中の配列番号9のヌクレオチド配列を含む核酸分子により腫瘍特異的組織が選択的に同定できることを見出した。これにより、これらの核酸分子を使用すれば変性した腫瘍組織と健康な組織との特異性の高い識別が可能である。このように発明者らはそれぞれの標的に向けられた治療のための確実な基礎を提供する使用法を提供する。

これに関連する本発明のさらなる目的は、添付の配列表の配列番号1のヌクレオチド配列を含むまたは含んでなる核酸分子の腫瘍疾患検出への使用ならびに腫瘍疾患検出のためのそれぞれの方法であり、10

- a) 生物材料を準備し、
- b) 腫瘍マーカーを検出する、

工程を含む。ただしこの検出は添付の配列表の配列番号1のヌクレオチド配列を含むまたは含んでなる核酸分子を用いて行う。

【0011】

発明者らのさらなる研究から、添付の配列表の配列番号1のヌクレオチド配列を有する核酸分子によりネズミ／ウシタンパク質「pigpen」に対する相同体を介して腫瘍組織と健常組織との識別が起こることを見出した。このタンパク質は現在に至るまで比較的知られていない内皮タンパク質であり、分子量は67kDaである。さらに、その腫瘍組織との関連は現在知られていない。このように、このタンパク質はRNA結合ドメインおよびトランス活性化ドメインを有する炭水化物結合タンパク質としてこれまでに記載されているが、それが核膜と結合する可能性がある；例えばAlliegroら、"Protein heterogeneity in the coiled body compartment", Experimental Cell Research 239, 60-68 (1998)を参照。20

【0012】

上記の点から、本発明の目的の1つは添付の配列表の配列番号9のヌクレオチド配列を含む核酸分子の腫瘍疾患検出のための使用であり、その検出はネズミ／ウシタンパク質「pigpen」に対するヒト相同体を介して起こる。もう1つの目的はネズミ／ウシタンパク質「pigpen」に対するヒト相同体を介する腫瘍疾患の検出方法である。30

クレームの核酸分子のさらなる適用は、炎症性内皮病変への治療薬の輸送である。可能性のある治療薬は、例えば抗脈管形成または抗炎症物質である。

【0013】

機能担持DNAセグメントを用いてクレームの特異的核酸分子を伸張することにより、限局的に活性な免疫治療薬の調製も可能である。本明細書で意図するのは多大な免疫刺激活性を有する「CpG oligos」の使用である。

本願の発明者らは、クレームの核酸分子を上記の病状の治療に使用しうることを初めて認識した。40

かかる核酸分子はまた診断薬と連結するのが特に好ましい。

【0014】

診断および上記の薬剤ターゲッティングにおいても通常使用されるモノクローナル抗体に比べ、かかる修飾核酸分子またはアプタマーは多数の利点を有する。配列に基づく二次構造の形成のために、可能性のある結合リガンドのレパートリーはモノクローナル抗体の調製に利用可能な免疫レパートリーより実質的に広い。

さらに、アプタマーは実質的により迅速に得られ、コスト効果も高い。可能性のある何百万ものリガンドを3～4週間のうちに試験できる。これに対し抗体産生ハイブリドーマ細胞の調製は実験動物のワクチン注射から始めなければならない。このワクチン注射は数週間続く。これに加え、200から300のハイブリドーマ細胞系を試験するには何ヶ月も50

要する。

【0015】

生物においてそれらの構造が原因で機能を遂行する細胞外オリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドの存在は知られていないので、これらの核酸分子またはアプタマーはまた、抗体による認識を逃れた「通常の」免疫システムの「異常な」エピトープを認識する可能性も有する。

クレームの核酸分子の特に有利な点は、役に立つモノクローナル抗体に対し結合特異性および親和性を示すことである。このためそれらは診断法または薬剤ターゲッティング法で使用されるのに特に好適である。診断法に関しては、意図される方法は特に診断薬がヒトの体の外部で使用されるものである。

10

【0016】

診断法の枠組み内で特に好適な診断薬は、例えばフルオレスセインイソチオシアネート（FITC）などの蛍光化合物をはじめとするビオチン、ジゴキシゲニンおよびその誘導体、酵素マーカー、赤外線マーカー、ならびにキレート剤が挙げられる。従って、核酸分子に連結された診断薬が上記物質を含んでなる群から選択される方法が特に好ましい。

さらに、組織切片の組織検査における上記の核酸分子の使用法も本発明の一部をなす。

【0017】

発明者らはクレームの核酸分子を組織学的薬剤として直接使用することができ、これにより組織中の生物標的構造の in situ での局在化が可能となることを認識している。
かかる使用法の特定の利点はクレームの核酸分子の複合生物材料、好ましくは内皮細胞に対する最初に言及した特異性である。これにより、バックグラウンドシグナルまたは非特異的交差反応の妨害なしにこれらの組織の特異的染色が可能となる。

20

【0018】

該核酸分子が天然複合生物材料に選択的に結合する場合、記載したいずれの方法においても上記の核酸分子の使用が特に好ましい。

発明者らは複雑な天然の生物組織および内皮細胞それぞれに結合する核酸分子を初めて提供する。これに対し、Morrissらにより提供された配列モチーフはそこで使用された核酸分子またはアプタマーの一部であるが、赤血球細胞膜から人工的に生成された小胞に結合する。この方法で生成された膜の完全性は生理的赤血球細胞膜に必ずしも一致する必要はない。複雑な生物組織のモデルとして赤血球成分を選択することもまた、ここでは適当ではない。赤血球は高度に分化しているという特色を有する。赤血球は生物の他の典型的な細胞とは多数の特性が異なる：タンパク合成をせず、細胞の集合体に統合されず、酸素運搬に関して高度に専門化しているなど。

30

【0019】

発明者らは特異的核酸分子を選択するために内皮細胞系の天然細胞を生物材料として使用した。このことは、これらの核酸分子はまた in vivo でも確実に使用できるという利点を有する。

機能性核酸分子を濃縮するため、発明者らは以下の工程からなる方法を用いた：

a) 異なる核酸分子ライブラリーを標的構造とともにインキュベートし；

b) 機能性核酸分子を選択および濃縮し；

c) 選択された核酸分子を単離する。この時、濃縮を調節するために選択された核酸分子の蛍光標識を用いる。

40

【0020】

発明者らは特異的核酸分子またはアプタマーを見出すために選択された核酸分子は通常放射性標識によって濃縮する必要はないが、ここでは好適な検出法を組み合わせて蛍光標識を使用できるものと考えている。機能性核酸分子の特異的結合の特性が、かかる蛍光標識により保持できるとは予期されていなかったが、それは好ましくも配列の 5' または 3' 末端で保持されていた。それまで行われていた公知の方法では、連続的な選択ラウンドのプール中の機能性核酸分子はもっぱら濃縮中に取り込まれた放射性 dNTP のシンチレーション測定により制御されていた。

50

【0021】

放射性物質を取り扱う研究と結びついた帰結は、特定の同位元素研究所の建設、廃棄物処理の問題、放射性物質の輸送および保管に関する厳しい規制、健康が損なわれる危険性、高いコストなど、一般に公知である。これらの問題は、蛍光標識のような別の検出技術を用いることにより避けることができる。

新規の濃縮法は極めて経済的であることが証明された。FACS測定の繰り返しサイクルにより、完全な内皮細胞のそれら本来の環境に埋め込まれている多様な標的に対して同時選択が可能となるのみならず、蛍光標識を用いるFACSによりin situにおいて個々の特異的結合アプタマーの評価が可能となる。

【0022】

上記し、さらに以下にも説明されるかかる特徴は、本発明の範囲内であればそれぞれの場合に示された組合せのみならず他の組合せあるいは単独でも使用できる。

以下、さらなる特徴および利点を示す実施例を挙げて、本発明を説明する。

実施例1 生物標的構造としての内皮細胞

特異的アプタマー選択のために使用された標的構造は、ラット由来の内皮前立腺細胞系である、細胞系YOPEN-1 (CRL-2222, American Type Culture Collection, Manassas, USA) である。この細胞は密集前の内皮細胞層を掻き取ることにより採取する。トリパンブルーで染色後、Neubauer 計数チャンバー中で完全な細胞の数を計数して細胞濃度を見積もる。

実施例2 開始ライブラリー(ssDNAライブラリー)およびプライマー

特異的核酸分子またはアプタマーが選択される合成開始ライブラリー(MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany)は、およそ96merのポリヌクレオチドからなり、プライマーハイブリダイゼーション部位である配列が明らかな18個のヌクレオチドによって約60の無作為に連鎖された塩基(60N)の両側が挟まれている(5' - ATA CCA GCT TAT TCA ATT - [60N] - AGA TAG TAA GTG CAA TCT - 3')。特異的核酸分子は固相合成(Operon Technologies, Inc., Alameda USA)により合成されるFTIC標識およびビオチン標識HPLC精製プライマー(5' - FITC - 18C - AT ACCA GCT TAT TCA ATT - 3' および5' - BBB - AGA TTGCA CTTA CTA TCT - 3'、ただし18Cは18-炭素エチレングリコールスペーサー、「FITC」および「B」はそれぞれFTIC分子およびビオチン分子)を用いる以下に説明するPCR法により増幅する。

実施例3 内皮細胞に特異的な核酸分子またはアプタマーの取得

特異的核酸分子を得るには数回の繰り返し選択が必要である。

【0023】

光保護条件下で以下の工程を実施した。

第1ラウンド

実施例2の開始ライブラリー(1×10^{15} 配列)の約1.7molのDNAを選択バッファー(50mM Tris-HCl(pH7.4), 5mM KCl, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.1%NaN₃) (第1ラウンドでは1ml、その後のラウンドでは200ml)に溶解する。該DNAを変性させ(80、10分)、0、10分間で再生させる。細胞表面および反応血管壁へのポリヌクレオチドの非特異的結合を減少させるため、5モル過剰のtRNA(Gibco, Karlsruhe, Germany)およびウシ血清アルブミン(BSA)をそれぞれの場合に加える。無関係の表面タンパク質に高い親和性を示すDNA分子を除去するために、該DNA溶液を 3×10^7 個のN9小グリア細胞とともに37/5%CO₂で30分間プレインキュベートする。

【0024】

この小グリア細胞を遠心分離で除去し、その上清を 10^6 個のYOPEN内皮細胞と37/5%CO₂でインキュベートする。各回1mlの選択バッファー(0.2%BSA添

10

20

30

40

50

加)で遠心分離して3回洗浄した後、PCR法でアプタマーを増幅するため、鑄型として内皮細胞に結合した核酸分子を使用する(タグポリメラーゼおよびdNTPはPromega, Mannheim, Germanyから入手)。

PCR法はCraemri and Stemmer, "10(20)-fold aptamer library amplification without gel purification", Nucl. Acids Res. 1993; 21(18): 4410の条件に従って行う。使用するプライマーは上記のFITCおよびビオチン標識プライマーである。

FITC標識した一本鎖の取得

蛍光細胞計算法による分析のために、FITC標識ssDNAを以下のように調製する：10
磁石スタンド中で適当量の磁気ストレプトアビジンビーズ(Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal Hamburg, Germany)を用いて磁気を帯びた鎖中のdsDNA PCR生成物を単離することによりビオチン化した鎖からFITC複合ssDNAを精製し、次いで製造業者の指示に従いアルカリ変性させ、最終容量200mlの選択バッファー中に採取する。続いてそれぞれの場合に得られたssDNA溶液を選択ラウンドのためのプールとして供する。

第2および第3選択ラウンド

ポリスチレン製の反応管中で小グリア細胞に対して新規のFITCssDNAプールを再びプレインキュベートする。この選択は(同様にポリスチレン製反応管中で)1.5×10⁵個の内皮細胞に対して行う。37で30分間インキュベートした後、0.2%BSA添加選択バッファー1mlを用いる3回の洗浄により、特異性の低いDNA結合およびその5'修飾が結合の欠如を引き起こす配列から該細胞を分離する。内皮細胞-核酸分子複合体の蛍光はフローサイトメーター(FACS)で測定する。ssDNAは前ラウンドと同様に増幅する。20

第4から第8選択ラウンド

小グリア細胞の再プレインキュベーション(上記)後、1×10⁵個の内皮細胞に対してかかる選択を行う。

【0025】

ポリスチレン製反応管をポリプロピレン製反応管に変えることにより分離マトリックス結合配列を確実に除去する。30分間のインキュベーションおよび細胞の洗浄(前ラウンドに従う)後、フローサイトメーター(選択ラウンドあたり500細胞を計数)で蛍光強度を測定する。上記に従い細胞結合核酸分子をPCR増幅する。30

第8ラウンドのプールからのそれぞれのクローンの取得

第7回目の選択ラウンド(第8ラウンドプール)からの特異的核酸分子を、非修飾プライマーを用いてPCR増幅し、大腸菌(E. coli)中にクローン化する(TA-Cloning, Invitrogen Groningen, The Netherlands)。アルカリ溶解によりそれぞれのクローンのプラスミドを単離し、該挿入体(PCR生成物)を選択ラウンドと同様に修飾プライマーを用いてPCR増幅する。上記のように一本鎖が得られる。

【0026】

このFITCアプタマー溶液を用いてフローサイトメトリー(FACS)および組織結合検査を行い個々の配列の結合特異性を同定する。

FACS測定

連続的な選択ラウンドにおけるアプタマーの特異的結合および個々のクローンの特異的結合はFACS(fluorescence-activated cell sorting: 蛍光活性化細胞選別)により測定する。

【0027】

細胞は(シグナル产生結果として)、それらの蛍光標識の強度に比例して電磁放射線を放出する。この放射線を検出し、定量する。このように、該放射線により細胞に結合した蛍光標識リガンド量の結果が得られる。蛍光強度をシグナル产生結果の関数としてヒストグラム

10

20

30

40

50

ラムにプロットする。蛍光増加の方向への強い偏りが、本明細書で用いられた生物標的材料および内皮細胞に対する特異的核酸分子またはアプタマーの高い親和性の尺度となる。

(a) 連続的選択ラウンドにおける F I T C 連結アプタマーの F A C S 分析

F I T C 連結アプタマーの特異的結合を第 2 回およびそれ以降の選択ラウンドにおいて測定する。核酸分子またはアプタマーを内皮細胞と（上記に従い）インキュベートした後、内皮細胞を選択バッファー（0.2% B S A 添加）で 2 回洗浄し、細胞蛍光を F A C S で測定する。

