

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6824041号
(P6824041)

(45) 発行日 令和3年2月3日 (2021. 2. 3)

(24) 登録日 令和3年1月14日 (2021. 1. 14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/115 (2010. 01)	C 1 2 N 15/115 Z N A Z
A 6 1 K 31/7115 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7115
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 37/02 (2006. 01)	A 6 1 P 37/02

請求項の数 45 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-569420 (P2016-569420)	(73) 特許権者 505373306 ソマロジック、インコーポレイテッド SomaLogic, Inc. アメリカ合衆国, 80301 コロラド州 、ボウルダー、ウィルダネス プレイス 2945
(86) (22) 出願日 平成27年5月29日 (2015. 5. 29)	
(65) 公表番号 特表2017-517261 (P2017-517261A)	
(43) 公表日 平成29年6月29日 (2017. 6. 29)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2015/033355	
(87) 国際公開番号 W02015/184372	
(87) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015. 12. 3)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
審査請求日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20)	(72) 発明者 ドロレ ダニエル ダブリュー. アメリカ合衆国 80301 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2945
(31) 優先権主張番号 62/005, 300	
(32) 優先日 平成26年5月30日 (2014. 5. 30)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	
前置審査	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 3つのタンパク質を補体成分に結合するための核酸化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 5' - K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 1
52) を含む、C3タンパク質に結合するアプタマーであって、

Kが、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、
各Pが、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、
各Rが、各出現において、それぞれ独立して、AまたはGであり、
Mが、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、
各Dが、各出現において、それぞれ独立して、A、Cまたは3炭素スパーサーあり、
各Vが、各出現において、それぞれ独立して、A、G、Cまたは3炭素スパーサーであり、
Lが、U、TまたはC-5修飾ピリミジンであり、

Wが、Gまたは3炭素スパーサーであり、
Sが、Cまたは3炭素スパーサーであり、
Yが、C、U、またはTであり、
nが0または1であり、

各C-5修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)
-2'-デオキシウリジン (BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'
-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジ
ン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン (PEdU)、
5-(N-チオフェニルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン (ThdU

10

20

)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (i B u d U)、
 5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T y r d U)、5
 - (N - 3、4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジ
 ン (M B n d U)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキ
 シウリジン (F B n d U)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2'
 - デオキシウリジン (P P d U)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) -
 2' - デオキシウリジン (I m d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2'
 - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリ
 ジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T r p
 d U)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T
 h r d U)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン
 、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N -
 [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシ
 ウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリ
 ジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチル
 ウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5
 - (N - [1 - (2、3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキ
 シウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリ
 ジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O -
 メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウ
 リジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N
 E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリ
 ジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5
 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U)
)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5
 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N -
 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、
 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5
 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B
 T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O -
 メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2'
 ' - フルオロウリジンから選択される、前記 C 3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 2】

前記アプタマーが、配列 5' - K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 131) を含む、請求項 1 に記載のアプタマー。

【請求項 3】

前記アプタマーが、配列 5' - K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A C G P P M - 3' (配列番号: 135) または 5' - K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A Y R P P M - 3' (配列番号: 153) を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載のアプタマー。

【請求項 4】

配列 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 154) を含む、C 3 タンパク質に結合するアプタマーであって、

K が、C - 5 修飾ピリミジン、C、U、T、G、または 3 炭素スパーサーであり、

各 P が、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、

R が、A または G であり、

M が、C、U、T、C - 5 修飾ピリミジン、または 3 炭素スパーサーであり、

V が、A、G、C または 3 炭素スパーサーであり、

W が、G または 3 炭素スパーサーであり、

10

20

30

40

50

S が、C または 3 炭素スペーサーであり、

Y が、C、U、または T であり、

X が、置換または非置換の $C_2 - C_{20}$ のリンカー、アルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから選択されるリンカーであり、

各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PEdU)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TyrdU)、5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (MBndU)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (FBndU)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PPdU)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ImdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThrdU)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジנקロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapedU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NapedU)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NEdU)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NEdU)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BFdU)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BTdU)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択される、前記 C 3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 5】

前記アプタマーが、配列 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 136) を含む、請求項 4 に記載のアプタマー。

【請求項 6】

前記アプタマーが、配列 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A C G P P M - 3' (配列番号: 137) または 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A Y R P P M - 3' (配列番号: 155) を含む、請求項 4 または請求項 5 に記載のアプタマー。

【請求項 7】

10

20

30

40

50

Kが、C - 5 修飾ピリミジン、C、またはGであり、

各Mが、各出現において、それぞれ独立して、CまたはC - 5 修飾ピリミジンであり、及び/または Lが、AまたはC - 5 修飾ピリミジンである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 8】

配列 5' - PAWP SVGPAYRPP - 3' (配列番号: 156) を含む、C3 タンパク質に結合するアプタマーであって、各Pが、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、Wが、Gまたは3 炭素スパーサーであり、Sが、Cまたは3 炭素スパーサーであり、VがA、GまたはCであり、YがC、UまたはTであり、及びRがGまたはAであり、各C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PEdU)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TyrdU)、5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (MBndU)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (FBndU)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PPdU)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ImdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThrdU)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NapdU)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NEdU)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NEdU)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BFdU)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BTdU)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択される、前記 C3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 9】

配列 5' - PAWP SVGPACGPP - 3' (配列番号: 134) を含む、C3 タン

10

20

30

40

50

パク質に結合するアプタマーであって、各 P が、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、W が、G または 3 炭素スパーサーであり、及び S が、C または 3 炭素スパーサーであり、V が A、G または C であり、各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BndU)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PndU)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (iBudU)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TyrdU)、5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (MBndU)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (FBndU)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (PPdU)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ImdU)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (TrpdU)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (ThrdU)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapedU)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NapedU)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NEdU)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NEdU)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BFdU)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BTdU)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択される、前記 C 3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 10】

配列番号：4 ~ 28、32 ~ 34、37 ~ 75、78 ~ 118、121 ~ 130、及び 139 ~ 151 から選択される、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99%、または 100% 同一である配列を含む、C 3 タンパク質に結合するアプタマーである、前記 C 3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 11】

第 1 の領域及び第 2 の領域を含む、C 3 タンパク質に結合するアプタマーであって、前記第 1 の領域が、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号：132) を含み、前記第 2 の領域が、配列 5' - G P A Y R P P - 3' (配列番号：157) を含み、各 P が、各出現

10

20

30

40

50

において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、Y が、C、U、または T であり、及び R が G または A であり、各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - フェニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (P E d U)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T y r d U)、5 - (N - 3、4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (M B n d U)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (F B n d U)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (P P d U)、5 - (N - イミゾリルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (I m d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (T h r d U)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2、3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択され、前記配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号: 132) の 3' 末端及び前記配列 5' - G P A Y R P P - 3' (配列番号: 157) の 5' 末端が、リンカーによって共有連結されており、前記リンカーが、1ヌクレオチド及び3炭素スパーサーから選択される、前記 C3タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 12】

第 1 の領域及び第 2 の領域を含む、C3タンパク質に結合するアプタマーであって、前記第 1 の領域が、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号: 132) を含み、前記第 2 の領域が、配列 5' - G P A C G P P - 3' (配列番号: 133) を含み、各 P が、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 -

10

20

30

40

50

(N - ベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - フェニルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P E d U)、 5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h d U)、 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (i B u d U)、 5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T y r d U)、 5 - (N - 3、 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (M B n d U)、 5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (F B n d U)、 5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P P d U)、 5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (I m d U)、 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T r p d U)、 5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h r d U)、 5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジンをクロリド、 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - [1 - (2、 3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン、 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U)、 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d U)、 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B T d U)、 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジンから選択され、前記配列 5 ' - P A G P C - 3 ' (配列番号 : 1 3 2) の 3 ' 末端及び前記配列 5 ' - G P A C G P P - 3 ' (配列番号 : 1 3 3) の 5 ' 末端が、リンカーによって共有連結されており、前記リンカーが、1ヌクレオチド及び3炭素スパーサーから選択される、前記 C 3 タンパク質に結合するアプタマー。

【請求項 1 3】

前記リンカーが、1ヌクレオチドである、請求項 1 1 に記載のアプタマー。

【請求項 1 4】

前記リンカーが、1ヌクレオチドである、請求項 1 2 に記載のアプタマー。

【請求項 1 5】

配列番号 : 1 2 5 の配列を含む、C 3 に結合するアプタマーである、前記 C 3 に結合するアプタマー。

【請求項 1 6】

各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、 5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキ

10

20

30

40

50

シアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

10

【請求項 17】

各 C - 5 修飾ピリミジンが、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U) である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

20

【請求項 18】

前記アプタマーが、少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 19】

前記アプタマーが、24 ~ 100 ヌクレオチドの長さ、または 30 ~ 60 ヌクレオチドの長さ、または長さ 28 ~ 60 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 50 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 40 ヌクレオチドの長さ、または 40 ~ 50 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 32 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

30

【請求項 20】

前記アプタマーが、C3 タンパク質の切断を阻害する、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 21】

前記 C3 タンパク質が、ヒト C3 タンパク質である、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のアプタマー。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のアプタマー及び補体成分 3 (C3) タンパク質を含む組成物。

40

【請求項 23】

前記補体成分 3 (C3) タンパク質が、ヒト補体成分 3 (C3) タンパク質である、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のアプタマーを含む、補体成分 3 (C3) タンパク質の切断を阻害するための組成物。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のアプタマーと C3 タンパク質とを接触させることを含み、前記 C3 タンパク質が、インビトロ試料内にある、補体成分 3 (C3) タンパク質の切断を阻害するための方法。

【請求項 26】

50

前記 C 3 タンパク質が、対象内にある、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアプタマーを含む、補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための組成物。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアプタマーと補体系の成分とを接触させることを含み、前記補体系の成分が、インビトロ試料内にある、補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための方法。

【請求項 2 9】

前記補体系の成分が、対象内にある、請求項 2 7 に記載の組成物。

10

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの有効量を含む、対象の補体成分 3 (C 3) タンパク質の切断を阻害するための組成物。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの有効量を含む、対象の補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のアプタマーの有効量を含む、加齢性黄斑変性症、自己免疫疾患、血液疾患、感染症、敗血症、炎症性疾患、または神経変性疾患を治療するための組成物。

20

【請求項 3 3】

前記自己免疫疾患が、エリテマトーデス及び関節リウマチから選択される、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記血液疾患が、発作性夜間血色素尿症である、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記炎症性疾患が、虚血 / 再灌流傷害、関節炎、及び腎炎から選択される、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記神経変性疾患が、ハンチントン病及びパーキンソン病から選択される、請求項 3 2 に記載の組成物。

30

【請求項 3 7】

C 3 タンパク質の結合親和性を有するアプタマーを選択するための方法であって

(a) C 3 タンパク質と候補混合物を接触させることであって、前記候補混合物が、前記候補混合物の核酸の少なくとも 1 つ、またはそれぞれに含まれる 1 つ、いくつかまたはすべてのピリミジンが C 5 修飾ピリミジンを含む修飾核酸を含み (b) 遅いオフ速度の濃縮プロセスで前記候補混合物を露出することであって、前記候補混合物のその他の核酸に関連する標的分子からの遅いオフ速度を有する核酸が前記 C 3 タンパク質に結合して、核酸 - 標的分子複合体を形成し (c) 前記候補混合物からの遅いオフ速度の核酸を分離すること (d) 遅いオフ速度を有する前記 C 3 タンパク質に結合可能な核酸配列で濃縮された核酸の混合物を産生するために、前記遅いオフ速度の核酸を増幅することによって、前記 C 3 タンパク質分子への遅いオフ速度のアプタマーが選択され、各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P E d U)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T y r d U)、5 - (N - 3, 4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (M B n d U

40

50

)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (F B n d U)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P P d U)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (I m d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h r d U)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2、3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、及び5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジンから選択される、前記方法。

【請求項 38】

前記候補混合物が、前記配列 5 ' - P A G P C - 3 ' (配列番号 : 1 3 2) を含む核酸を含み、各 P が、各・BR>0 において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記候補混合物が、前記配列 5 ' - G P A Y R P P - 3 ' (配列番号 : 1 5 7) または 5 ' - G P A C G P P - 3 ' (配列番号 : 1 3 3) を含む核酸を含み、各 P が、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、Y が、C、U、または T であり、及び R が、G または A である、請求項 37 または請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

各核酸が独立して、約 24 ~ 約 100ヌクレオチドの長さ、または約 30 ~ 約 60ヌクレオチドの長さ、または約 28 ~ 約 60ヌクレオチドの長さ、または約 40 ~ 約 50ヌクレオチドの長さ、または約 28ヌクレオチドの長さである、請求項 37 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

各 C - 5 修飾ピリミジンがそれぞれ独立して、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキ

シアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NE d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 NE d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BF d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BT d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから選択される、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 42】

各 C - 5 修飾ピリミジンが、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (Na p d U) である、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

前記混合物の複数の核酸が、少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 37 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 44】

前記混合物の複数の核酸が、C3 スペースー、HEG リンカーまたはPEG リンカーを含む、請求項 37 ~ 43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

前記 C3 タンパク質が、ヒト C3 タンパク質である、請求項 37 ~ 44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本出願は、2014 年 5 月 30 日に提出された米国仮出願第 62 / 005、300 号の利益を主張するものであり、その全体があらゆる目的のために参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

本開示は、一般に核酸の分野に関し、より詳細には、ヒト補体成分 3 (C3 または C3 - タンパク質) に結合することができるアプタマー、C3 結合アプタマー及び C3 を含む組成物、及び C3 の生物学的機能を阻害する方法、及びそのようなアプタマーを使用して C3 を検出する方法に関する。

【0003】

40

補体系は、血液に見られる可溶性タンパク質及び他の体液、ならびに細胞に結合したタンパク質を含む相互作用タンパク質の群を含む (Makrides、Pharmacological Reviews 1998、50 (1) : 59 - 88)。本系は、病原体に対する宿主防御に必要とされる自然免疫において重要な役割を果たし、病原体の細胞溶解、免疫細胞走化性、及び食作用を媒介する (Janewayら Immunobiology: The Immune System in Health and Disease、第 5 版、New York: Garland Science; 2001)。

【0004】

補体成分 3 (C3) タンパク質 (血液に見出される糖タンパク質) は、本系のメンバーであり、経路において中心的な役割を果たしている (Lambiris、Immunol

50

ogy Today 1988、9(12):387-393)。ヒト補体成分3(C3)の遺伝子は、19番染色体の短腕上に位置しており(Lusisら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1986、83:3929-3933)転写され、処理されてプロC3に翻訳される。プロC3は、分泌時に、部位特異的分子内切断を受け、循環C3を産生する。C3は、ジスルフィド結合により連結された2つのサブユニット(鎖115kDa及び鎖75kDa)を含むタンパク質として循環する。正常ヒト血清中のC3-タンパク質の濃度は、約1.15mg/mlである(Kasperska-Zajacら、J. Inflammation 2013、10:22;doi:10.1186/1476-9255-10-22)。

【0005】

10

その活性化に続いて、表面へのC3-タンパク質の共有結合は、補体系の多くの効果を開始する。活性化は、C3a及びC3bと呼ばれる2つのタンパク質への可溶性C3-タンパク質の部位特異的タンパク質分解によって達成することができる。C3bが、食作用(オプソニン化)のための粒子を対象とするように作用する表面に共有結合するか、または病原体細胞の溶解をもたらす終末補体経路を開始する。C3aは、いわゆるフィラトキシン、たとえば、平滑筋細胞の収縮、血管透過性、肥満細胞の脱顆粒及び免疫細胞の走化性などの多様な生理機能のメディエーターである。それらがC3a及びC3bの両方の生物学的機能と同様に、終末補体経路の活性化を阻害し得るように、部位特異的タンパク質分解の活性化イベントを阻害するC3の阻害剤が望ましい。