(b) 個々の F I T C 連結クローンの特異的結合の F A C S 分析

この目的のために 5×10^4 の Y P E N 内皮細胞を選択バッファー（1 mg / ml t R N A 添加；20分、0⁰C）とプレインキュベートし、上記の F I T C - s s D N A 溶液（1 mg / ml t R N A 添加；37⁰C / 5% C O₂ / 30分）とインキュベートする。該細胞を選択バッファー（0.2% B S A 添加）で 2 回洗浄し、細胞蛍光を F A C S で測定する。
10

組織切片の組織結合検査

得られた個々の F I T C 修飾核酸分子またはアプタマーの結合を、ラットグリア芽腫の凍結組織切片の組織結合検査により試験する。組織切片を 1 mg / ml t R N A を含む選択バッファーとプレインキュベートする（20分、40⁰C）。プレインキュベートした組織切片を上記の F I T C - アプタマー溶液（1 mg / ml t R N A 添加）で被覆し、室温で 40 分間インキュベートする。この組織切片を選択バッファーで 2 回洗浄し、蛍光顕微鏡検査法により免疫蛍光を定量する。
20

【0028】

特異性の高い核酸分子またはアプタマーは、グリア芽腫組織の新しく形成された微小管の選択的染色によりそれら自身を識別し、かつ他の非内皮細胞組織とは最小の交差反応を示すことが分かった。このように該核酸分子は内皮細胞染色のための組織プローブとして特に好適である。

実施例 4 （内皮細胞） - 特異的抗原に特異的な核酸分子またはアプタマー

以下に示すヌクレオチド配列は上記方法により得られ、本発明の一部をなす。プライマーハイブリダイゼーション部位は実際のアプタマー配列の 5' および 3' に位置する（太字）。

核酸分子 1（一次構造）

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G G A C C C A A G G T A T T
T C C T C G C G T T C G T
A A T C A G T G G G A G T G G T G T T T G T G T C C G G T G T G A
G A T A G T A A G T G C A A
T C T - 3'

核酸分子 2（一次構造）

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C T A C C A G A C T G T C T
T T C A C C C T G C G C C
G T T G T G G T C T G T C G T T G T T C T A G T T G T T T T C A G
A T A G T A A G T G C A A
T C T - 3'

核酸分子 3（一次構造）

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G T C A G C T T T T T A G T
G A T T T T G G G T T T T
T T G G T G G T A C G T C C C T G T A A A T H A G T T T C A G T C G A
G A T A G T A A G T G C A A
T C T - 3'

核酸分子 4（一次構造）

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G A G T G C T G A T T C C C
G T T T C T C T C T G G T

10

20

30

40

50

A T C G A A T T G A G G T C G T T T G T G T G T G A G G T T G G C T A
 G A T A G T A A G T G C A A
 T C T - 3 '

核酸分子5(一次構造)

A T A C C A G C T T A T T C A A T T C C A A C A C C A T A A C C T T
 T C T T T G A C C T G
 A C T T T A G C C G T A A T G T A T T T T G G G G C C A T C C C C T T A
 G A T A G T A A G T G C A A
 T C T - 3 '

核酸分子6(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G G G T G G A G A T A G T
 A G G T G C A A T C T A T A
 C C A G C T T A T T C A A T T G C C C C G A T T T G G A T G T A A T
 T A T T G C G C G T G T A T
 T T T T G A T T G T A T A A A G T G T T G C T A C A A G A T A G T A
 A G T G C A A T C T - 3 '

核酸分子7(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T A G G C A G A T G A G A A
 G T T A A G G C G G T G C T
 A T A G A T G G A C C A T T T A G G A T T T T A T G G T T G G G G C G G
 T A G A T A G T A A G T G C A A
 C A A T C T - 3 '

核酸分子8(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C C C G C C T T T A C T T
 G G G A G A T T A T C A C C
 G C G G T A T A T A A T A C T G T T C G G A G T T C T G T G T A G
 A T A G T A A G T G C A A
 T C T - 3 '

核酸分子9(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T A G G C G G T G C A T T G
 T G G T T G G T A G T A T A
 C A T G A G G T T T G G T T G A G A C T A G T C G C A A G A T A T A
 G A T A G T A A G T G C A A
 T C T - - 3 '

核酸分子10(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C T G T T G G A C A T T C
 A A A A G A C T A G T T C A
 C G T C C G T T G C C C A T T C T T C C C T T T G T T G A C T G C T
 A G A T A G T A A G T G
 C A A T C T - 3 '

核酸分子11(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C G G C T A G G C T C C A
 T T A A G G G T G A C T T A
 T G G G C C A A A G T C C C G T G C T T G T T C G T G T G G G T G A
 G A T A G T A A G T G C A A
 T C T - 3 '

核酸分子12(一次構造)

5' - - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C C A A A G G T A A A C C
 G C A T A A T A A G G G T A
 T G T A T T A A A T T G G T G G T G A T G A C T G A T G C C A T A
 50

A G A T A G T A A G T G

C A A T C T - 3 '

核酸分子 13 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G A G G A T C A C C T G C T
C T G C C A C C C T T T T

T A A C G T G G G G T T A C A T T T G C T G A A G G G C T T G A G A
T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 14 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G T A C C A G C C G A G A T 10
C T T T T T T G A C G A T

A T G T G T T T T T G A G G T G T T G A G T T T A G T G T G A
G A T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 15 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G C G A T A A A T T T T G C
T A A G T G C G G T C A A

G A C T G T G T T C G T G T A G A T A G T A A G T G C A A T C T - 3 '

核酸分子 16 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G C C A T A C C G T A G T T 20
A G C A T A T G T A G T G

T T A G A T A G T A A G T G C A A T C T - 3 '

核酸分子 17 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G C G C C T T T A A A T A T
A A C C C G A G T G C T T

T G T T T G A A C T G G T G T T C C G G A T G G C C T G T G T T G A
G A T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 18 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G C T T G C A T C G T C A T 30
T A T G A G G T G G A T T

C A A C T G T T T T T G A C T T T T T G C C C C T G G A C G C T G A
G A T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 19 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T G G T T A C C A T T C T G G
T G G G A C C C G T G T T

G C C T G G A T G T G T T T A G T T T T T G G T G T T T T A G
A T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 20 (一次構造)

5' A T A C C A G C T T A T T C A A T T G G T T G G A G A C C T T A T
T G G C A G C A T G C A

G G G C C C T C A G C T G T G C A A C C C C G G T T T C C G T T A G
A T A G T A A G T G C A A

T C T - 3 '

核酸分子 21 (一次構造)

5' - A T A C C A G C T T A T T C A A T T C A C A C A T G C G C C T T
A G T T A G C C C T G G T

T G T T G A G A T A G T A A G T G C A A T C T - 3 '

実施例 5 特異的核酸分子またはアプタマーの構造モデル

図1は特異的ヌクレオチド配列またはアプタマー配列の仮説の二次構造を示している。種々の「ヘアピンループ」または「ふくらみ」中に位置する活性結合部位が示されている。図に示された核酸分子はリンカー部分(n)を介して5'末端がビオチン標識(BBB)されている。黒丸は塩基対を表す。位置情報は、分子中のヌクレオチドの位置を示す。

実施例 6 クレームの核酸分子のヒストグラム

図2および図3は見出された核酸分子のFACSヒストグラムを表す。蛍光強度(F)を横軸に任意対数単位でプロットし、縦軸は任意線形単位でプロットされたシグナル産生結果(E)の数を示す。このヒストグラムは核酸分子配列番号1から21の標的組織への結合特異性を示す。ヒストグラム中の核酸分子のプロットされた線(配列番号1から21、太字)の蛍光の強さが増加する方向への移動は、対照と比較してこれらの分子の標的組織に対する親和性が高いことを表している。示された対照は、それぞれの場合においてFITCに同様に連結された非特異的1本鎖DNAを用いた場合の蛍光である(非特異的ssDNA, 灰色)。このように21個の核酸分子すべてが、使用した内皮細胞に高い親和性を有するという特徴があった。

実施例 7 選択ラウンドの複合プール中の核酸分子のヒストグラム

図4において第2(-----)、第4(· · · ·)および第7(- · - · - · - · -)選択ラウンド由来のアプタマーのプールのFACSヒストグラムが重ねてある。プロットされた選択ラウンドのヒストグラムの線のますます強い蛍光方向への移動は、連続的な選択ラウンドのプール中の、結合核酸分子(アプタマー)の特異性が高まっていることを示す。使用した対照はFITCに同様に連結された非特異的1本鎖DNAを用いた場合の蛍光シグナルである(非特異的ssDNA, 灰色)。

実施例 8 配列番号9のヌクレオチド配列を含む核酸分子の腫瘍 - および「pigpen」 - 特異的アプタマーとしての同定

発明者らが行った組織分析から、また実施例3の最後の部分の記載から、ラット脳のグリア芽腫の組織切片中で、すべての新規核酸分子のうち配列番号9のヌクレオチド配列を含む核酸分子が最も強い蛍光シグナルを示し、かつそれは固形腫瘍が成長している領域に特異的であることが分かった。これは図5に示されている。図5の写真Aでは複雑なグリア芽腫中に埋め込まれている微小管の選択的染色が示されている。BにはDAPIを用いる細胞核の対比染色が示されており、細胞に富む腫瘍領域では上記のアプタマーにより微小管が選択的に標識されるが(写真の右側の明るい糸状構造が染色された微小管を表す)、腫瘍周囲領域の脈管組織は標識されないことを示している(写真の左側)。Cでは、DAKO, Hamburg, Germanyで市販されている内皮CD-31 mAbによる二重染色が示されており、両方の蛍光シグナルが重なり、またアプタマー陽性細胞を内皮細胞として決定している。Dでは、モノクローナル抗体CD-31および非特異的配列-ランダムアプタマーによる染色を行ったが、内皮細胞または脈管付随組織の二重染色とはならず、シグナルの重なりもなかった、Eにおいてはピベットチップを用いて合わせた細胞層を傷つけて採取した内皮細胞培養物の染色が示されている。ここでアプタマーは密集前の創傷循環領域において、内皮細胞への結合を有意に増加させた。目盛り線は50μmを表す。

【0029】

本試験は配列番号9のヌクレオチド配列を含むアプタマーが病的な微小管の複雑な構築体を特異的に染色することを示す。DAPIを用いる細胞の核の対比染色は細胞に富む腫瘍領域中の微小管を選択的に標的化するが腫瘍周囲領域の脈管組織は標的化しないことを示す。発明者らはさらなる実験で(本明細書には示していない)それぞれのアプタマーでラットの正常脳を染色したところ、内皮細胞または脈管付随組織のいずれもが染色されず、蛍光顕微鏡検査法で検出できなかった。腫瘍組織切片を内皮細胞に向けられたマウスIgG、例えば上記のCD-31抗体で染色し、次いでそれぞれのアプタマーで標識することにより、アプタマーの標的が内皮細胞であることが確認された。創傷内皮細胞組織を染色すると、この病変領域においてアプタマーの分子標的の著しいアップレギュレーションが

10

20

30

40

50

示され、すなわちこれは単一層が合わさった領域に比べて増殖が高まっているとことを特徴とする領域を表す。

【0030】

配列番号9のヌクレオチド配列を含むアプタマーにより認識された標的を同定するため以下工程を用いた：1mg(100μl)の磁気ストレプトアビジンビーズを1mlの選択バッファー中でインキュベート(30分、室温)(MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany)して200pmolのトリプルビオチン化(trB)アプタマーによりコーティングした。対照として100μlの磁気ビーズを200pmolの非選択FITC-ssDNA(trB-96-nt)でコーティングした。Klockerら, Journal of Neuroscience 19, 8517-8527(1999)の記載に従って 1.5×10^9 個のYpen-1内皮細胞をプロテアーゼ阻害剤存在下で溶解させた。遠心分離後、タンパク質のペレットを400μlの選択バッファーに再懸濁し超音波処理(0、20秒)し、非特異的競合剤として100倍過剰のtRNA(20nmol)を添加し、アプタマーで被覆した磁気ビーズとともに選択バッファー中でインキュベートした(総容量1.5ml、0、15分)。このタンパク質-アプタマー-磁気ビーズ複合体を磁石スタンド中で除去し、5回洗浄した(1回目の洗浄：150mMのNaClを含む選択バッファー1ml；2-5回目の洗浄：100mMのNaClおよび2nmolのtRNAを含む選択バッファー200μl)。30μlの1M NaCl中でインキュベート(0、30分)することによりアプタマーでコーティングしたビーズからタンパク質を除去し、クーマシーブルーで染色後PAGEにより分析した。
10
20
30

【0031】

図6は本実験の結果を示す。レーンAには分子マーカー、Bレーンには配列番号9のヌクレオチド配列を含むアプタマーを用いて単離した標的、Cレーンには対照として非選択ssDNA(96-nt)を用いて精製した単離物質、Dレーンには処理していない内皮細胞が表されている。それぞれのアプタマーを含む反応により単離された標的バンドはアスタリスクにより示され、それは67kDaのタンパク質であることが同定された。

【0032】

この標的タンパク質は以下のように同定された：

それぞれのゲル片をゲルから切り取り、例えばShevchenkoら, Anal. Chem. 68, 850-858(1996)の記載に従ってトリプシン消化を行った。改変した点を以下に示す：切り取ったバンドを完全に脱染して、25mM炭酸水素アンモニウム(pH 8.1)中67ng/μlの濃度のブタトリプシン(配列決定グレード、修飾、Promega, Mannheim Germany)を用いて37で3時間消化した。ペプチドマッピングおよびタンデム質量分析によるトリプシン断片の配列決定に先立って、50%トリフルオロ酢酸/50%水溶液、次いで50%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル溶液を用いて該ペプチド混合物をゲルから抽出する。該抽出物を真空乾燥させる。乾燥させたペプチドを0.1%トリフルオロ酢酸に再溶解させ、C18球形シリカ逆相物質(ZipTip C₁₈TM, Millipore)を充填した既製のピペットチップを用いて精製する。50%メタノール/1%ギ酸10μlを用いて該ペプチドを溶出させ、ナノエレクトロスプレータンデム質量分析(Q-Tof, Midromass, Manchester, England)により配列決定する。
30
40
50