【0006】

20

補体系は、一般に宿主の組織損傷を防止するために厳密に調節されている(Thurmanら、J. Immunol. 2006、176:1305-1310)。しかし、調節解除されると、1つまたは複数の制御機構が失敗したとき、または非定型免疫系の変調によって発生するように、生じた過剰な補体活性化が、病態生理学につながり得る。たとえば、非定型溶血性尿毒症症候群及び加齢黄斑変性の両方で、補体制御タンパク質因子Hの変化が、C3-転換活性を増加させ、そのため過剰な補体活性化につながることに関与している(Ferreiraら、Mol. Immunol. 2010、47(13):2187-2197)。補体の過剰活性化は、これらの疾患において観察される組織損傷をもたらす、宿主自身の細胞を攻撃し得る。補体系は、多くの炎症性疾患及び虚血/再灌流傷害に起因する組織損傷にも関与し得る。したがって、C3の活性を阻害するものを含む、補体系を阻害することができる治療剤が、有益であることを証明し得る。本開示は、ヒトC3-タンパク質の生物活性を阻害してC3aの放出を防止することができるアプタマーを提供することにより、そのような必要性を満たす。

30

【0007】

体液中のC3濃度を測定することは、これらに限定されないが、急性の炎症状態、微生物感染症、先天C3欠乏症、急性糸球体腎炎、全身性エリテマトーデス、膜性増殖性糸球体腎炎及び免疫複合体病の診断を含む、いくつかの疾患及び状態の診断検査として有用である(Nilssonら、Clin. Dev. Immunol. 2012、2012:Article ID 962702、11 pages)。現時点では、抗体は、C3を検出するための最も一般的なツールである。しかし、抗体には、限られた貯蔵寿命、特殊な保管要件(たとえば、冷却)、凝集及び比較的高コストな生産と同等の安定性(変化する温度及びpH条件の許容範囲、及び非理想的な条件から回復性の欠如の両方)を含むいくつかの欠点がある。本開示は、ヒトC3-タンパク質に結合特異性を有するアプタマーを提供することによって、抗体で発生する問題に対処する。

40

【発明の概要】

【0008】

本開示は、ヒト補体成分3(C3)タンパク質に結合するアプタマーを記載する。これらのアプタマーは、C3の補体媒介活性化の阻害剤であることが示され、したがって、診断及び治療薬として有用であり得る。C3-タンパク質結合アプタマーを含む医薬組成物、ならびにその製造方法及び使用方法を記載する。

50

【0009】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供される。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 152)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、各Dは、各出現において、それぞれ独立して、A、C、または3炭素スパーサーであり、各Vは、各出現において、それぞれ独立して、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、Lは、A、U、TまたはC-5修飾ピリミジンであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、Yは、C、U、またはTであり、及びnは0または1である。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A Y R P P M - 3' (配列番号: 153)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーである。

10

【0010】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供される。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 131)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、各Dは、各出現において、それぞれ独立して、A、C、または3炭素スパーサーであり、各Vは、各出現において、それぞれ独立して、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、Lは、A、U、TまたはC-5修飾ピリミジンであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、及びnは0または1である。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-K P G R M P D V D_n L P A W P S V G P A C G P P M - 3' (配列番号: 135)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーである。

20

【0011】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-K P G R M P X P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 154)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、Vは、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、Yは、C、U、またはTであり、及びXは、置換または非置換のC₂-C₂₀リンカー、アルキレングリコール、ポリアルキレングリコールから選択されるリンカーである。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-K P G R M P X P A W P S V G P A Y R P P M - 3' (配列番号: 155)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーである。

30

40

【0012】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-K P G R M P X P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 136)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、Vは、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、及びXは、置換または非置換のC₂-C₂₀リンカー

50

、アルキレングリコール、ポリアルキレングリコールから選択されるリンカーである。いくつかの実施形態では、アダマーは、配列 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A C G P P M - 3' (配列番号: 137) を含む。式中、各 M は、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C - 5 修飾ピリミジン、または 3 炭素スパーサーである。

【0013】

上述した実施形態のいずれにおいても、K は、C - 5 修飾ピリミジン、C または G であっても良く、各 M は、各出現において、それぞれ独立して、C または C - 5 修飾ピリミジンであっても良く、及び / または L は、A または C - 5 修飾ピリミジンであっても良い。

【0014】

いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、配列 5' - P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 156) を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、W は、G または 3 炭素スパーサーであり、S は、C または 3 炭素スパーサーであり、V は A、G または C であり、Y は C、U または T であり、及び R は G または A である。

【0015】

いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、配列 5' - P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 134) を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、W は、G または 3 炭素スパーサーであり、S は、C または 3 炭素スパーサーであり、及び V は A、G または C である。

【0016】

いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、配列番号: 4 ~ 130 及び 138 ~ 151 から選択される、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99%、または 100% 同一である配列を含む。ここで、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、配列番号: 4 ~ 28、32 ~ 34、37 ~ 75、78 ~ 118、121 ~ 130、及び 139 ~ 151 から選択される、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99%、または 100% 同一である配列を含む。ここで、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである。

【0017】

いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、第 1 の領域及び第 2 の領域を含み、第 1 の領域は、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号: 132) を含み、第 2 の領域は、配列 5' - G P A Y R P P - 3' (配列番号: 157) を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、Y は、C、U、または T であり、及び R は G または A である。

【0018】

いくつかの実施形態では、C3 タンパク質に結合するアダマーは、第 1 の領域及び第 2 の領域を含み、第 1 の領域は、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号: 132) を含み、第 2 の領域は、配列 5' - G P A C G P P - 3' (配列番号: 133) を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである。

【0019】

いくつかの実施形態では、第 1 の領域の 3' 末端は、第 2 の領域の 5' 末端に共有連結されている。いくつかの実施形態では、第 1 領域及び第 2 領域は、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つのリンカーによって共有連結されており、各リンカーは、ヌクレオチド、置換または非置換の C₂ - C₂₀ リンカーアルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各リンカーは、ヌクレオチド、3 炭素スパーサー、及びヘキサエチレングリコールから独立して選択される。

【0020】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-PAGPC-3'（配列番号：132）を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-GPACGPP-3'（配列番号：133）を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列5'-GPAYRPP-3'（配列番号：157）を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、Yは、C、U、またはTであり、及びRはGまたはAである。

【0021】

10

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーは、配列番号：125の配列を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。

【0022】

本明細書に記載のアプタマーのいくつかの実施形態では、各C-5修飾ピリミジンは、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PedU)、5-(N-チオフェニルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(iBudU)、5-(N-チロシルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(TyrdU)、5-(N-3,4-メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(MBndU)、5-(N-4-フルオロベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(FBndU)、5-(N-3-フェニルプロピルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PPdU)、5-(N-イミジゾリルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ImdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(TrpdU)、5-(N-R-トレオニルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThrdU)、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(3-トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジンクロリド、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(NapdU)、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(2,3-ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン)、5-(N-2-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(2NapdU)、5-(N-2-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-2-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-1-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(NEdU)、5-(N-1-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-1-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-2-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(2NEdU)、5-(N-2-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-2-ナフチルエチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-3-ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BFdU)、5-(N-3-ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-3-ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-3-ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BTdU)、5-(N-3-ベンゾチオフェニル

20

30

40

50

エチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NapdU)、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NapdU)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (NEdU)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2NEdU)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BFdU)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (BTdU)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから独立して選択される。

10

20

【0023】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0024】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、約 24 ~ 約 100 ヌクレオチドの長さ、または約 30 ~ 約 60 ヌクレオチドの長さ、または約 28 ~ 約 60 ヌクレオチドの長さ、または約 40 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さ、または約 28 ヌクレオチドの長さでも良い。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、24 ~ 100 ヌクレオチドの長さ、または 30 ~ 60 ヌクレオチドの長さ、または長さ 28 ~ 60 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 50 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 40 ヌクレオチドの長さ、または 40 ~ 50 ヌクレオチドの長さ、または 28 ~ 32 ヌクレオチドの長さでも良い。

30

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーは、C3 タンパク質に結合し、C3 タンパク質の切断を阻害する。いくつかの実施形態では、C3 のタンパク質は、ヒト C3 タンパク質である。

【0026】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマー及び補体成分 3 (C3) タンパク質を含む、組成物が提供される。このようないくつかの実施形態では、補体成分 3 (C3) タンパク質は、ヒト補体成分 3 (C3) タンパク質である。

40

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーと C3 タンパク質を接触させることを含む、補体成分 3 (C3) タンパク質の切断を阻害するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、C3 タンパク質は、インビトロ試料内にある。いくつかの実施形態では、C3 タンパク質は、対象内にある。

【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーを有する補体系の接触成分を含む、補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、補体系の成分は、インビトロ試料内にある。いくつかの実施形態では、補体系

50

の成分は、対象内にある。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーの有効量を対象に投与することを含む、補体成分 3 (C 3) タンパク質の切断を阻害するための方法が提供される。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーの有効量を対象に投与することを含む、対象内の補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための方法が提供される。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーの有効量を対象に投与することを含む、加齢性黄斑変性症、自己免疫疾患、血液疾患、感染症、敗血症、炎症性疾患、または神経変性疾患を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、エリテマトーデス及び関節リウマチから選択される。いくつかの実施形態では、血液疾患は、発作性夜間血色素尿症である。いくつかの実施形態では、炎症性疾患は、虚血 / 再灌流傷害、関節炎、及び腎炎から選択される。いくつかの実施形態では、神経変性疾患は、ハンチントン病及びパーキンソン病から選択される。

10

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、C 3 タンパク質の切断を阻害するための、本明細書に記載のアプタマーの使用が提供される。いくつかの実施形態では、補体系の少なくとも 1 つの活性を阻害するための、本明細書に記載のアプタマーの使用が提供される。いくつかの実施形態では、加齢性黄斑変性症、自己免疫疾患、血液疾患、感染症、敗血症、炎症性疾患、または神経変性疾患を治療するための本明細書に記載のアプタマーの使用が提供される。いくつかの実施形態では、自己免疫疾患は、エリテマトーデス及び関節リウマチから選択される。いくつかの実施形態では、血液疾患は、発作性夜間血色素尿症である。いくつかの実施形態では、炎症性疾患は、虚血 / 再灌流傷害、関節炎、及び腎炎から選択される。いくつかの実施形態では、神経変性疾患は、ハンチントン病及びパーキンソン病から選択される。

20

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、C 3 タンパク質の結合親和性を有するアプタマーを選択するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は以下を含む。(a) C 3 タンパク質と候補混合物を接触させることであって、候補混合物が、候補混合物の核酸の少なくとも 1 つ、またはそれぞれに含まれる 1 つ、いくつかまたはすべてのピリミジンが C 5 修飾ピリミジンを含む修飾核酸を含み、(b) 遅いオフ速度の濃縮プロセスで候補混合物を露出することであって、候補混合物のその他の核酸に関連する標的分子からの遅いオフ速度を有する核酸が C 3 タンパク質に結合して、核酸 - 標的分子複合体を形成し、(c) 候補混合物からの遅いオフ速度の核酸を分離すること、及び(d) 遅いオフ速度を有する C 3 タンパク質に結合可能な核酸配列で濃縮された核酸の混合物を産生するために、遅いオフ速度の核酸を増幅することによって、C 3 タンパク質分子への遅いオフ速度のアプタマーが選択される。いくつかの実施形態では、候補混合物は、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号 : 1 3 2) を含む核酸を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、候補混合物は、配列 5' - G P A C G P P - 3' (配列番号 : 1 3 3) を含む核酸を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、候補混合物は、配列 5' - G P A Y R P P - 3' (配列番号 : 1 5 7) を含む核酸を含む。式中、各 P は、各出現において、それぞれ独立して、C - 5 修飾ピリミジンであり、Y は、C、U、または T であり、及び R は、G または A である。いくつかの実施形態では、各核酸は独立して、約 2 4 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチドの長さ、または約 3 0 ~ 約 6 0 ヌクレオチドの長さ、または約 2 8 ~ 約 6 0 ヌクレオチドの長さ、または約 4 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチドの長さ、または約 2 8 ヌクレオチドの長さでも良い。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリ

30

40

50

ジン、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - フェネチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P E d U)、5 - (N - チオフェニルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - チロシルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T y r d U)、5 - (N - 3、4 - メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (M B n d U)、5 - (N - 4 - フルオロベンジルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (F B n d U)、5 - (N - 3 - フェニルプロピルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (P P d U)、5 - (N - イミジゾリルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (I m d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - R - トレオニルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (T h r d U)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジンをクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (2、3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2 ' - O - メチルウリジン、5 -

(N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフェニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U) である。いくつかの実施形態では、混合物の複数の核酸は、少なくとも 1 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、混合物の複数の核酸は、C 3 スペース、H E G リンカーまたは P E G リンカーを含む。いくつかの実施形態では、C 3 のタンパク質は、ヒト C 3 タンパク質である。

10

【0034】

本発明の前述及び他の目的、特徴、及び利点は、添付の図面を参照しながら進める以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1A及び図1Bは、(A) 25個の独立して由来する活性パターン1アプタマー配列を示す。同一または同等の(5以下のヌクレオチド差異)アプタマーは、40,000を超える配列のラウンド9プールから配列決定された回数が表示される。パターン1の8491-3__3の最も頻繁に配列決定されたアプタマーと同一のヌクレオチドが、各配列内で強調表示される。(B) アプタマーパターン1のヌクレオチド位置及びコンセンサス配列(配列番号135)は、上の2つの列に示されている。列A、C、G、及びP(Aはアデニンであり、Cはシトシンであり、Gはグアニンであり、PはN a p d Uである)は、これらのヌクレオチドが、コンセンサス配列を定義する23ヌクレオチド位置の各々でアプタマーパターン1において観察される頻度を示す。コンセンサス配列では、複数のヌクレオチドのコンセンサスが、次の一文字コードで示されている。R = AまたはG、M = PまたはC、K = C、GまたはP、L = AまたはP、D = CまたはA、V = A、CまたはG。単一塩基の挿入は、位置8と9の間で可能である。この挿入は、0.16の頻度で発生した。「挿入なし」頻度は0.84だった。

20

【図2】タンパク質濃度(x軸)の関数としてプロットする結合したDNA分子(y軸)の画分のグラフ表示を示す。ヒトC3-タンパク質濃度は、 1×10^{-7} Mから 1×10^{-12} Mまでの範囲にわたり、平衡結合定数(K_d)は、 $y = (\text{最大} - \text{最小}) (P_t) / (K_d + P_t) + \text{最小}$ を使用して計算した。アプタマー8491-94__3(配列番号: 5)、8491-94__53(配列番号: 58)、及び8491-94__97(配列番号: 125)は、それぞれ、 3.13×10^{-11} M、 3.34×10^{-11} M及び 5.49×10^{-11} Mの K_d でC3に結合する。

30

【図3】制御タンパク質のヒトC5濃度(x軸)の関数としてプロットする結合したDNA分子(y軸)の画分のグラフ表示を示す。C5タンパク質濃度は、 1×10^{-7} Mから 1×10^{-12} Mの範囲にわたる。8491-94__53(配列番号: 58)または8491-94__97(配列番号: 125)は、ヒトC5タンパク質との識別可能な結合は検出されなかった。