【0033】

発明者らは配列番号9のヌクレオチド配列を含むアプタマーにより認識される標的に対し論じられた分析を行った。そうすることにより、質量分析またはタンデム質量分析それにより該タンパク質の3つのトリプシンペプチド断片が分析、配列決定された。その結果、かかるアプタマーにより検出された標的是マウス「pigpen」タンパク質に対する相同体であることが分かった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

それぞれ特異的核酸分子またはアプタマーの二次構造の模式図である。

【図2】

クレームの核酸分子のフローサイトメトリーによる核酸分子の特徴を示す。

【図3】

クレームの核酸分子のフローサイトメトリーによる核酸分子の特徴を示す。

【図4】

連続的な選択実験のプール中の該特異的核酸分子またはアプタマーの濃縮を示す。

【図5】

配列番号9のヌクレオチド配列を有する該核酸分子の、ラットグリア芽腫の凍結組織切片の染色を示す。

10

【図6】

配列番号9のヌクレオチドを有する該核酸分子により認識された標的を分析するためのクマシーブルー染色ポリアクリルアミドゲルを示す。

【配列表】

〈110〉 Eberhard-Karls-Universitat Tübingen

〈120〉 Cell-binding nucleic acid molecules (aptamers)

〈130〉 5402P189W0

20

〈140〉 PCT/EP01/04340

〈141〉 2001年4月17日

〈150〉 DE 10019154.1

〈151〉 2000年4月18日

〈160〉 21

〈170〉 PatentIn Ver. 2.1

30

〈210〉 1

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 1

ataccagctt attcaattgg acccaaggta ttccctcgcg ttcgtaatca gtgggagtgg 60

tgttttgttt ccgggtgtgag atagtaatgt caatct 96

40

〈210〉 2

〈211〉 95

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 2

ataccagctt attcaattct accagactgt ctttcacccct gcgcgcgttgt ggtctgttcg 60
tttgttctagt tgttttcaga tagtaagtgc aatct 95

10

〈210〉 3

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 3

ataccagctt attcaattgt cagctttta gtgattttgg gtttttttgt gtacgtccct 60
gtaaathagt ttcatcgag atagtaagtgc caatct 96

20

〈210〉 4

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 4

ataccagctt attcaattga gtgcgtgattc ccgtttctct ctggtatcga attgaggatcg 60
tttgtgtgtg agttggcttag atagtaagtg caatct 96

〈210〉 5

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

10

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 5

ataccagctt attcaattcc aacaccataa ccttttttg acctgacttt agccgtaatg 60
tatttgggcc atcccccttag atagtaagtg caatct 96

〈210〉 6

〈211〉 137

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

20

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 6

ataccagctt attcaattgg gtggagatag taggtgcaat ctataccagc ttattcaatt 60
gccccgattt ggaatgttaatt attgcgcgtg tattttgtat tgtataaaagt gttgctacaa 120

gatagtaagt gcaatct

137

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 98

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ 人工配列

⟨220⟩

⟨223⟩ ヌクレオチド配列

⟨400⟩ 7

ataccagctt attcaatttag gcagatgaga agttaaggcg gtgcataaga tggaccattt 60

aggattttat ggttggcgt agatagtaag tgcaatct 98

10

⟨210⟩ 8

⟨211⟩ 95

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ 人工配列

⟨220⟩

⟨223⟩ ヌクレオチド配列

20

⟨400⟩ 8

ataccagctt attcaattcc cgcccttact tggagatta tcaccgcgt atataaatac 60

tgttcggagt tctgtttaga tagtaagtgc aatct 95

⟨210⟩ 9

⟨211⟩ 93

⟨212⟩ DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 9

ataccagctt attcaatttag gcggggcatt gtgggtggta gtatacatga ggtttggaga 60
ctagtgccaa gatatagata gtaagtgc当地 tct 93

〈210〉 10

〈211〉 97

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

10

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 10

ataccagctt attcaattctt gtggacatt caaaagacta gttcacgtcc gttgccatt 60
cttcccccttig ttgactgcta gatagtaagt gcaatct 97

20

〈210〉 11

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 11

ataccagctt attcaattcg gctaggctcc attaagggtg acttatgggc caaagtcccg 60
tgcttttcg tgtgggttag atagtaagtg caaatct 96

〈210〉 12

〈211〉 97

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 12

ataccagctt attcaattcc aaaggtaaac cgcataataa gggtatgtat taaatttgt 60
ggtagatact gatgccataa gatagtaagt gcaatct 97

〈210〉 13

〈211〉 94

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

10

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

20

〈400〉 13

ataccagctt attcaattga ggatcacctg ctctgccacc ctttttaacg tggggttaca 60
tttgctgaag ggcttgagat agtaagtgc a atct 94

〈210〉 14

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 14

ataccagctt attcaattgt accagccgag atcttttttg acgatatgtg ttttttttga 60
ggtgttgagt tttagtgtgag atagtaagtg caatct 96

10

〈210〉 15

〈211〉 77

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 15

ataccagctt attcaattgc gataaatttt gctaaggcg gtcaagactg tgttcgatgt 60
gatagtaagt gcaatct 77

20

〈210〉 16

〈211〉 65

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 16

ataccagctt attcaattgc cataccgtag ttagcatatg tagtgttaga tagtaagtgc 60
aatct 65

〈210〉 17

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

10

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 17

ataccagctt attcaattgc gccttaaat ataacccgag tgctttgtt gaactggtgt 60
tccggatggc ctgigtttag atagtaatgt caatct 96

〈210〉 18

〈211〉 96

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

20

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 18

ataccagctt attcaattgc ttgcattgtc attatgaggt ggattcaact gtttttgact 60
ttttccccctt ggacgctgag atagtaagtg caatct 96

〈210〉 19

〈211〉 95

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 19

ataccagctt attcaattgg ttaccattct ggtgggaccc gtgttgccctg gatgtgtttt 60

agtttttttg gtgttttaga tagtaagtgc aatct 95

10

〈210〉 20

〈211〉 95

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

20

〈400〉 20

ataccagctt attcaattgg ttggagacct tattggcagc atgcagggcc ctcaagtgtg 60

caaccccggt ttccgttaga tagtaagtgc aatct 95

20

〈210〉 21

〈211〉 68

〈212〉 DNA

〈213〉 人工配列

30

〈220〉

〈223〉 ヌクレオチド配列

〈400〉 21

ataccagctt attcaattca cacatgcgcc ttagttagcc ctggtttgtg agatagtaag 60

tgcaatct 68

【図1】

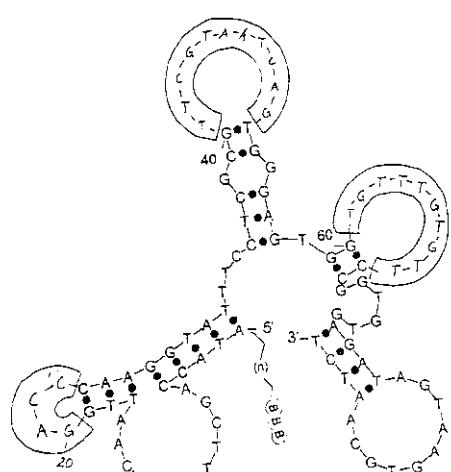


図1

【図2】

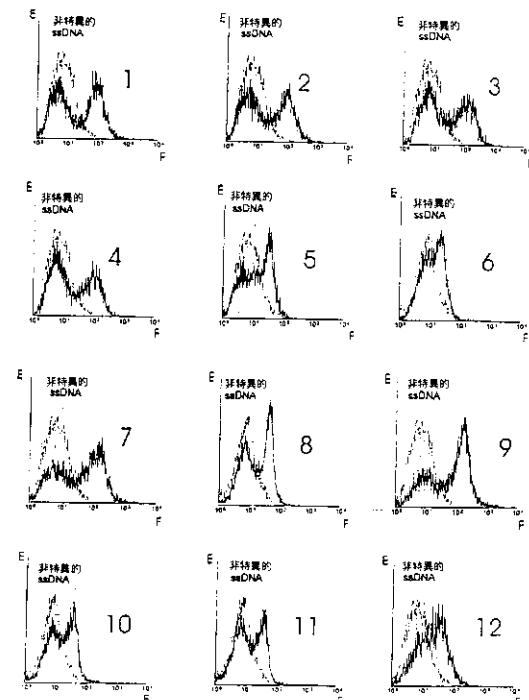


図2

【図3】

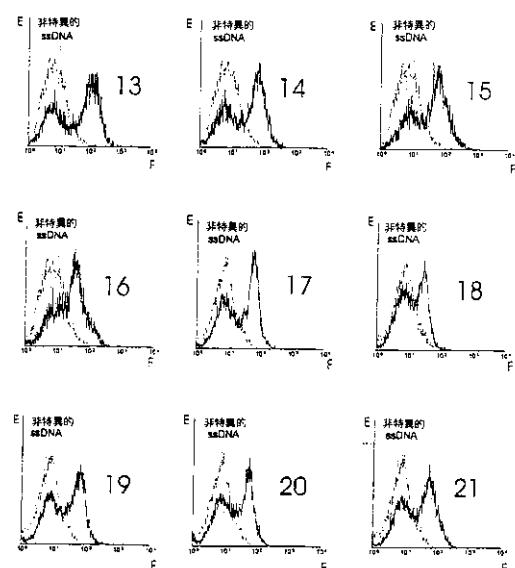


図3

【図4】

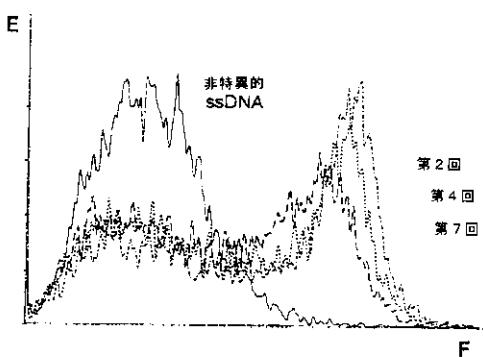


図4

【図5】

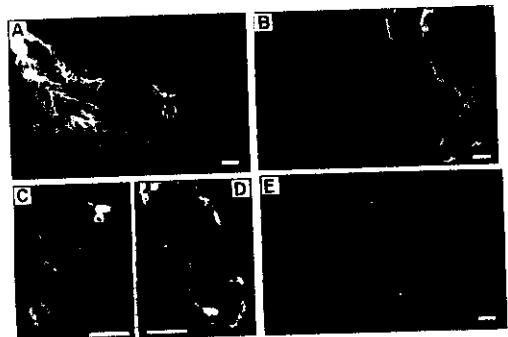


図5

【図6】

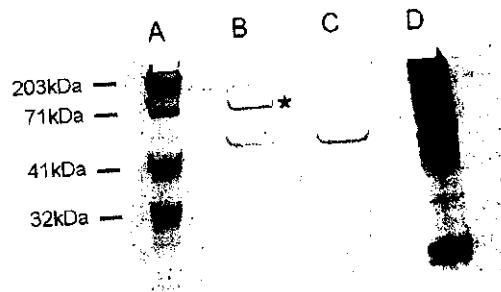


図6

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(23) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/79538 A2

(51) Internationale Patentklassifikation*: C12Q 1/68,
C07H 21/04

BLANK, Michael (DE/DE); Alexanderstr. 80, 70182
Stuttgart (DE)

(21) Internationales Anmeldzeichen: PCT/EP01/04340

(74) Anwälte: OFFEN, Hajo asw.; Wink, Weller & Partner,
Postfach 108462, 70047 Stuttgart (DE)

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. April 2001 (17.04.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR)

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
(100) 19 154.1 18. April 2000 (18.04.2000) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): EBERHARD-KAELS-UNIVERSITÄT
TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM (DE/DE);
Gelbweg 3, 72076 Tübingen (DE).

Veröffentlichung:
ohne internationale Recherchebericht und seinen zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder: und
(75) Erfinder/Anmelder nur für US: SCHLÜSENER, Her-
mann (DE/DE); Hauser Str. 15, 72076 Tübingen (DE).



A2

(54) Titel: CELL-BINDING NUCLEIC ACID MOLECULES (APTAVERS)

(54) Bezeichnung: ZELLBINDENDE NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE (APTAVERS)

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid molecules which selectively bind to endothelial cells or which label the same, to methods for detecting a tumor disease, and to nucleic acid molecules used in said methods. The invention additionally relates to the use of the nucleic acid molecules.

(57) Zusammenfassung: Es werden Nukleinsäuremoleküle beschrieben, die selektiv an Endothelzellen binden oder diese mar-
kieren, sowie Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung und in den Verfahren verwendete Nukleinsäuremoleküle. Des-
weitern wird die Verwendung der Nukleinsäuremoleküle beschrieben.

WO 01/79538

Zellbindende Nukleinsäuremoleküle (Aptamere)

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die selektiv an Endothelzellen binden oder diese markieren, Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung, die in den Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, sowie die Verwendung der Nukleinsäuremoleküle.

Solche Verfahren, sowie die darin verwendeten Nukleinsäuremoleküle, die auch als Aptamere bezeichnet werden, sind bekannt. In Osborne et al., "Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects", Curr. Opin. Chem. Biol. 1997, 1: 5-9, befindet sich ein entsprechender Überblick.

Aptamere sind hochaffine RNA- und DNA-Oligo- bzw. Polynukleotide, die aufgrund ihrer spezifischen räumlichen Struktur eine hohe Affinität zu einem Zielmolekül besitzen. Um solche Aptamere zu finden, wird häufig ein kombinatorischer Ansatz genutzt, bei dem nach dem Zufallsprinzip eine große Zahl von Oligonukleotiden unterschiedlichster Sequenz und Sekundärstruktur enzymatisch erzeugt wird, aus denen Oligonukleotide mit hoher Affinität zu einem Zielmolekül herausgesucht und angereichert werden. Diese Technik wird auch SELEX ("systematic evolution of ligands by exponential enrichment") genannt.

Bei Kenntnis der Primärstruktur eines solchen Oligo-/Polynukleotids (Aptamers), kann dieses auch synthetisiert werden, z.B. durch Verwendung eines DNA-/RNA-Synthesizers.