40

【図4】パターン1の配列は、ヒト血清の抗体で覆われたヒツジ赤血球の補体媒介性溶血を阻害する。25 nMのヒトC3-タンパク質及び指示されたアプタマーの1 μ Mを使用して、実施例3に記載したように実験を行った。各バーは、「阻害剤なしの制御」に関する2つの独立した実験の溶血パーセントの中央値を表示したものである。浸透溶解制御は、すべての赤血球が溶解されたときに412 nmでの吸光度の相対パーセントを示す。誤差バーは、2つの実験の範囲を示す。非結合アプタマーの8491-94__14(配列番号: 35)、8491-94__15(配列番号: 36)、8491-398__3(配列番号: 30)及び8491-401__3(配列番号: 29)は、25%未満の溶解を阻害する。C3-タンパク質結合アプタマーの8491-3__3(配列番号: 4)、8491-94__3(配列番号: 5)、8491-189__3(配列番号: 8)、8491-282

50

__3 (配列番号: 9)、8491-387__3 (配列番号: 16)、8491-388__3 (配列番号: 18)、8491-389__3 (配列番号: 6)、8491-390__3 (配列番号: 7)、8491-393__3 (配列番号: 14)、8491-394__3 (配列番号: 11)、8491-395__3 (配列番号: 10)、8491-396__3 (配列番号: 13)、8491-397__3 (配列番号: 12)、8491-399__3 (配列番号: 27)、8491-400__3 (配列番号: 24)、8491-405__3 (配列番号: 17)、8491-406__3 (配列番号: 15) 及び 8491-409__3 (配列番号: 28) は、50% 超の溶解を阻害する。

【図5】図5A及び図5Bは、8491-94__3 (配列番号: 5) 及びその誘導体によるヒト血清の抗体で覆われたヒツジ赤血球の補体媒介性溶血の阻害。図に示すように、ヒトC3-タンパク質の固定濃度(20 nM)を有するアプタマーの様々な濃度を使用して、実施例3に記載したように実験を行った。IC₅₀を決定するために、データを4パラメータ ロジスティック方程式に当てはめる。パネル(A)は、8491-94__3が、14.8 nMのIC₅₀で阻害することを示し、その一方で、8491-94__26 (配列番号: 54)、8491-94__27 (配列番号: 55)、8491-94__30 (配列番号: 60)、8491-94__36 (配列番号: 66)、8491__94__37 (配列番号: 67) 及び 8491-94__43 (配列番号: 73) がそれぞれ、15.1 nM、24.6 nM、20.9 nM、25.0 nM、24.7 nM 及び 19.2 nMのIC₅₀値で阻害することを示す。パネル(B)は、アプタマー、8491-94__53 (配列番号: 58) が、17.1 nMのIC₅₀で阻害することを示し、その一方で、アプタマー 8491-94__90 (配列番号: 118)、8491-94__97 (配列番号: 125) 及び 8491-94__100 (配列番号: 128) がそれぞれ、18.9 nM、15.6 nM、及び 19.7 nMのIC₅₀値で阻害することを示す。

【図6】ザイモサンA誘発補体活性化後の8491-94__3 (配列番号: 5)、8491-94__53 (配列番号: 58) 及び 8491-94__97 (配列番号: 125) によるC3aの放出(34%の正常ヒト血清)の阻害。実施例4に記載したように実験を行った。8491-94__3 (配列番号: 5)、8491-94__53 (配列番号: 58) 及び 8491-94__97 (配列番号: 125) のそれぞれ、2 µM、1.5 µM、及び 3 µMのIC₅₀値を決定するためにデータを4パラメータ ロジスティック方程式に当てはめる。

【図7】図7A及び図7Bは、アプタマーの8491-94__53 (配列番号: 58)、8491-94__90 (配列番号: 118)、8491-94__97 (配列番号: 125)、8491-94__100 (配列番号: 128) 及び 8491-94__102 (配列番号: 130) (250 nM) は、実施例5に記載したように0.002 units/µLのDNアーゼI(A)で指定された数時間、37℃で消化され、消化産物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。バンドはSYBRゴールドで可視化した。完全長(FL)アプタマー及びNがヌクレオチドの数である選択された分子長マーカーのサイズを示す。(B)濃度測定によって測定される時間に対する各完全長アプタマー バンド(SOMAmer)の残りのパーセント。接頭辞「OH」は、修飾されていない5'末端を示す。

【図8】図8A及び図8Bは、アプタマーの8491-94__53 (配列番号: 58)、8491-94__90 (配列番号: 118)、8491-94__97 (配列番号: 125)、8491-94__100 (配列番号: 128) 及び 8491-94__102 (配列番号: 130) は、実施例5に記載したように0.014 units/µLのDNアーゼIIで指定された数時間、37℃で消化され、消化産物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。消化産物は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。バンドはSYBRゴールドで可視化した。完全長(FL)アプタマー及びNがヌクレオチドの数である選択された分子長マーカーのサイズを示す。(B)濃度測定によって測定される時間に対する各完全長アプタマー バンド(SOMAmer)の残りのパーセント。接頭辞「OH」は、修飾されていない5'末端を示す。

【図 9】実施例 15 で説明するように、特定の例示的な C - 5 修飾ピリミジン（または 5 - dU 修飾）を示す。たとえば、図 10 に示すように、各修飾構造は dU に結合する。

【図 10】実施例の項で説明するように、特定の C - 5 ピリミジン及び骨格修飾を示す。

【図 11】遅いオフ速度のアプタマーなどのアプタマーに組み込み得る特定の例示的な修飾ピリミジン（または C - 5 修飾ピリミジン）を示す。図 11 は、R'、R''、及び R''' の定義を示す。

【図 12】図 12 A 及び図 12 B は、(A) ザイモサン A 誘発補体活性化後のパターン 1 SOMA mers 8491 - 3__3 (配列番号: 4)、8491 - 94__3 (配列番号: 5)、8491 - 189__3 (配列番号: 8)、8491 - 387__3 (配列番号: 16) 及び 8491 - 389__3 (配列番号: 6) による 10% 正常ヒト血清の C3a 放出の阻害。アプタマー濃度は 2 μ M で、実施例 4 に記載したように実験を行った。データは、阻害剤なしの制御から得られる信号のパーセントとして提示される。(B) 8491 - 3__3 (配列番号: 4)、(8491 - 94__3 (配列番号: 5)、8491 - 189__3 (配列番号: 8)、8491 - 387__3 (配列番号: 16) 及び 8491 - 389__3 (配列番号: 6) を実証する対照実験は、実質的に C3a 放出のアッセイを妨害しない。データは、阻害剤なしの制御から得られる信号のパーセントとして提示される。

【発明を実施するための形態】

【0036】

I. 用語及び方法

特に記載のない限り、技術用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes V、published by Oxford University Press、1994 (ISBN 0 - 19 - 854287 - 9); Kendrew ら (編)、The Encyclopedia of Molecular Biology、published by Blackwell Science Ltd.、1994 (ISBN 0 - 632 - 02182 - 9); 及び Robert A. Meyers (編)、Molecular Biology 及び Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、published by VCH Publishers、Inc.、1995 (ISBN 1 - 56081 - 569 - 8) に見られるものであっても良い。