Zielstrukturen für Aptamere können Rezeptoren und andere Proteine, Lipid- oder Kohlenhydratstrukturen sein. Es wurden auch schon hochaffine Aptamere gegen kleine Moleküle wie gegen Theophyllin, siehe Jenison et al., "High-resolution molecular discrimination by RNA", *Science* 1994; 263 (5152): 1425-9, gegen ATP von Tang et al. "Rational design of allosteric ribozymes", *Chem. Biol.* 1997; 4 (6): 453-9, und gegen Arginin gefunden, siehe Geiger et al., "RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantio-selectivity" *Nucl. Acids Res.* 1996; 24 (6): 1029-36. Ebenso konnten proteinbindende Aptamere, die in ihrer natürlichen Umgebung normalerweise keine Nukleinsäuren binden, gefunden werden. Morris et al., "High affinity ligands from in vitro selection: Complex targets"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 2902-2907, gelangen die Entwicklung von Aptameren, die gegen Zellmembranen gerichtet sind.

Nachteilig bei dem derzeitigen Stand der Technik ist, daß durch die Autoren der zitierten Publikationen keine vollständigen Sequenzen der Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt werden, die an komplexes biologisches Material binden oder dieses markieren. Morris et al., die sich mit der Markierung von höhermolekularen Strukturen beschäftigen, geben lediglich Sequenzmotive an. Nukleinsäuremoleküle, die solche Sequenzmotive enthalten, binden gemäß dieser Veröffentlichung an künstlich erzeugte Vesikel aus Erythrozytenzellmembranen (Erythrozyten-Ghosts).

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein weiteres Nukleinsäuremolekül der eingangs genannten Art bereitzustellen, insbesondere ein solches, das in der Lage ist, selektiv an Endothelzellen zu binden oder diese zu markieren.

Erfnungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Nukleinsäuremolekül zumindest eine der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird dadurch vollkommen gelöst. Die Erfinder haben nämlich erkannt, daß Nukleinsäuremoleküle, die zumindest eine der vorstehenden Nukleotidsequenzen enthalten, natives biologisches Material, nicht lediglich durch technische Methoden erzeugte Teile eines solchen, und speziell Endothelzellen erkennen und binden. Nukleinsäuremoleküle, die eine der aufgeführten Sequenzen enthalten, zeichnen sich nach Erkenntnis der Erfinder durch hohe Spezifität für das verwendete biologische Material aus.

Bevorzugt ist es jedoch, wenn das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül mit einer der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll ist.

Aus den Daten der Erfinder hat sich ergeben, daß bei Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls mit einer der beanspruchten Nukleotidsequenzen in dem eingangs erwähnten Verfahren die zugrunde liegende Aufgabe der Erfindung vollständig gelöst wird. Überraschenderweise sind die durch die Nukleotidsequenzen vorgegebenen Sekundärstrukturen der Nukleinsäuremoleküle ausreichend, um eine hochspezifische Bindung an das biologische Material zu vermitteln.

Weiter ist es bevorzugt, wenn in dem Nukleinsäuremolekül in dessen nicht-funktionellen Abschnitten zumindest ein Nukleotid ersetzt ist oder fehlt.

Die Erfinder haben nämlich erkannt, daß für eine selektive Bindung an eine biologische Struktur bestimmte funktionelle Bereiche innerhalb einer Sequenz des spezifischen Nukleinsäuremoleküls verantwortlich sind. Diese Bereiche liegen bei den zu Sekundärstrukturen gefalteten Sequenzen in den sogenannten "hairpin loops" oder "bulgs". Bei Übereinstimmung der Basensequenzen innerhalb dieser funktionellen Bereiche können zwei Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere, die sich in ihrer Sequenz in nicht funktionellen Abschnitten voneinander unterscheiden, an die gleiche Struktur binden. Solche Unterscheidungen umfassen sowohl Nukleotidaustausche als auch Deletionen einzelner oder mehrerer Nukleotide, sowie Strangverkürzungen oder terminale Veränderungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren, in dem selektiv Endothelzellen gebunden oder markiert werden, worin hierfür ein Nukleinsäuremolekül verwendet wird, das eine der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 enthält, wobei auch hier hinsichtlich dieser Sequenzen Sequenzvariationen umfaßt sind, bei denen in den nicht-funktionellen Abschnitten der Nukleinsäuremoleküle zumindest ein Nukleotid ersetzt ist oder fehlt.

Die Sequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 binden spezifisch an Endothelzellen. Diese, die luminaire Seite von Blutgefäßen auskleidenden Zellen spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese, Angiogenese und der Transcytose von Stoffen über Blut-Gewebebarrieren. In diesem Zusammenhang ist das Verfahren besonders zum Studium der Differenzierung von Endothelzellen sowie zum Markieren von tumorversorgenden Blutgefäßen oder entzündlichen endothellspezifischen Läsionen geeignet.

Bevorzugt ist es auch, wenn das Nukleinsäuremolekül an ein Therapeutikum gekoppelt ist.

Die beanspruchten Nukleinsäuremoleküle haben das Potential, als zielgerichteter Carrier für den Transport von Therapeutika an ihren Zielort zu fungieren. Durch solch einen zielgerichteten Einsatz von Therapeutika erhoffen sich die Erfinder vor allem eine Reduzierung der Dosierung bzw. eine drastische Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen, da durch solch ein "Drug-Targeting" die ungewollte Wechselwirkung mit nicht-pathogenen Strukturen weitgehend vermieden wird.

Als Zielstrukturen kommen besonders tumoröse Gewebe in Betracht. Durch neuere Studien aus der Krebsforschung hat sich nämlich ergeben, daß die Unterbrechung der Blutversorgung eines Tumors ein vielversprechender Ansatz für eine Therapie darstellt (Übersichtsartikel in Cherenk, D. A., "Death to a blood vessel, death to a tumor", Natl. Med. 1998, 4 (4):395-6; Molema et al., "Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply", Immunol. Today 1998, 19 (9):392-4). Auch ein solches Verfahren läßt sich mit den neuen Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft realisieren.

Während der Studien, die zu der vorliegenden Erfindung führten, haben die Erfinder herausgefunden, daß mittels eines Nukleinsäuremoleküls, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält, selektiv tumorspezifische Strukturen erkannt werden. Dadurch wird mittels dieses Nukleinsäuremoleküls eine hochspezifische Diskriminierung entarteten Tumorgewebes von gesundem Gewebe möglich. Die Erfinder stellen somit ein Werkzeug bereit, durch dessen Verwendung eine zuverlässige Basis für eine entsprechende zielgerichtete Therapie geschaffen wird.

In diesem Zusammenhang ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung auch die Verwendung eines solchen Nukleinsäuremoleküls, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält oder daraus besteht, zum Nachweis einer Tumorerkrankung, sowie ein entsprechendes Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung, mit den Schritten:

- a) Bereitstellen von biologischem Material,

- b) Nachweis eines Tumormarkers, wobei der Nachweis mit einem Nukleinsäuremolekül erfolgt, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält oder daraus besteht.

Weitergehende Studien der Erfinder haben ergeben, daß durch das Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll die Diskriminierung von Tumorgewebe gegenüber gesundem Gewebe über das Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt. Bei diesem Protein handelt es sich um ein bisher relativ unbekanntes endotheliales Protein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa. Auch dessen Assoziation mit Tumorgewebe war bis dato unbekannt. So wurde dieses Protein bisher als ein kohlenhydratbindendes Protein mit RNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomänen beschrieben, das möglicherweise mit der Kernmembran assoziiert ist; siehe z.B. Alliegro et al., "Protein Heterogeneity in the Coiled Body Compartment", Experimental Cell Research 239, 60-68 (1998).

Vor diesem Hintergrund ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung sowohl die Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält, zum Nachweisen einer Tumorerkrankung, wobei der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt, als auch allgemein ein Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung, wobei der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt.

Des weiteren besteht eine Anwendung der beanspruchten Nukleinsäuremoleküle in dem Transport von Therapeutika an entzündliche

endotheliale Läsionen. Mögliche Therapeutika sind deshalb z.B. antiangiogenetische oder antiinflamatorische Substanzen.

Durch Verlängerung der beanspruchten spezifischen Nukleinsäuremoleküle mit funktionstragenden DNA-Segmenten können lokal wirksame Immuntherapeutika hergestellt werden. Hier ist besonders an die Verwendung sogenannter CpG-Oligos gedacht, die profunde immunstimulierende Aktivität haben.

Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben erstmals erkannt, daß die beanspruchten Nukleinsäuremoleküle zur Therapie der erwähnten Krankheitsbilder verwendet werden können.

Besonders bevorzugt ist es auch, wenn das Nukleinsäuremolekül an ein Diagnostikum gekoppelt ist.

Solch modifizierte Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere haben gegenüber dem in der Diagnostik und auch in dem oben erwähnten "Drug-Targeting" üblicherweise verwendeten monoklonalen Antikörpern eine Vielzahl von Vorteilen. Aufgrund der sequenzbedingten Ausbildung von Sekundärstrukturen ist das Repertoire an potentiell bindenden Liganden wesentlich größer als das verfügbare Immunrepertoire zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern.

Des weiteren sind Aptamere wesentlich schneller und kostengünstiger zugänglich. Innerhalb von drei bis vier Wochen lassen sich Millionen potentieller Liganden untersuchen. Im Gegensatz hierzu muß die Herstellung von antikörperproduzierenden Hybridomzellen über Impfungen von Versuchstieren verlaufen. Diese

Impfungen dauern mehrere Wochen. Zusätzlich sind Monate erforderlich, um einige hundert Hydridomzelllinien zu untersuchen.

Da im Organismus keine extrazellulären Oligo-/Polynukleotide bekannt sind, die aufgrund ihrer Struktur Funktionen ausüben, haben solche Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere außerdem das Potential "ungewöhnliche" Epitope zu erkennen, die sich der Erkennung durch Antikörper und somit dem "üblichen" Immunsystem entziehen.

Ein besonderer Vorteil der beanspruchten Nukleinsäuremoleküle besteht darin, daß diese die Bindungsspezifität und Affinität von guten monoklonalem Antikörpern erreichen. Sie sind somit besonders geeignet, in einem Diagnoseverfahren oder einem Verfahren zum "Drug-Targeting" eingesetzt zu werden. Hinsichtlich eines Diagnoseverfahrens wird vor allem an ein Verfahren gedacht, bei dem das Diagnostikum außerhalb des menschlichen Körpers verwendet wird.

Im Rahmen eines diagnostischen Verfahrens eignen sich als Diagnostikum besonders fluoreszierende Verbindungen, z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Biotin, Digoxigenin und deren Abkömmlinge, enzymatische Marker, Infrarot-Marker und Chelatbildner. Deshalb ist besonders ein Verfahren bevorzugt, bei dem das an das Nukleinsäuremolekül gekoppelte Diagnostikum aus der Gruppe ausgewählt ist, die die vorstehenden Substanzen enthält.

Bestandteil der Erfindung ist des weiteren die Verwendung der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle für histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten.

Die Erfinder haben erkannt, daß der direkte Einsatz der beanspruchten Nukleinsäuremoleküle als histologisches Agens möglich ist, was eine *in situ*-Lokalisation der biologischen Zielstruktur innerhalb des Gewebes erlaubt. Der besondere Vorteil solch einer Verwendung liegt in der eingangs erwähnten Spezifität der beanspruchten Nukleinsäuremoleküle für komplexes biologisches Material, vorzugsweise Endothelzellen. Dies ermöglicht eine gezielte Anfärbung dieser Strukturen ohne störende Hintergrundsignale oder unspezifische Kreuzreaktionen.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der vorstehenden Nukleinsäuremoleküle in einem der beschriebenen Verfahren, wenn die Nukleinsäuremoleküle selektiv an natives komplexes biologisches Material binden.

Die Erfinder stellen erstmals Nukleinsäuremoleküle bereit, die an komplexe native biologische Strukturen bzw. Endothelzellen binden. Die von Morris et al. bereitgestellten Sequenzmotive, die Bestandteile der dort verwendeten Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere sind, binden hingegen an künstlich erzeugte Vesikel aus Erythrozytenzellmembranen. Die Integrität derart erzeugter Membranen entspricht nicht zwangsläufig der von physiologischen Erythrozytenzellmembranen. Ungeeignet ist hier auch die Wahl von Erythrozytenbestandteilen als Modell für eine komplexe biologische Struktur. Erythrozyten zeichnen sich durch einen hohen Differenzierungsgrad aus. Sie unterscheiden sich in einer Vielzahl von Eigenschaften von anderen typischen Zellen eines Organismus: keine Proteinsynthese, keine Einbindung in ein Zellverband, hohe Spezialisierung hinsichtlich Sauerstofftransport etc.

Die Erfinder haben zur Selektion ihrer spezifischen Nukleinsäuremoleküle als biologisches Material native Zellen einer Endothelzelllinie verwendet. Dies hat den Vorteil, daß diese Nukleinsäuremoleküle auch *in vivo* zuverlässig eingesetzt werden können.

Die Erfinder haben zur Anreicherung funktioneller Nukleinsäuremoleküle ein Verfahren verwendet, mit den Schritten:

- a) Inkubation einer Bibliothek von unterschiedlichen Nukleinsäuremolekülen mit einer Zielstruktur;
- b) Selektion und Anreicherung der funktionellen Nukleinsäuremoleküle;
- c) Isolierung der selektierten Nukleinsäuremoleküle, wobei zur Kontrolle der Anreicherung eine Fluoreszenzmarkierung der selektierten Nukleinsäuremoleküle verwendet wird.

Die Erfinder haben nämlich erkannt, daß zum Auffinden von spezifischen Nukleinsäuremolekülen bzw. Aptameren die Anreicherung der selektierten Nukleinsäuremoleküle nicht wie üblich durch Radioaktivmarkierung erfolgen muß, sondern daß hier eine Fluoreszenzmarkierung in Kombination mit geeigneten Detektionsverfahren verwendet werden kann. Es war nicht zu erwarten, daß durch solch eine Fluoreszenzmarkierung, die vorzugsweise am 5'- oder 3'-Ende der Sequenz erfolgt, die spezifischen Bindeeigenschaften der funktionellen Nukleinsäuremoleküle erhalten bleiben können. In den bis dato durchgeföhrten bekannten Verfahren wurde die Anreicherung funktioneller Nukleinsäuremoleküle in den Pools der fortschreitenden Selektionsrunden ausschließlich

durch Scintillationsmessung der während der Anreicherung einge-bauten radioaktiven dNTPs kontrolliert.