【0037】

本開示の様々な実施形態の検討を容易にするために、特定の用語の以下の説明が提供される。

【0038】

アプタマー: 本明細書で使用する場合、用語のアプタマーは、標的分子に望ましい作用をもたらす天然には存在しない核酸を指す。望ましい作用としては、これらに限定されるものではないが、標的を結合させること、標的の活性を阻害すること、標的の活性を増強すること、標的の結合特性を変化させること（たとえば、リガンド、受容体、補因子などの標的の親和性を増減させることなど）、標的の処理を阻害すること（タンパク質標的のプロテアーゼ切断を阻害することなど）、標的の処理を増強すること（タンパク質標的のプロテアーゼ切断の速度または範囲を増加することなど）、及び標的と別の分子との間の反応を阻害または促進することを含む。アプタマーはまた、「核酸リガンド」と呼ばれることもある。いくつかの実施形態では、アプタマーは SOMA mer である。特に記載のない限り、本明細書で使用する場合、用語「アプタマー」は、アプタマー及びそれらの薬学的に許容可能な塩を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、標的分子に特異的に結合するものであり、標的分子は、ワトソン/クリック塩基対合または三重らせん形成とは独立した機構を介してアプタマーに結合するポリヌクレオチド以外の三次元化学構造であり、アプタマーは、標的分子に結合される周知の生理学的機能を有する核酸ではない。いくつかの実施形態では

、所定の標的に対するアプタマーは、以下の方法により、核酸の候補混合物から同定された核酸を含む。(a) 標的と候補混合物を接触させることであって、候補混合物のその他の核酸に比べて標的に対して高い親和性を有する核酸を、候補混合物の残りから分けることができ、(b) 候補混合物の残りから高い親和性の核酸を分けること、及び(c) 高い親和性の核酸を増幅して、核酸のリガンド富化混合物を得て、それにより、標的分子に対するアプタマーが同定される。親和性相互作用とは程度の問題だと認識されるが、本明細書中では、アプタマーのその標的に対する「特定の結合親和性」とは、通常、アプタマーがその標的に、混合物または試料のその他の非標的、成分に結合するよりも非常に高い程度の親和性で結合することを意味する。「アプタマー」または「核酸リガンド」は、特定のヌクレオチド配列を有する核酸分子の1つのタイプまたは種のコピーの組みである。アプタマーは、ヌクレオチドの任意の適切な数を含むことができる。「アプタマー」とは、2つ以上のそのような分子の組みを指す。異なるアプタマーはヌクレオチドの同一または異なる数のいずれかを有することができる。アプタマーは、DNA、RNA、DNAとRNAの両方、及びいずれかまたは両方の修飾された版を含み得て、一本鎖、二本鎖、または二本鎖領域もしくは三本鎖領域、または他の任意の三次元構造を含み得る。

10

【0040】

生物活性：本明細書で使用する場合、生物活性という用語は、生理学的または病態生理学的プロセスに影響を及ぼす可能性がある、1つまたは複数の細胞間、細胞内または細胞外のプロセス（たとえば、細胞-細胞結合、リガンド受容体結合、細胞シグナリング、など）を指す。

20

【0041】

C-5修飾ピリミジン：本明細書で使用する場合、C-5修飾ピリミジンは、C-5位での修飾ピリミジンを指す。C-5修飾ピリミジンの実施例には、米国特許第5,719,273号及び5,945,527号に記載のものを含む。C-5修飾ピリミジンの特定の非限定的な実施例は、本明細書に提供される。

【0042】

C3アプタマー：本明細書で使用する場合、「C3アプタマー」は、C3-タンパク質に結合することができるアプタマーを指す。

【0043】

C3-スパーサー：本明細書で使用する場合、「C3スパーサー」または「3炭素スパーサー」または「C3置換」は、ヌクレオチドと同じ距離に及ぶように設計された少なくとも3個の炭素を含むリンカーを指すが、リボース糖及びプリンまたはピリミジン塩基部分が欠損している。いくつかの実施形態では、C3スパーサーは、構造(CH₂)₃を有し、ホスホジエステル結合またはホスホロチオエート結合を介して隣接ヌクレオチドまたはその他の部分に共有結合されている。

30

【0044】

補体系の成分：本明細書で使用する場合、補体系の成分は、補体経路において機能し、補体経路を開始、活性化、促進及び/または調節することができる1つまたは複数のタンパク質を指す。したがって、補体系の成分を含む試料を接触させた結果、補体系を阻害するかまたは実質的に阻害することができる試薬（たとえば、アプタマー）のコンテキストでは、試薬は、一例として、補体経路の1つまたは複数のタンパク質の活性、結合及び/または機能を相互作用、結合及び/または妨害し得る。

40

【0045】

阻害：本明細書で使用する場合、阻害という用語は、標的が測定可能な活性量を失う範囲に標的の生物学的活性を低下させること、または標的がもはや測定可能な活性を有していない範囲に標的の安定性を減少させる及び/または標的の活性を減少させることを意味する。いくつかの実施形態では、そのような阻害は、他の部分を有する標的との相互作用に影響を及ぼす及び/または標的の処理に影響を及ぼすことによって発生し得る。本明細書に記載されているように、阻害され得る対象はC3である。

【0046】

50

修飾：本明細書で使用する場合、用語「修飾」、「修飾した」、「修飾する」、及びそれらの任意の変形は、オリゴヌクレオチドに関連して使用される場合、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非天然の糖部分、少なくとも1つの非天然ヌクレオシド間結合、少なくとも1つの非天然ヌクレオチド塩基部分、及び/または（たとえば、3個の炭素スパーサーまたはヘキサエチレングリコール（HEG）などの）オリゴヌクレオチドの天然には存在しない少なくとも1つの部分などの少なくとも1つの非天然の部分を含むことを意味する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの4つの構成ヌクレオチド塩基の少なくとも1つ（すなわち、A、G、T/U、及びC）が修飾ヌクレオチドである。いくつかのこのような実施形態では、修飾ヌクレオチドは、天然に存在する塩基よりも疎水性である塩基部分を含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性を付与する。いくつかの実施形態では、アプタマーは、疎水性塩基部分を含む1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む場合、アプタマーは、主に疎水性相互作用を介して、タンパク質などの、アプタマーの標的に結合する。いくつかの実施形態では、そのような疎水性相互作用は、高結合効率で安定した共結晶複合体を生じる。C-5位の置換を持つピリミジンは、修飾ヌクレオチドの例である。修飾には、キャッピングなどの3'及び5'修飾も含めることができる。他の修飾には、天然に存在するヌクレオチドを1つまたは複数の類似体で置換したもの、ヌクレオチド間修飾で置換したものなど、たとえば、非荷電連結（たとえば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート、など）及び荷電連結（たとえば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、など）、インターカレーター（たとえば、アクリジン、ソラレン、など）、キレート剤（たとえば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属、など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、及び修飾連結（たとえば、アルファ-アノマー核酸、など）を含むことができる。さらに、ヌクレオチドの糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれも、ホスホン酸基またはリン酸基で置換されていても、標準的な保護基で保護されていても、または追加のヌクレオチドまたは固体支持体に追加の結合を調製するように活性化されていても良い。5'及び3'末端のOH基は、リン酸化することも、またはアミン類、約1～約20個の炭素原子の有機キャッピング基部分、いくつかの実施形態では、約10～約80kDaの範囲のポリエチレングリコール（PEG）ポリマー、いくつかの実施形態では、約20～約60kDaの範囲のPEGポリマー、またはその他の親水性または疎水性の生体ポリマーまたは合成ポリマーで置換することができる。一実施形態では、修飾は、ピリミジンのC-5位である。これらの修飾は、直接C-5位で、または結合のその他の種類によって、アミド結合を介して製造することができる。

【0047】

ポリヌクレオチドは、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環糖の類似体、-アノマー糖、アラビノース、キシロースまたはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリル酸類似体及びメチルリボシドなどの脱塩基ヌクレオシド類似体を含む、当該分野において一般的に知られているリボース糖またはデオキシリボース糖の類似形態も含むことができる。上述のように、1つまたは複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えても良い。これらの代替の連結基は、リン酸塩がP(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタール」）で置換されており、各RまたはR'は、独立して、Hまたは、必要に応じてエーテル（-O-）結合、アリル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルジルを含む、置換もしくは非置換アルキル（1-20C）である実施形態を含む。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。類似形態の糖、プリン、及びピリミジンの置換は、たとえば、ポリアミド骨格のような別の骨格構造をとることができるため、最終産物の設計の点で有利になる場合がある。