Die mit radioaktiven Arbeiten verbundenen Konsequenzen sind allgemein bekannt: Einrichtung eines speziellen Isotopenlabors, problematische Abfallentsorgung, strenge Vorschriften zur Lie-ferung und Lagerung des radioaktiven Materials, gesundheitliche Risiken, hohe Kosten, etc. Diese Probleme lassen sich durch den Einsatz alternativer Detektionstechniken, wie der Fluoreszenz-markierung, umgehen.

Das neue Anreicherungsverfahren hat sich sehr ökonomisch erwie-sen. Es erlaubt nicht nur die gleichzeitige Selektion gegen multiple Targets, die in ihre natürliche Umgebung aus ganzen Endothelzellen eingebettet sind, durch repetitive Zyklen von FACS-Messungen. Vielmehr ist auch eine *in situ*-Evaluierung von individuellen, spezifisch bindenden Aptameren mit Fluoreszenz-markierung durch FACS möglich.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nach-stehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen erläutert, aus denen sich weitere Merkmale und Vorteile ergeben.

Die beigefügten Abbildungen dienen der Beschreibung der Erfin-dung. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur eines spezifischen Nukleinsäuremoleküls bzw. Aptamers,

Fig. 2+3 die Charakterisierung der beanspruchten Nukleinsäuremoleküle mittels Durchflusscytometrie,

Fig. 4 die Anreicherung der spezifischen Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere in den Pools der fortschreitenden Selektionsversuchen,

Fig. 5 die Anfärbung von Ratten-Glioblastom-Cryostat-Gewebeabschnitten mit dem Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9, und

Fig. 6 Coomassie-Blau gefärbtes Polyacrylamidgel zur Analyse des durch das Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 erkannten Targets.

Beispiel 1: Endothelzellen als biologische Zielstruktur

Als Zielstruktur für die Selektion der spezifischen Aptamere wird die Zelllinie YPEN-1 (CRL-2222, American Type Culture Collection, Manassas, USA), eine endotheliale Prostatazelllinie der Ratte, verwendet. Die Zellen werden durch Abschaben der subkulturenten Endothelzellschicht geerntet. Die Konzentration der Zellen wird durch Zählen der Anzahl intakter Zellen nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählnadel geschätzt.

Beispiel 2: Start-(ssDNA-)Bibliothek und Primer

Die synthetische Start-Bibliothek (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland), aus der die spezifischen Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere selektiert werden, besteht aus näherungsweise 96mer Polynukleotiden, wobei um die 60 zufallssequenzierte Basen (60N) von jeweils 18 Nukleotiden definierter Sequenz, den Primerhybridisierungsstellen, flankiert werden (5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-[60N]-AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'). Zur Amplifizierung spezifischer Nukleinsäuremoleküle mittels der unten aufgeführten PCR werden FITC-markierte und Biotin-markierte, HPLC gereinigte Primer (5'-FITC-18C-ATA CCA GCT TAT TCA ATT-3' und 5'-BBB-AGA TTG CAC TTA CTA TCT-3') verwendet, wobei 18C für einen 18-Carbonethylenglycol-Spacer, "FITC" und "B" für ein FITC-Molekül bzw. Biotin-Molekül steht), die mittels Festphasen-Synthese synthetisiert werden (Operon Technologies, Inc., Alameda USA).

Beispiel 3: Gewinnung von endothelzellspezifischen Nukleinsäuremolekülen bzw. Aptameren

zur Gewinnung der spezifischen Nukleinsäuremoleküle ist eine Selektion über mehrere Runden notwendig.

Die folgenden Schritte werden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt.

Erste Runde

Ca. 1,7 nmol der DNA aus der Startbibliothek aus Beispiel 2 (1×10^{15} Sequenzen) werden in Selektionspuffer (50 mM Tris-HCl

(pH 7,4), 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 % NaN₃) gelöst (1 ml in der ersten Runde, 200 µl in den folgenden Runden). Die DNA wird denaturiert (80°C, 10 min) und bei 0°C für 10 min renaturiert. Um eine unspezifische Anlagerung der Polynukleotide an Zelloberflächen und Reaktionsgefäßwände zu verringern, wird jeweils ein 5-molarer Überschuss an tRNA (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und Kinderserumalbumin (BSA) zugegeben. Die DNA-Lösung wird mit 3 × 10⁷ N9-Mikrogliazellen für 30 min bei 37°C / 5 % CO₂ präinkubiert, um DNA-Moleküle mit hoher Affinität zu irrelevanten Oberflächenproteinen zu entfernen.

Die Mikrogliazellen werden abzentrifugiert und der Überstand wird mit 10⁶ YPEN-Endothelzellen bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen durch Zentrifugation mit jeweils 1 ml Selektionspuffer (plus 0,2 % BSA), werden die endothelzellgebundenen Nukleinsäuremoleküle als Template benutzt, um Aptamere mittels PCR zu amplifizieren (Taq-Polymerase und dNTPs stammen von Promega, Mannheim, Deutschland).

Die PCR erfolgt unter Bedingungen nach Crameri und Stemmer, "10(20)-fold aptamer library amplification without gel purification", Nucl. Acids Res. 1993; 21(18): 4410. Als Primer werden die oben beschriebenen FITC- und Biotin-markierten Primer verwendet.

Gewinnung FITC-markierter Einzelstränge

Zur fluoreszenzytometrischen Analyse wird FITC-markierte ssDNA wie folgt dargestellt: FITC-konjugierte ssDNA wird vom biotinierten Strang durch Isolierung der PCR-dsDNA-Produkte mit der entsprechenden Menge an magnetischen Streptavidinbeads

(Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal Hamburg, Deutschland) in einem Magnetständer, gefolgt von alkalischer Denaturierung gemäß den Anweisungen des Herstellers, gereinigt und in einem Endvolumen von 200 µl Selektionspuffer aufgenommen. Die vorliegenden ssDNA-Lösung dient als Pool für die jeweils folgende Selektionsrunde.

Zweite und dritte Selektionsrunde

Der neue FITC-ssDNA-Pool wird erneut gegen Mikroglia in Polystyren-Reaktionsgefäßern präinkubiert. Die Selektion erfolgt (ebenfalls in Polystyren-Reaktionsgefäßern) gegen $1,5 \times 10^5$ Endothelzellen. Nach 30 min Inkubation bei 37°C werden die Zellen durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Selektionspuffer plus 0,2 % BSA von weniger spezifisch bindender DNA sowie von Sequenzen, deren 5'-Modifikation zu Bindungsverlust führt, befreit. Die Fluoreszenz der Endothel-Nukleinsäuremoleküle-Komplexe wird am Durchflußzytometer (FACS) gemessen. Die Amplifizierung der ssDNA erfolgt wie in der vorangegangenen Runde.

Vierte bis achte Selektionsrunde

Nach erneuter Präinkubation gegen Mikroglia (wie bereits beschrieben) erfolgt die Selektion gegen 1×10^5 Endothelzellen.

Das Ausscheiden von Separationsmatrix-bindenden Sequenzen wird durch Austausch des Polystyren-Reaktionsgefäßes gegen ein Polypropylen-Reaktionsgefäß gewährleistet. Der 30-minütigen Inkubation mit dem Waschen der Zellen (wie in den vorangehenden Runden) folgt wiederum die Bestimmung der Fluoreszenzintensität am Durchflußzytometer (Zählen von 5.000 Zellen pro Selektionsrun-

de). Zellgebundene Nukleinsäuremoleküle werden, wie bereits beschrieben, PCR-amplifiziert.

Gewinnung einzelner Klone aus dem Pool der Runde 8

Die spezifischen Nukleinsäuremoleküle aus der siebten Selektionsrunde (Runde 8. Pool) werden mit unmodifizierten Primern PCR-amplifiziert und in *E. coli* kloniert (TA-Cloning; Invitrogen Groningen, Niederlande). Die Plasmide der einzelnen Klone werden durch alkalische Lyse isoliert und das Insert (PCR-Produkt) wie in den Selektionsrunden mit den modifizierten Primern PCR-amplifiziert. Die Einzelstranggewinnung erfolgt wie bereits beschrieben.

Mit Hilfe dieser FITC-Aptamer-Lösungen erfolgt die Charakterisierung der Bindungsspezifität individueller Sequenzen mittels Durchflußzytometrie (FACS) und histologischen Bindestudien.

FACS-Messung

Sowohl die spezifische Bindung der Aptamere in den fortschreitenden Selektionsrunden als auch die spezifische Bindung der einzelnen Klone werden am FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) gemessen.

Zellen (als signalgebende Ereignisse) emittieren proportional zu der Intensität ihrer Fluoreszenzmarkierung elektromagnetische Strahlung. Diese Strahlung wird detektiert und quantifiziert. Sie erlaubt somit Rückschluß auf die Menge an zellgebundenen, fluoreszenzmarkierten Liganden. In einem Histogramm wird die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der signalgebenden

Ereignisse aufgetragen. Eine starke Ablenkung in Richtung zunehmender Fluoreszenz ist somit ein Maß für eine hohe Affinität der spezifischen Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere zu dem verwendeten biologischen Targetmaterial bzw. zu den hier verwendeten Endothelzellen.

- (a) FACS-Analyse von FITC-gekoppelten Aptameren in den fortschreitenden Selektionsrunden

Das spezifische Binden von FITC-gekoppeltem Aptamer wird in der zweiten und in den folgenden Selektionsrunden gemessen. Nach der Inkubation der Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere mit den Endothelzellen (wie oben beschrieben) werden die Endothelzellen zweimal mit Selektionspuffer (plus 0,2 % BSA) gewaschen und die Zellfluoreszenz am FACS gemessen.

- (b) FACS-Analyse der spezifischen Bindung der einzelnen FITC-gekoppelten Klone

Dazu werden 5×10^4 YPEN-Endothelzellen mit Selektionspuffer (plus 1 µg/µl tRNA; 20 min; 0°C) präinkubiert und mit der oben beschriebenen FITC-ssDNA-Lösung inkubiert (plus 1 µg/µl tRNA; 37°C / 5 % CO₂ / 30 min). Die Zellen werden zweimal mit Selektionspuffer (plus 0,2 % BSA) gewaschen und die Zell-Fluoreszenz am FACS gemessen.

Histologische Bindestudien an Gewebeabschnitten

Die Bindung der gewonnenen individuellen FITC-modifizierten Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere wird durch histologische Bindestudien an Ratten-Glioblastom-Cryostat-Gewebeabschnitten ge-

testet. Die Gewebeschnitte werden mit 1 µg/µl tRNA im Selektionspuffer präinkubiert (20 min, 4°C). Die präinkubierten Gewebeschnitte werden mit der oben beschriebenen FITC-Aptamer-Lösung (plus 1 µg/µl tRNA) bedeckt und bei Raumtemperatur 40 min inkubiert. Die Gewebeschnitte werden zweimal mit Selektionspuffer gewaschen und die Immunfluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

Die gefundenen hochspezifischen Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere zeichnen sich dadurch aus, daß diese selektiv die neu formierten Mikrogefäße des Glioblastomgewebes anfärben und minimale Kreuzreaktion mit anderen nicht-endothelialen Strukturen zeigen. Die Nukleinsäuremoleküle sind somit besonders geeignet, als histologische Sonden zur Anfärbung von Endothelzellen eingesetzt zu werden.

Beispiel 4: Spezifische Nukleinsäuremoleküle bzw. Aptamere gegen (endothelzell-)spezifisches Antigen

Die folgenden Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des vorstehenden Verfahrens gewonnen und sind Bestandteil der vorliegenden Erfindung. Die Primerhybridisierungsstellen liegen 5'- und 3'-wärts der eigentlichen Aptamersequenzen (fett gedruckt).

Nukleinsäuremolekül 1 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGA CCC AAG GTA TTT CCT CGC GTT CGT
AAT CAG TGG GAG TGG TGT TTG TGT TCC GGT GTG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 2 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CTA CCA GAC TGT CTT TCA CCC TGC GCC
GTT GTG GTC TGT TCG TTG TTC TAG TTG TTT TC AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 3 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GTC AGC TTT TTA GTG ATT TTG GGT TTT
TTG GTG TAC GTC CCT GTA AAT HAG TTT CAG TCG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 4 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GAG TGC TGA TTC CCG TTT CTC TCT GGT
ATC GAA TTG AGG TCG TTT GTG TGT CAG TTG GCT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 5 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCA ACA CCA TAA CCT TTC TTT GAC CTG
ACT TTA GCC GTA ATG TAT TTG GGC CAT CCC CTT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 6 (Primärstruktur)

WO 01/79538

21

PCT/EP01/04340

5'---ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGG TGG AGA TAG TAG GTG CAA TCT ATA
CCA GCT TAT TCA ATT GCC CCG ATT TGG ATG TAA TTA TTG CGC GTG TAT
TTT TGA TTG TAT AAA GTG TTG CTA CA AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 7 (Primärstruktur)

5'---ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGG CAG ATG AGA AGT TAA GGC GGT GCT
ATA GAT GGA CCA TTT AGG ATT TTA TGG TTG GGC GT AGA TAG TAA GTG
CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 8 (Primärstruktur)

5'---ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCC GCC TTT ACT TGG GAG ATT ATC ACC
GCG GTA TAT AAA TAC TGT TCG GAG TTC TGT GT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 9 (Primärstruktur)

5'---ATA CCA GCT TAT TCA ATT AGG CGG TGG ATT GTG GTT GGT AGT ATA
CAT GAG GTT TGG TTG AGA CTA GTC GCA AGA TAT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT---3'

Nukleinsäuremolekül 10 (Primärstruktur)

5'---ATA CCA GCT TAT TCA ATT CTG TTG GAC ATT CAA AAG ACT AGT AGT TCA
CGT CCG TTG CCC ATT CTT CCC TTT GTT GAC TGC T AGA TAG TAA GTG
CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 11 (Primärstruktur)

WO 01/79538

22

PCT/EP01/04340

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT CGG CTA CGC TCC ATT AAG GGT GAC TTA
TGG CCC AAA GTC CCG TGC TTG TTC GTG TGG GTG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 12 (Primärstruktur)

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT CCA AAG GTA AAC CGC ATA ATA AGG GTA
TGT ATT AAA TTG TGT GGT GAT GAC TGA TGC CAT A AGA TAG TAA GTG
CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 13 (Primärstruktur)

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT GAG GAT CAC CTG CTC TGC CAC CCT TTT
TAA CGT GGG GTT ACA TTT GCT GAA GGG CTT G AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 14 (Primärstruktur)

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT GTC CCA GCC GAG ATC TTT TTT GAC GAT
ATG TGT TTT TTT TGA GGT GTT GAG TTT AGT GTG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 15 (Primärstruktur)

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCG ATA AAT TTT GCT AAG TGC GGT CAA
GAC TGT GTT CGT GT AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 16 (Primärstruktur)

WO 01/79538

23

PCT/EP01/04340

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCC ATA CCG TAG TTA GCA TAT GTA GTG
TT AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 17 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCG CCT TTA RAT ATA ACC CGA GTG CTT
TGT TTG AAC TGG TGT TCC GGA TGG CCT GTG TTG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 18 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCT TGC ATC GTC ATT ATG AGG TGG ATT
CAA CTG TTT TTG ACT TTT TGC CCC TGG ACG CTG AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 19 (Primärstruktur)

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGT TAC CAT TCT GGT GGG ACC CGT GTT
GCC TGG ATG TGT TTT AGT TTT GGT GTT TT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 20 (Primärstruktur)

5'ATA CCA GCT TAT TCA ATT GGT TGG AGA CCT TAT TGG CAG CAT GCA
GGG CCC TCA GCT GTG CAA CCC CGG TTT CCG TT AGA TAG TAA GTG CAA
TCT-3'

Nukleinsäuremolekül 21 (Primärstruktur)

5'--ATA CCA GCT TAT TCA ATT CAC ACA TGC GCC TTA GTT AGC CCT GGT
TGT TG AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

Beispiel 5: Modell der Struktur eines spezifischen Nuklein-säuremoleküls bzw. Aptamers

Fig. 1 stellt die Sekundärstruktur einer hypothetischen spezi-fischen Nukleotidsequenz bzw. Aptamersequenz dar. Die aktiven Bindestellen, die sich innerhalb verschiedener sogenannter "hairpin loops" bzw. "bulgs" befinden, sind hervorgehoben. Das dargestellte Nukleinsäuremolekül ist am 5'-Ende über einen Linker-Abschnitt (n) biotin-markiert (BBB). Ausgefüllte Kreise symbolisieren Basenpaarungen. Positionsangaben kennzeichnen die Lage der Nukleotide im Molekül.

Beispiel 6: Histogramme der beanspruchten Nukleinsäure-moleküle

In Fig. 2 und 3 sind die FACS-Histogramme der gefundenen Nu- kleinsäuremoleküle dargestellt. Auf der horizontalen Achse ist die Fluoreszenzintensität (F) in willkürlichen logarithmischen Einheiten aufgetragen, die vertikale Achse zeigt die Anzahl der signalgebenden Ereignisse (E), aufgetragen in willkürlichen li-nearen Einheiten. Die Histogramme demonstrieren die Spezifität der Bindung der Nukleinsäuremoleküle SEQ ID Nr. 1 bis 21 an die Zielstruktur. Die Verschiebung der Histogramm-Kurve der Nu- kleinsäuremoleküle (SEQ ID Nr. 1 bis 21, fett gedruckt) in Richtung zunehmender stärkerer Fluoreszenz zeigt die hohe Affi-nität dieser Moleküle zur Zielstruktur im Vergleich zur Refe-renz. Als Referenz ist jeweils das Fluoreszenzsignal bei Ver-wendung von unspezifischer gleichartig FITC-gekoppelter Einzel-

strang-DNA (unspez. ssDNA, grau gedruckt) dargestellt. Alle 21 Nukleinsäuremoleküle sind somit durch eine hohe Affinität zu den verwendeten Endothelzellen charakterisiert.

Beispiel 7: Histogramme der Nukleinsäuremoleküle in den komplexen Pools der Selektionsrunden

In Fig. 4 sind die FACS-Histogramme der Aptamer-Pools aus der zweiten (----), vierten (.....) und siebten (- - - - -) Selektionsrunde überlagert dargestellt. Die Verschiebung der Histogramm-Kurve der dargestellten Selektionsrunden in Richtung zunehmender stärkerer Fluoreszenz verbildlicht die Zunahme spezifisch bindender Nukleinsäuremoleküle (Aptamere) in den Pools der voranschreitenden Selektionsrunden. Als Referenz ist das Fluoreszenzsignal bei Verwendung von unspezifischer gleichartig FITC-gekoppelter Einzelstrang-DNA (unspez. ssDNA, grau gedruckt) dargestellt.

Beispiel 8: Charakterisierung des Nukleinsäuremoleküls mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 als tumor- und 'pigpen'-spezifisches Aptamer

In von den Erfindern durchgeführten histologischen Biestudien, die am Ende des Ausführungsbeispiels 3 beschrieben sind, hat sich herausgestellt, daß das Nukleinsäuremolekül mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 auf Gewebeschnitten von Ratten-Glioblastomen von sämtlichen neuen Nukleinsäuremolekülen das stärkste Fluoreszenzsignal, und zwar spezifisch in Bereichen starken Tumorwachstums, zeigt. Dies ist in der Fig. 5 dargestellt. Hier ist in der Teilabbildung A die selektive Anfärbung von Mikrogefäßen dargestellt, die in das komplexe Gewebe des

Glioblastoms eingebettet sind. Teilabbildung A zeigt die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI, wodurch das selektive Markieren der Mikrogefäße mit dem genannten Aptamer in der zellreichen Tumorregion (die fädigen hellen Strukturen auf der rechten Seite der Aufnahme stellen die angefärbten Mikrogefäße dar), nicht aber von den Gefäßen in den peritumoralen Bereichen (linke Seite der Aufnahme) ersichtlich wird. Teilabbildung C zeigt eine Doppelfärbung mit dem käuflichen endothelialen monoklonalen Antikörper CD-31 (Dako, Hamburg, Deutschland), was zu einer Überlagerung beider Fluoreszenzsignale führt, wodurch die durch das in Rede stehende Aptamer markierten Zellen als Endothelzellen bestimmt werden. Teilabbildung D zeigt eine Anfärbung mit dem monoklonalen Antikörper CD-31 und einem unspezifischen sequenz-randomisierten Aptamer, wobei keinerlei Doppelfärbung von Endothelzellen oder gefäßassoziierten Strukturen bzw. keine Signalüberlagerung zu erkennen ist. Teilabbildung E zeigt eine Anfärbung einer Endothelzellkultur nach dem Verwunden einer konfluenteren Zellschicht mit einer Pipettenspitze. Hier zeigt das in Rede stehende Aptamer eine signifikant erhöhte Bindung an die Endothelzellen in dem subkonfluenteren verwundeten kreisförmigen Bereich. Der Skalenstrich entspricht 50 µm.

Dieses Experiment zeigt, daß das Aptamer mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 spezifisch die komplexe Architektur der pathologischen Mikrogefäße anfärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI unterstreicht, daß selektiv nur Mikrogefäße innerhalb der zellreichen Tumorregion, nicht aber Gefäße in peritumoralem Gewebe erkannt werden. Die Erfinder konnten in weiteren, hier nicht gezeigten Experimenten, bei denen normales Rattengehirn mit dem Aptamer angefärbt wurde, in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen keinerlei Anfärbung von Endothelzellen

oder gefäßassoziierten Strukturen feststellen. Die Anfärbung von Tumorgewebeschnitten mit Maus-IgG, die gegen Endothelzellen gerichtet sind, d.h. bspw. mit dem obengenannten CD-31-Antikörper und der anschließenden Markierung mit dem in Rede stehenden Aptamer bestätigt das Aptamertarget als Endothelzellstruktur. Die Anfärbung von verletztem Endothelzellgewebe zeigt eine deutliche Hochregulierung des molekularen Targets des Aptamers im Bereich der Läsion, d.h. in einer Region, die durch verstärkte Proliferation – im Vergleich zu den Bereichen des konfluenteren Monolayers – gekennzeichnet ist.

Um das Target identifizieren zu können, das von dem Aptamer mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 erkannt wird, wird wie folgt vorgegangen: 1 mg (100 µl) von magnetischen Streptavidin-Beats werden mit 200 pmol dreifach biotinyliertem (trB) Aptamer durch Inkubation in 1 ml Selektionspuffer (30 Minuten, Raumtemperatur) gekoppelt (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland). Als Kontrolle werden 100 µl magnetische Beats mit 200 pmol unspezifischer FITC-ssDNA gekoppelt (trB-96-nt). In Gegenwart von Proteaseinhibitoren werden $1,5 \times 10^5$ YPEN-1 Endothelzellen lysiert, wie beschrieben in Klocker et al., Journal of Neuroscience 19, 8517-8527 (1999). Nach der Zentrifugation wird das Proteinpellet in 400 µl Selektionspuffer resuspendiert, ultrasonifiziert (0°C , 20 Sekunden) und in Selektionspuffer (Gesamtvolumen 1,5 ml, 0°C , 15 Minuten) mit den aptamerbedeckten magnetischen Beats unter Hinzufügung des hundertfachen Überschusses von tRNA (20 nmol) als einem unspezifischen Kompetitor inkubiert. Der Komplex aus Protein und den gekoppelten Aptameren wird in einem Magnetständer rausgelöst und fünf Mal gewaschen (1. Waschvorgang: 1 ml Selektionspuffer mit 150 mM NaCl; 2. bis 5. Waschvorgang: 200 µl Selektionspuffer mit

100 mM NaCl mit 2 nmol tRNA). Das Protein wird von den aptamer-beschichteten Beads durch Inkubation in 30 µl 1 M NaCl entfernt (0°C, 30 Minuten) und durch PAGE und anschließendem Anfärben mit Comassie-Blau analysiert.

Ein solches Experiment ist in der Fig. 6 dargestellt. In Spur A ist der molekulare Marker aufgetragen, in Spur B das Target, das mit dem Aptamer mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 isoliert wurde, in der Spur C als Kontrolle das Isolat, das mit unspezifischer ssDNA (96-nt) gewonnen wurde und in Spur D sind unbehandelte Endothelzellen aufgetragen. Die Targetbande, die mittels des in Rede stehenden Aptamers isoliert wurde, ist durch einen Stern gekennzeichnet und weist ein Molekulargewicht von etwa 67 kDa auf.

Dieses Targetprotein wird wie folgt identifiziert:

Das entsprechende Gelstück wird ausgeschnitten und ein tryptischer Verdau wird durchgeführt, wie dies z.B. beschrieben ist in Shevchenko et al., Anal. Chem. 68, 850-858 (1996). Dabei werden, im Anschluß kurz beschriebene, Modifizierungen vorgenommen. Die ausgeschnittene Proteinbande wird vollständig entfärbt und für drei Stunden mit Schweinetrypsin (sequencing grade, modifiziert, Promega, Mannheim, Deutschland) bei einer Konzentration von 67 ng pro µl in 25 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,1 bei 37°C) verdaut. Vor dem Peptidmapping und der Sequenzierung der tryptischen Fragmente durch Tandemmassenspektrometrie wird das Peptidgemisch aus dem Gel durch Behandlung mit einer Lösung aus 50 % Trifluoressigsäure/50 % Wasser, gefolgt von einer Behandlung mit 50 % Trifluoressigsäure/50 % Acetonitril, extrahiert. Die Extrakte werdenvakuumgetrocknet. Die getrockneten

Peptide werden in 0,1 % Trifluoressigsäure resuspendiert und unter Verwendung einer Ready-to-go-Pipettenspitze mit C18-spherical-silica-reverse-Phase-Material (ZipTip_®TM, Millipore) gereinigt. Die Peptide werden mit 10 µl 50 % Methanol/1 % Ameisensäure eluiert und die Sequenzierung wird mittels Nano-Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (Q-ToF, Micromass, Manchester, England) durchgeführt.

Die Erfinder haben das von dem Aptamer mit der Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 erkannte Target einer solchen Analyse unterzogen. Dabei wurden drei tryptische Peptidfragmente des Proteins durch Massenspektrometrie bzw. Tandem-Massenspektrometrie untersucht bzw. sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß das von dem in Rede stehenden Aptamer erkannte Target ein Homolog des 'pigpen'-Proteins der Maus ist.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, das zumindest eine der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält.
2. Nukleinsäuremolekül mit einer der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
3. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß in dessen nicht-funktionellen Abschnitten zumindest ein Nukleotid ersetzt ist oder fehlt.
4. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es an ein Therapeutikum und/oder Diagnostikum gekoppelt ist.
5. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3 für histologische Untersuchungen von Gewebschnitten.
6. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält, zum Nachweisen einer Tumorerkrankung.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt.

8. Verfahren, bei dem ein Nukleinsäuremolekül selektiv an Endothelzellen bindet oder diese markiert, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül zumindest eine der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül mit einer der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll ist.
10. Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung mit den Schritten:
 - a) Bereitstellen von biologischem Material,
 - b) Nachweis eines Tumormarkers,dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis mit einem Nukleinsäuremolekül erfolgt, das die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 9 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest ein Nukleotid in den nicht-funktionalen Abschnitten des Nukleinsäuremoleküls ersetzt ist oder fehlt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül an ein Therapeutikum gekoppelt ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül an ein Diagnostikum gekoppelt ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Diagnostikum aus der Gruppe ausgewählt ist, die enthält: FITC, Biotin, Digoxigenin und deren Abkömmlinge, sowie weitere fluoreszierende Substanzen, enzymatische Marker, Infrarot-Marker und Chelatbildner.
16. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls, das eine der Nukleotidsequenzen SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 21 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll enthält, in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül selektiv an natives komplexes biologisches Material bindet.
17. Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung mit den Schritten:
 - a) Bereitstellen von biologischem Material,
 - b) Nachweis eines Tumormarkers,dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus-/Rinder-Protein 'pigpen' erfolgt.