【0048】

調節：本明細書で使用する場合、「調節する」は、増加または減少させることによって

10

20

30

40

50

、標的のレベル、安定性、処理、及び／または活性を変化させることを意味する。

【0049】

核酸：本明細書で使用する場合、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、交換可能に使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し、DNA、RNA、DNA/RNAのハイブリッド、及びそのようなエンティティの修飾された版を含む。用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸」は、二本鎖分子または一本鎖分子、ならびに三重らせん分子を含む。核酸という用語は、アプタマーを含むが、これに限定されない（すなわち、この用語は、ヌクレオチドのその他のポリマーを含む）。

【0050】

ヌクレアーゼ：本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ」は、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドサブユニット間のホスホジエステル結合を切断することができる酵素を意味する。本明細書で使用する場合、用語「エンドヌクレアーゼ」は、オリゴヌクレオチドの内部部位でホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。本明細書で使用する場合、用語「エキソヌクレアーゼ」は、オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドを連結しているホスホジエステル結合を切断する酵素を指す。生体液は、典型的には、エンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼの両方の混合物を含む。

10

【0051】

ヌクレアーゼ耐性：本明細書で使用する場合、用語「ヌクレアーゼ耐性」及び「ヌクレアーゼ耐性」は、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼの基質として機能するオリゴヌクレオチドの能力の低下を指す。そのため、そのような酵素と接触した場合、オリゴヌクレオチドは、分解されないかまたは類似の長さ及び配列だが、ヌクレアーゼ耐性を測定している1つまたは複数のオリゴヌクレオチドの修飾を欠損している対照オリゴヌクレオチドよりもゆっくりもしくはより少ない範囲で分解される。

20

【0052】

ヌクレオチド：本明細書で使用する場合、用語「ヌクレオチド」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、またはその修飾形態を指す。ヌクレオチドは、プリン（たとえば、アデニン、ヒポキサンチン、グアニン、など）、ならびにピリミジン（たとえば、シトシン、ウラシル、チミンなど）を含む種を含む。塩基が「A」、「C」、「G」、「U」、または「T」として示されている場合は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの両方を包含することを意図し、その形態が修飾される。

30

【0053】

薬学的に許容可能：本明細書で使用する場合、薬学的に許容可能とは、動物に、より具体的にはヒトに使用することが、連邦または州政府の規制当局によって認可されているか、または米国薬局方またはその他の一般的に知られている薬局方で認められていることを意味する。

【0054】

薬学的に許容可能な塩：本明細書で使用する場合、薬学的に許容可能な塩（たとえば、アプタマー）は、化合物及びイオン結合を介して化合物に結合した1つまたは複数の追加の薬学的に許容可能な原子または基を含む産物を意味する。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な塩は、酸または塩基と化合物を接触させることによって生産される。薬学的に許容可能な塩は、これらに限定されないが、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、アルキルスルホン酸塩、アリールスルホン酸塩、アリールアルキルスルホン酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、及び酒石酸塩を含む酸付加塩、及びLi、Na、K、MgまたはCaなどのアルカリ土類金属塩などのアルカリ金属カチオン、または有機アミン塩などを含む。特に記載のない限り、本明細書で使用する場合、用語「アプタマー」は、アプタマー及びそれらの薬学的に許容可能な塩を含む。

40

【0055】

医薬組成物：本明細書で使用する場合、医薬組成物は、個体への投与に適した形態の化合物（アプタマーなど）を含む製剤を意味する。医薬組成物は、典型的には、その意図さ

50

れる投与経路に適合するように処方される。投与経路の例には、これらに限定されないが、たとえば、皮下注射または注入、静脈内注射または注入、関節内注射、動脈内注射及びび注入、房水内注射及び移植、及び硝子体内注射及び注入を含む、硝子体内、経腸及び非経口が含まれる。

【0056】

タンパク質：本明細書で使用する場合、「タンパク質」は、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「ペプチド断片」と同じ意味で使用される。「精製した」ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、またはペプチド断片は、細胞物質、または精製したタンパク質を得た細胞、組織、もしくは無細胞供給源に由来する他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成する場合には、化学的な前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。

10

【0057】

SELEX：本明細書で使用する場合、SELEXという用語は、通常、望ましい方法、たとえば、タンパク質と高親和性で結合する方法で、標的分子と相互作用する核酸の選択し、選択した核酸の増幅を指す。SELEXは、特定の標的分子に対して高い親和性を有するアプタマーを同定しても良い。SELEX及び「SELEXプロセス」という用語は、交換可能に使用されても良い。いくつかの実施形態では、標的分子に結合するアプタマーを選択する以下の方法を提供する。(a)核酸の候補混合物を調製することであって、候補混合物は、候補混合物の核酸の少なくとも1つ、またはそれぞれの少なくとも一つのピリミジンがC5位で化学的に修飾されている修飾された核酸を含み、(b)標的分子と候補混合物を接触させることであって、候補混合物のその他の核酸と比べて標的分子に対して高い親和性を有する核酸が、標的分子に結合して、核酸-標的分子複合体を形成し、(c)候補混合物の残りから高い親和性の核酸を分けること、及び(d)高い親和性の核酸を増幅して、高い親和性で標的分子と結合することが可能な核酸配列に富んだ核酸混合物を得て、それにより、標的分子に対するアプタマーが同定される。特定の実施形態では、方法は、遅いオフ速度の濃縮プロセスを実行することをさらに含む。

20

【0058】

配列同一性：本明細書で使用する場合、配列同一性は、2つ以上の核酸配列のコンテキストでは、配列によって共有される同一のヌクレオチド位置の数(すなわち、%同一性=同一位置の数/比較された2つの配列のより短い位置の総数×100)、ギャップの数、及び2つ以上の配列のアライメントを最適化するために導入する必要があるそれぞれのギャップの長さを考慮する。配列の比較及び2つ以上の配列間の同一性パーセントの決定は、デフォルトのパラメータでのBLAST及びGapped BLASTプログラムなどの、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる(たとえば、Altschulら、J.Mol.Biol.215:403、1990、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTでBLASTNも参照のこと)。配列比較のために、典型的には1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列をコンピューターに入力し、必要であればサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズム プログラム パラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラム パラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を計算する。比較のための配列の最適整列は、たとえば、the local homology algorithm of Smith及びWaterman、Adv.Appl.Math.、2:482、1981、the homology alignment algorithm of Needleman及びWunsch、J.Mol.Biol.、48:443、1970、the search for similarity method of Pearson及びLipman、Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444、1988、computerized implementations of these algorithms (GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA in the Wisconsin Genetics Software Packag

30

40

50

e、Genetics Computer Group、575 Science Dr.
、Madison、Wis.)、またはvisual inspection (see generally、Ausubel、F.M.ら、Current Protocols in Molecular Biology、pub. by Greene Publishing Assoc.及びWiley-Interscience (1987))により、実施することができる。本明細書で使用する場合、そのようなアプタマーなどの核酸のパーセント同一性を記述するときには、少なくとも、たとえば、参照ヌクレオチド配列に対して約95%同一であるということは、その核酸配列が、参照核酸配列の100個のヌクレオチドあたり5つまでの点突然変異を含み得るということを除いて、参照配列と同一であるということを意図している。言い換えると、参照核酸配列と少なくとも約95%同一の所望の核酸配列を得るためには、参照配列のヌクレオチドの5%までを欠損させても良いか、または別のヌクレオチドで置換しても良いか、あるいは参照配列のヌクレオチドの総数の5%までの数個のヌクレオチドを参照配列に挿入しても良いことを意図している(本明細書では挿入と呼ぶ)。所望の配列を生成する参照配列のこのような突然変異は、参照ヌクレオチド配列の5'または3'末端で発生するか、またはそれらの末端位置の間のどこで生じても良く、参照配列のヌクレオチド間に個々に点在しても、または参照配列内の1つまたは複数の連続した基に点在しても良い。