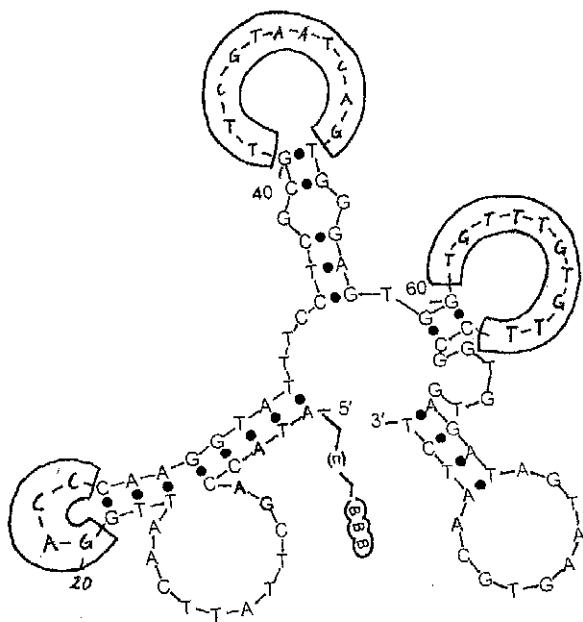


Fig. 1

WO 01/79538

2/6

PCT/EP01/04340

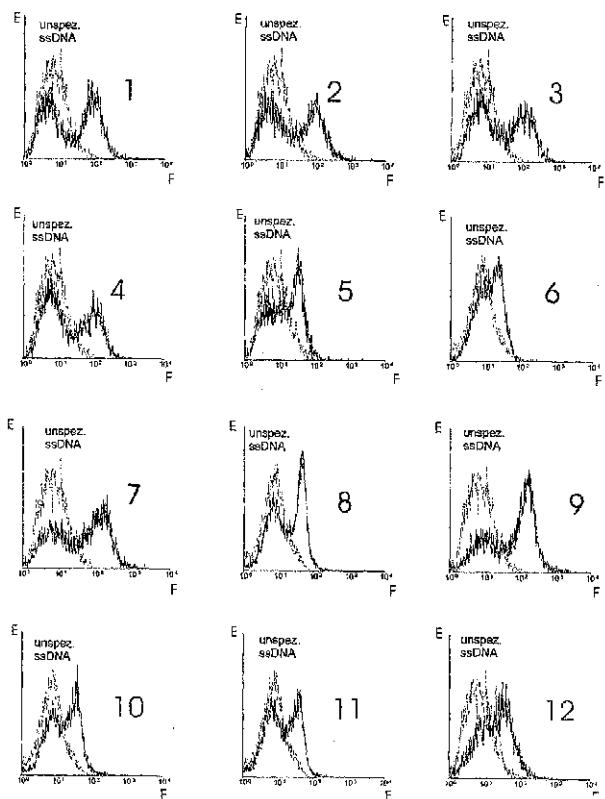


Fig. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

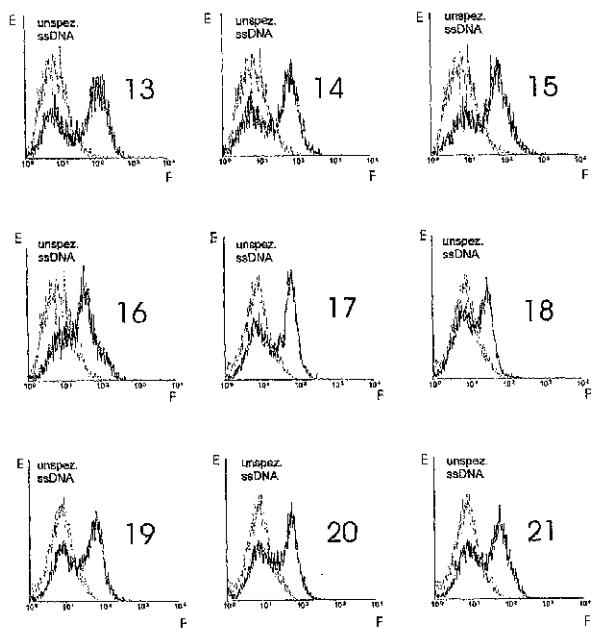


Fig. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

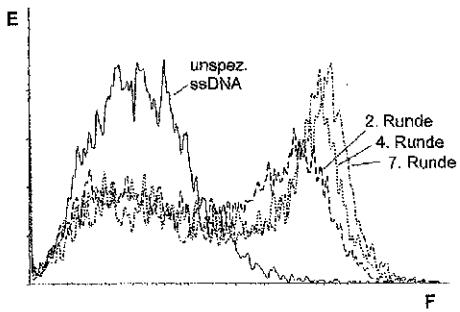


Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEI 26)

WO 01/79538

5/6

PCT/EP01/04340

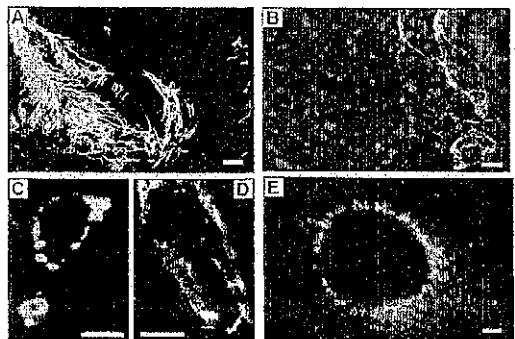


Fig. 5

ERSATZBLATT (REGEI 26)

WO 01/79538

6/6

PCT/EP01/04340

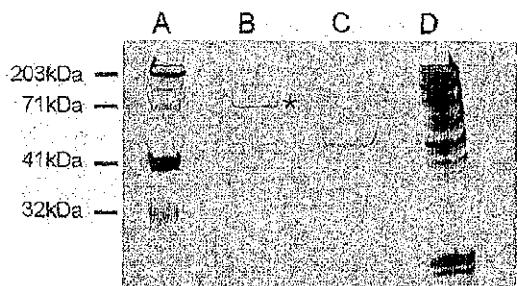


Fig. 6

ERSATZBLATT (REGEI 26)

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Eberhard-Karls-Universität Tübingen UKT

<120> zellbindende Nukleinsäuremoleküle (Aptamere)

<130> 5402P189WO

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 1

ataccagctt attcaattgg acccaaggta ttccctcgcg ttcgtaatca gtgggagtgg 60
tgtttgtttt cogggtgttag atagtaagtgc caatct 96

<210> 2

<211> 95

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

2

Nukleotidsequenz

<400> 2
ataccagctt attcaattct accagactgt ctttcacccct ggcgcgttgtt ggtctgttag 60
ttgttcgttagt tggtttcaga tagtaagtgc aatct 95

<210> 3
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 3
ataccagctt attcaattgt cagcttttta gtgtttttgg gtttttttgtt gtacgtccct 60
gtaaaatgtt ttoagtcgag atagtaagtgc caatct 96

<210> 4
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 4
ataccagctt attcaattga gtgtgtgatcc cggtttctct ctggatcgaa attggaggccg 60
tttgtgtgtg agttggatcg atagtaagtgc caatct 96

<210> 5
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

3

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz<400> 5
ataccagctt attcaattcc aacaccataa cctttcttgc acctgacttt agccgtaatg 60
tatTTggggc atcccccttag atagtaagt caaatct 96

<210> 6

<211> 137

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz<400> 6
ataccagctt attcaattgg gtggagatag taggtgcaat ctataccgc ttattcaatt 60
gccccgattt ggatgtattt attgcgcgtg tattttgtat tgtataaaagt gttgctacaa 120
gatagtaagt gcaatct 137

<210> 7

<211> 98

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz<400> 7
ataccagctt attcaatttg gcagatgaga agttaaggcg gtgtataga tggaccattt 60
aggatTTtat ggttggcggt agatagtaag tgcataatct 98

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

4

<210> 8
<211> 95
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 8
ataccagttt attcaattcc cgccttact tgggagatta tcacccgggt atataataac 60
tgttcggagt tcttgttaga tagtaagtgc aatct 95

<210> 9
<211> 93
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 9
ataccaggctt attcaatttag ggggtgcatt ggggtggta gtatcacatga ggtttgaga 60
ctatgtcgaa gatataqata gtaagtgcac tot 93

<210> 10
<211> 97
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 10

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

5

ataccagctt attcaattct gttggacatt caaaagacta gttcacgtcc gttgccatt 60
cttcccttg ttgactgcta gatagtaagt gaaatct 97

<210> 11

<211> 96

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 11

ataccagctt attcaattcg gctaggatcc attaagggtg acttatggc caaagtccc 60
tgcttggtcg tgtgggtgag atagtaagtg caatct 96

<210> 12

<211> 97

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 12

ataccagctt attcaattcc aaaggtaaac cgcataataa gggtatgtat taaaatttgt 60
ggtgatgact gatgccataa gatagtaagt gaaatct 97

<210> 13

<211> 94

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

6

Nukleotidsequenz

<400> 13
ataccagctt attcaattga ggatcacatg ctatgccacc ctttttaacg tggggttaca 60
tttgctgaaag ggctttagat agtaagtgc aatct 94

<210> 14
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 14
ataccagctt attcaattgtt accagccgag atcttttttg acgatatgtt ttttttttga 60
ggtgtttagt tttagtgtggat atagtaagtgc aatct 96

<210> 15
<211> 77
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 15
ataccagctt attcaattgc gataaatttt gctaaggcg gtcaagaactg tgttcggtta 60
gatagtagt gcaatct 77

<210> 16
<211> 65
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

7

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 16
ataccagctt attcaattgc cataccgtag tttagcatatg tagtgttaga tagtaagtgc 60
aatct 65

<210> 17
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz .

<400> 17
ataccagctt attcaattgc gcctttaaat ataaacccgag tgctttgtt gaactgggt 60
tcggatgac ctgtgttgag atatgtatgt caatct 96

<210> 18
<211> 96
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Nukleotidsequenz

<400> 18
ataccagctt attcaattgc ttgcatacgac attatgagggt ggattcaact gtttttgact 60
ttttccccct ggacgctgag atatgtatgt caatct 96

<210> 19

WO 01/79538

PCT/EP01/04340

8

<211> 95

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 19

ataccagctt attcaattgg ttaccaatct ggtgggaccc gtgttgctg gaatgtttt 60
agtttttttg gtgttttaga tagtaaagtgc aatct 95

<210> 20

<211> 95

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 20

ataccagctt attcaattgg ttggagacct tattggcago atgcaggccc ctcaatgtg 60
caaccgggt ttccgttaga tagtaaagtgc aatct 95

<210> 21

<211> 68

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Nukleotidsequenz

<400> 21

WO 01/79538

9

PCT/EP01/04340

ataccagctt atccaaattca cacatgcgcc ttagtttagcc ctgggttgtg agatagttaag 60
tgcaatct 68

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum Internationales Büro		
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum 25. Oktober 2001 (25.10.2001)	PCT	(10) Internationale Veröffentlichungsnummer WO 01/079538 A3
(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68; C07H 21/01, 21/00	BLANK, Michael [DE/DE]; Alexanderstr. 80, 70182 Stuttgart (DE)	(74) Anwälte: OTTFEN, Hojo usw., Winkl, Weller & Partner, Postfach 105462, 70047 Stuttgart (DE).
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01340	(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. April 2001 (17.04.2001)	(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).	
(25) Einreichungssprache: Deutsch	(85) Veröffentlichung: mit internationalen Recherchebericht	
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch	(86) Veröffentlichungsdatum des internationalen Rechercheberichts: 16. Januar 2003	
(30) Angaben zur Priorität: 100 19 154.1 (18. April 2000 (18.04.2000)) DE	Zur Erklärung der Zeichenbuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungstaaten mit Ausnahme von US): EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN UNIVERSITÄTSKLINIKUM [DE/DE]; Geschwag. 3, 72075 Tübingen (DE).	(72) Erfinder: und (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHLÜSENER, Hermann [DE/DE], Haunser Str. 15, 72075 Tübingen (DE).	



WO 01/079538 A3

(54) Title: CELL BINDING NUCLEIC ACID MOLECULES (APTAAMERS)

(54) Bezeichnung: ZELLBINDENDE NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE (APTAAMERE)

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid molecules which selectively bind to endothelial cells or which label the same, to methods for detecting a tumor disease, and to nucleic acid molecules used in said methods. The invention additionally relates to the use of the nucleic acid molecules.

(57) Zusammenfassung: Es werden Nukleinsäuremoleküle beschrieben, die selektiv an Endothelzellen binden oder diese markieren, sowie Verfahren zum Nachweisen einer Tumorerkrankung und in den Verfahren verwendete Nukleinsäuremoleküle. Des Weiteren wird die Verwendung der Nukleinsäuremoleküle beschrieben.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/04340
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ⁷ C12Q1/68 C07H21/04 C07H21/00		
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) IPC ⁷ C12Q C07H		
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) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAD, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALLIEGRO MARK C ET AL: "A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 174, Nr. 2, 1996, Seiten 288-297, XP002202418 ISSN: 0012-1606 das ganze Dokument	1,2, 4-11, 13-16
Y	US 6 013 443 A (GOLD LARRY ET AL) 11. Januar 2000 (2000-01-11)	1,2, 4-11, 13-16
	Spalte 1-7; Beispiele 5,6	
	-/-	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>'E' earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>'L' document which may throw doubt on priority claimed or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>'U' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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 specific documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2002 (18.06.2002)	Date of mailing of the international search report 24 July 2002 (24.07.2002)	
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O. Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 01/04340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOBILE VALENTINA ET AL: "Inhibition of human angiogenin by DNA aptamers: Nuclear colocalization of an angiogenin-inhibitor complex." BIOCHEMISTRY, Bd. 37, Nr. 19, 12. May 1998 (1998-05-12), Pages 6857-6863, XP002202419 ISSN: 0886-2960 the whole document -----	1,2, 4-11, 13-16
Y	WO 96 34875 A (MORRIS KEVIN N ;NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC (US); CHEN HANG (US)); 7. November 1996 (1996-11-07) example 5,6 -----	1,2, 4-11, 13-16
Y	WO 99 27138 A (SCHERING AG ;NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC (US)) 3. June 1999 (1999-06-03) example 1-6 -----	1,2, 4-11, 13-16
Y	ALLIEGRO M C: "A C-terminal carbohydrate-binding domain in the endothelial cell regulatory protein, pigpen: new function for an EWS family member." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH. UNITED STATES 15 MAR 2000, Bd. 255, Nr. 2 15. March 2000 (2000-03-15), Seiten 270-277, XP002202420 ISSN: 0014-4827 the whole document -----	1,2, 4-11, 13-16
Y	WILLIS M C ET AL: "LIPOSOME-ANCHORED VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR APATAMERS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 9, Nr. 5, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 573-582, XP000778000 ISSN: 1043-1802 the whole document -----	1,2, 4-11, 13-16
A	PLATE KARL H: "Mechanisms of angiogenesis in the brain." JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY & EXPERIMENTAL NEUROLOGY, Bd. 58, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 313-320, XP002202421 ISSN: 0022-3069 the whole document -----	1,2, 4-11, 13-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:		
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 3,12 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:</p>		
see supplemental sheet		
<p>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).</p>		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see supplemental sheet		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort (justifying an additional fee), this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>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.:</p>		
<p>4. <input checked="" 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.: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (partially), 6, 7, 10, 11 (completely)</p>		
<p>Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PC17/ISA/21.0 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

International application No EP01/04340
--

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely

1. Claims 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (partially), 6, 7, 10, 11 (completely)

Invention No. 1

nucleic acid with Seq Id No. 9, use of same for histological examinations of tissue sections and for detection of neoplastic disease, method in which this nucleic acid selectively bonds to endothelial cells or marks them, or is used in a method that serves to detect neoplastic disease, and finally, use of this nucleic acid in a method in which the nucleic acid molecule selectively bonds to native complex biological material.

2. Claims 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (in part)

Invention No. 2

nucleic acid with Seq Id No. 1, use of same for histological examinations of tissue sections, method in which this nucleic acid selectively bonds to endothelial cells or marks them, and use of this nucleic acid in a method in which the nucleic acid molecule selectively bonds to native complex biological material.

3. Claims 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (in part)

Invention No. 3

nucleic acid with Seq Id No. 2, use of same for histological examinations of tissue sections, method in which this nucleic acid selectively bonds to endothelial cells or marks them, and use of this nucleic acid in a method in which the nucleic acid

International application No
EP01/04340

molecule selectively bonds to native complex biological material.

4. Claims 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (in part)

Invention No. 4

nucleic acid with Seq Id No. 3, use of same for histological examinations of tissue sections, method in which this nucleic acid selectively bonds to endothelial cells or marks them, and use of this nucleic acid in a method in which the nucleic acid molecule selectively bonds to native complex biological material.

5. Claims 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (in part)

Invention No. 5

idem for Invention 5 (Seq Id No. 4) to Invention 21 (Seq Id No. 21).

6. Claim 17 (in full)

Invention No. 22

Method for detection of a neoplastic disease with the steps:

- a.) preparation of biological material
- b.) detection of a neoplastic marker

characterized in that the detection is carried out by means of the human homologue to the murine or bovine protein "pigpen".

International application No EP01/04340
--

Continuation of I.2

Claims: 3 and 12

Claims 3 and 12 relate to a product, i.e. a nucleic acid molecule, which is defined by a desirable particularity or property, namely the presence of "non-functional sections". Claims 3 and 12 therefore lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product by the desired result. This lack of clarity makes it impossible to carry out a reasonable search covering the entire range of protection sought. Hence, no search was carried out for these claims. Moreover, at least one nucleotide is said to be replaced or lacking in these sections to be defined. However, the nucleotides lacking or to be replaced are not defined either. Claims 3 and 12 therefore relate to an extremely large number of possible variants and thus appear so unclear and so broad that they do not allow a reasonable search.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members			International Application No EP01/04340
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6013443	A 11-01-2000	US 5789157 A AU 8666998 A WO 9907724 A1 US 6376474 B1 AU 732961 B2 AU 5670796 A CA 2219807 A1 EP 0823914 A1 WO 9634875 A1 US 6232071 B1 US 6114120 A	04-08-1998 01-03-1999 18-02-1999 23-04-2002 03-05-2001 21-11-1996 07-11-1996 18-02-1998 07-11-1996 15-05-2001 05-09-2000
WO 9634875	A 07-11-1996	US 5789157 A US 5712375 A US 5763566 A US 5864026 A AU 732961 B2 AU 5670796 A CA 2219807 A1 EP 0823914 A1 WO 9634875 A1 US 6232071 B1 US 6376474 B1 US 6013443 A US 6114120 A JP 11505196 T	04-08-1998 27-01-1998 09-06-1998 26-01-1999 03-05-2001 21-11-1996 07-11-1996 18-02-1998 07-11-1996 15-05-2001 23-04-2002 11-01-2000 05-09-2000 18-05-1999
WO 9927138	A 03-06-1999	US 6127119 A AU 1600499 A CA 2311164 A1 EP 1032708 A1 JP 2001524320 T WO 9927138 A1	03-10-2000 15-06-1999 03-06-1999 06-09-2000 04-12-2001 03-06-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1993)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationaler Aktenzeichen PCT/EP 01/04340
A. KLASSERFIZITUR DES ANMELDUNGSERGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68 C07H21/04 C07H21/08		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBiete Recherchierte Meldungstypen (Klassifikationssystem und Klassifikationsmotive) IPK 7 C12Q C07H		
Recherchierte aber nicht zum Meldungstitel gehörende Veröffentlichungen, sowie diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERRAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ALLIEGRO MARK C ET AL: "A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 174, Nr. 2, 1996, Seiten 288-297, XP002202418 ISSN: 0012-1606 das ganze Dokument ---	1,2, 4-11, 13-16
Y	US 6 013 443 A (GOLD LARRY ET AL) 11. Januar 2000 (2000-01-11) Spalte 1-7; Beispiele 5,6 --- -/-	1,2, 4-11, 13-16
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von aufgeführten Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, einschließlich der Prioritätsanträge</p> <p>"B" Reines Dokument, das jedoch erst am späteren Tag dem internationalen Anmeldeamt veröffentlicht worden ist</p> <p>"C" Veröffentlichung, die geplant ist, einen Prioritätsanspruch zwecks einer Patentanmeldung einzulegen, oder die eine Veröffentlichung potentiell als solche angesehen werden kann, obwohl sie noch nicht veröffentlicht wurde und sich die zur Anmeldung benötigten Grenzen angegeben ist (wurde ausgetauscht)</p> <p>"D" Veröffentlichung, die auf einer mindestens öffentlichen Ausstellung oder anderen Maßnahmen beruht</p> <p>"E" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeamt, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche		Absendetermin des Internationalen Recherchenberichts
18. Juni 2002		24.07.2002
Name und Postanschrift des Internationalen Recherchenberichts		Erstellmächtiger Bodenlandesamt
Europäisches Patentamt, P.O. Box 8818 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 345 30 00, Fax: 31 651 090 01 Fax: (+31-70) 345 30 18		Botz, J

Formblatt PCT/CAN10 (Blatt 3) (zu § 19(2))

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/04346
C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Beschreibung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der im Befehl kommandierten Teile	Fett. Anspruch Nr.
Y	i MOBILE VALENTINA ET AL: "inhibition of human angiogenin by DNA aptamers: Nuclear colocalization of an angiogenin-inhibitor complex." BIOCHEMISTRY, Bd. 37, Nr. 19, 12. Mai 1998 (1998-05-12), Seiten 6857-6863, XP002202419 ISSN: 0096-2960 das ganze Dokument ---	1,2, 4-11, 13-16
Y	WO 96 34875 A (MORRIS KEVIN N;NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC (US); CHEN HANG (US)); 7. November 1996 (1996-11-07) Beispiele 5,6 ---	1,2, 4-11, 13-16
Y	WO 99 27138 A (SCHERING AG ;NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC (US)) 3. Juni 1999 (1999-06-03) Beispiele 1-6 ---	1,2, 4-11, 13-16
Y	ALLIEGRO M C: "A C-terminal carbohydrate-binding domain in the endothelial cell regulatory protein, p160: new function for an EWS family member." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH. UNITED STATES 15 MAR 2000, Bd. 255, Nr. 2, 15. März 2000 (2000-03-15), Seiten 270-277, XP002202420 ISSN: 0014-4827 das ganze Dokument ---	1,2, 4-11, 13-16
Y	WILLIS M C ET AL: "LIPOSOME-ANCHORED VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR APATAMERS" BIOTCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, Bd. 9, Nr. 5, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 573-582, XP000778000 ISSN: 1043-1802 das ganze Dokument ---	1,2, 4-11, 13-16
A	PLATE KARL H: "Mechanisms of angiogenesis in the brain." JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY & EXPERIMENTAL NEUROLOGY, Bd. 58, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 313-320, XP002202421 ISSN: 0022-3059 das ganze Dokument ---	1,2, 4-11, 13-16

Formblatt PCT/ISA/21 (Formblattung vom 01.01.1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 81/04340
Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erweisen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)		
<p>Gemäß Artikel 17(2) a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Ansprache Nr. 3,12, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu denen die Recherche die Berörde nicht verpflichtet ist, nämlich: <p>siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. <input checked="" type="checkbox"/> Ansprache Nr. 3,12, was sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen zu wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich: <p>siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. <input type="checkbox"/> Ansprache Nr. 3,12, weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgelebt sind. 		
Feld I Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)		
<p>Die Internationale Recherchebehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehreren Erfindungen enthält:</p> <p>siehe Zusatzblatt</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche. 2. <input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert. 3. <input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprache Nr. 3,12. 4. <input checked="" type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuletzt erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: 1, 2, 4, 5, 8, 9, 13-16 (partially), 6, 7, 10, 11 (completely) 		
<p>Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs</p> <p><input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.</p> <p><input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.</p>		

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 1 (1)) (Juli 1998)

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/04340

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Ansprüche: 1,2,4,5,8,9,13-16 (partially), 6,7,10, 11 (completely)</p> <p>Erfahrung No. 1: Nukleinsäure mit der Sequenzidentität Nr. 9, Verwendung derselben für histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten und zum Nachweisen einer Tumorerkrankung, Verfahren bei dem diese Nukleinsäure selektiv an Endothelzellen bindet oder diese markiert, bzw. in einem Verfahren zum Einsatz kommt welches zum Nachweisen einer Tumorerkrankung dient und schliesslich Verwendung dieser Nukleinsäure in einem Verfahren bei dem das Nukleinsäuremolekül selektiv an natives komplexes biologisches Material bindet.</p> <p>2. Ansprüche: 1,2,4,5,8,9,13-16 (partially)</p> <p>Erfahrung No. 2: Nukleinsäure mit der Sequenzidentität Nr. 1, Verwendung derselben für histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten, Verfahren bei dem diese Nukleinsäure selektiv an Endothelzellen bindet oder diese markiert und Verwendung dieser Nukleinsäure in einem Verfahren bei dem das Nukleinsäuremolekül selektiv an natives komplexes biologisches Material bindet.</p> <p>3. Ansprüche: 1,2,4,5,8,9,13-16 (partially)</p> <p>Erfahrung No. 3: Nukleinsäure mit der Sequenzidentität Nr. 2, Verwendung derselben für histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten, Verfahren bei dem diese Nukleinsäure selektiv an Endothelzellen bindet oder diese markiert und Verwendung dieser Nukleinsäure in einem Verfahren bei dem das Nukleinsäuremolekül selektiv an natives komplexes biologisches Material bindet.</p> <p>4. Ansprüche: 1,2,4,5,8,9,13-16 (partially)</p> <p>Invention No. 4: Nukleinsäure mit der Sequenzidentität Nr. 3, Verwendung derselben für histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten, Verfahren bei dem diese Nukleinsäure selektiv an</p>	

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/04340	
WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Endothelzellen bindet oder diese markiert und Verwendung dieser Nukleinsäure in einem Verfahren bei dem das Nukleinsäuremolekül selektiv an natives komplexes biologisches Material bindet.</p>	
<p>5. Ansprüche: 1,2,4,5,8,9,13-16 (partially) Idem für Erfindung 5 (Sequenz-Identität Nummer 4) bis Erfindung 21 (Sequenz-Identität Nummer 21)</p>	
<p>6. Anspruch : 17 (completely) Invention No. 22: Verfahren zum Nachweis einer Tumorerkrankung mit den Schritten: a.) Bereitstellen von biologischem Material b.) Nachweis eines Tumormarkers dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis über das menschliche Homolog zu dem Maus/Rinder-Protein "pigpen" erfolgt.</p>	

internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/04340

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Fortsetzung von Feld I.2</p> <p>Ansprüche Nr.: 3,12</p> <p>Die Ansprüche 3 und 12 beziehen sich auf ein Produkt, d.h. ein Nukleinsäuremolekül, welches durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich das Vorhandensein von "nicht-funktionellen Abschnitten" definiert wird. Den Patentansprüchen 3 und 12 fehlt daher die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche für diese Ansprüche nicht durchgeführt. Hinzu kommt, dass in diesen zu definierenden Abschnitten zumindest ein Nukleotid ersetzt, oder fehlen soll. Die zu ersetzenen oder fehlenden Nukleotide jedoch sind ebenfalls nicht definiert. Anspruch 3 und 12 beziehen sich daher zusätzlich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Varianten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar bzw. zu weitläufig gefasst erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen.</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/04340

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6013443	A	11-01-2000	US 5789157 A AU 8666998 A WO 9907724 A1 US 6376474 B1 AU 732961 B2 AU 5670796 A CA 2219807 A1 EP 0823914 A1 WO 9634875 A1 US 6232071 B1 US 6114120 A	04-08-1998 01-03-1999 18-02-1999 23-04-2002 03-05-2001 21-11-1996 07-11-1996 18-02-1998 07-11-1996 15-05-2001 05-09-2000
WO 9634875	A	07-11-1996	US 5789157 A US 5712375 A US 5763566 A US 5864925 A AU 732961 B2 AU 5670796 A CA 2219807 A1 EP 0823914 A1 WO 9634875 A1 US 6232071 B1 US 6376474 B1 US 6013443 A US 6114120 A JP 11505196 T	04-08-1998 27-01-1998 09-06-1998 26-01-1999 03-05-2001 21-11-1996 07-11-1996 18-02-1998 07-11-1996 15-05-2001 23-04-2002 11-01-2000 05-09-2000 18-05-1999
WO 9927138	A	03-06-1999	US 6127119 A AU 1609499 A CA 2311164 A1 EP 1032708 A1 JP 2001524320 T WO 9927138 A1	03-10-2000 15-06-1999 03-06-1999 06-09-2000 04-12-2001 03-06-1999

Formblatt PCT/EP/210 (Anhang Patentschutzbl.) 1999

フロントページの続き

(72)発明者 ブランク , ミヒヤエル

ドイツ連邦共和国 , 7 0 1 8 2 シュトゥットガルト , アレクサンダーシュトラーセ 8 0 番地

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 DA03 GA11

HA11 HA12 HA17 HA20

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR32 QR35 QR38 QR56 QS32

QX02

4C076 AA95 EE59