10

【0059】

SOMAmer: 本明細書で使用する場合、「SOMAmer」または遅いオフ速度の修飾アプタマーは、30分、60分、90分、120分、150分、180分、210分、または240分のオフ速度($t_{1/2}$)のアプタマーを指す(疎水性修飾を有する少なくとも1個のヌクレオチドを含むアプタマーを含む)。いくつかの実施形態では、「向上したオフ速度を有するアプタマーを生成するための方法」という名称の米国特許第7,947,447号に記載されている、向上したSELEX法を使用してSOMAmerを生成する。

20

【0060】

スペーサー: 本明細書で使用する場合、スペーサーは、修飾オリゴヌクレオチドの一部を形成し、典型的には修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシドに代わる非ヌクレオシド小分子を指す。例示的なスペーサー配列は、これらに限定されないが、ポリエチレングリコール、炭化水素鎖(3炭素スペーサーなど)、及びその他のポリマーまたはコポリマーを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、アプタマーの活性を維持しながら、アプタマーの(2コンセンサスまたは保存領域などの)2つの領域を結合する共有結合性分子足場を提供する。特定の態様では、スペーサー配列は、ヌクレオチドの(修飾された糖部分を含む)糖部分の3'または5'位を介して隣接するヌクレオチドに共有結合しても良い。

30

【0061】

実質的に阻害する: 本明細書で使用する場合、実質的に阻害するとは、完全または部分的なブロック、たとえば、活性または制御に対する効果のあらゆる測定可能な減少または少なくとも10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%または90%の阻害または減少を指す。いくつかの実施形態では、(標的の切断などの)標的または標的に対する効果の活性の阻害は、アプタマーの存在下で測定され、制御はアプタマーの非存在下で実質的に同様の条件である。いくつかの実施形態では、測定される活性は、補体系の活性である。当業者は、補体系の活性レベル、すなわち阻害を測定するために使用することができる異なるアッセイ及び方法を理解することができる。補体系の阻害の程度を決定するために使用することができる例示的な方法は、実施例3に詳細に記載されている補体媒介性溶血のための任意のアッセイを含む。別の例示的な方法は、実施例4に詳細に記載されるようにC3a及びC3bへのC3-タンパク質のタンパク質分解による切断の程度を測定することを含む。

40

【0062】

標的分子: 本明細書で使用する場合、標的分子(または標的)は、アプタマーが望まし

50

い様式で作用することができるポリヌクレオチド以外の三次元化学構造を有する任意の化合物または分子を意味する。標的分子の非限定的な例としては、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、多糖、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、病原体、毒性物質、基質、代謝物、遷移状態類似体、補因子、阻害剤、薬剤、色素、栄養素、成長因子、細胞、組織、前述のいずれかの任意の部分または断片、などがある。実質的に任意の化学的または生物学的エフェクターは、適切な標的であり得る。どのような大きさの分子も標的となり得る。標的は、標的と核酸との間の相互作用の可能性または強度を高めるために特定の方法で変更することができる。標的は、特定の化合物または分子に任意のわずかな変異を含んでも良い。たとえば、タンパク質の場合では、たとえば、アミノ酸配列、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または、分子の同一性に実質的な変化を及ぼさない、標識成分との結合を含む、任意のその他の操作または修飾などに、わずかな変異を含んでも良い。「標的分子」または「標的」は、アプタマーに結合することができる分子または多分子構造の1つの型または1つの種のコピーの組みである。「標的分子」または「標的」とは、2つ以上の分子のそのような組みを指す。

10

【0063】

治療有効量：本明細書で使用する場合、用語「治療有効量」は、一般に、本明細書に記載されるように、予防、軽減、または治療される疾患または状態の少なくとも1つの症状を改善するのに必要な量を意味する。本開示のアプタマーに関連する語句「治療有効量」は、アプタマーが、そのような治療を必要とする相当数の個体に投与される特定の薬理的応答を提供するアプタマーの投与量を意味する。特定の固体に投与される薬物の治療的有效量は、たとえこのような投与量が当業者によって治療的有效量と見なされる場合であっても、本明細書に記載される状態/疾患を治療する際に常に有効であるとは限らないことが強調される。

20

【0064】

単数形の「a」、「an」及び「the」は、文脈から、そうでないことが明らかにでない限り、複数の対象を含む。「Comprising A or B」は、A、またはB、またはA及びBを含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられたすべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、及びすべての分子量または分子質量値は概算であり、説明のために提供されることがさらに理解されるべきである。

30

【0065】

さらに、本明細書に提供される範囲は、範囲内のすべての値の省略表現であることが理解される。たとえば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50（及び文脈から、そうでないことが明らかでない限り、その分数）からなる群から任意の数字、数字の組み合わせ、または副範囲を含むと理解される。任意の濃度範囲、パーセント範囲、比率範囲または整数範囲は、特に明記しない限り、列挙される範囲内の任意の整数の値を含み、必要に応じて、その分数（整数の1/10及び1/100など）を含むものと理解される。また、ポリマーのサブユニット、サイズまたは厚さなどの任意の物理的性質に係る、本明細書で列挙される任意の数字範囲は、特に明記しない限り、列挙される範囲内の任意の整数を含むものと理解される。本明細書で使用する場合、「約」または「から本質的になる」は、特に明記しない限り、指定の範囲、値又は構造の±20%を意味する。本明細書で使用する、用語「include」及び「comprise」は、同義的に使用される。本明細書で使用する、用語「a」及び「an」は、列挙される要素の「1以上」を指すことを理解されたい。選択肢（たとえば、「or」）の使用は、選択肢の1つ、両方またはその任意の組み合わせのいずれかを意味することを理解されたい。

40

【0066】

50

本明細書で記載したものと類似または同等の方法及び材料を、本発明の実施または試験で使うことができるが、適切な方法及び材料を以下に記載する。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合には、用語の説明を含む本明細書が基準となる。さらに、材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

【0067】

II. 概要

本発明は、具体的にはC3タンパク質(「C3アプタマー」ということがある)に結合するアプタマーを提供する。いくつかの実施形態では、アプタマーは、C3タンパク質の切断を阻害する。

【0068】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-KPGRM_nPDVD_nLP_nAWPSVGPAYRPP-3'(配列番号:152)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、各Dは、各出現において、それぞれ独立して、A、C、または3炭素スパーサーであり、各Vは、各出現において、それぞれ独立して、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、Lは、A、U、TまたはC-5修飾ピリミジンであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、Yは、C、U、またはTであり、及びnは0または1である。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-KPGRM_nPDVD_nLP_nAWPSVGPAYRPPM-3'(配列番号:153)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーである。

【0069】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-KPGRM_nPDVD_nLP_nAWPSVGPACGPP-3'(配列番号:131)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、各Dは、各出現において、それぞれ独立して、A、C、または3炭素スパーサーであり、各Vは、各出現において、それぞれ独立して、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、Lは、A、U、TまたはC-5修飾ピリミジンであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、及びnは0または1である。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-KPGRM_nPDVD_nLP_nAWPSVGPACGPPM-3'(配列番号:135)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーである。

【0070】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-KPGRM_nXP_nAWPSVGPAYRPP-3'(配列番号:154)を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、Vは、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、Yは、C、U、またはTであり、及びXは、置換または非置換のC₂-C₂₀リンカー、アルキレングリコール、ポリアルキレングリコールから選択されるリンカーである。いくつかの実施形態では、アプタマーは、配列5'-KPGRM_nXP_nAWPSVGPAYRPPM-3'(配列番号:155)を含む。式中、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、C、U、T、C

10

20

30

40

50

- 5 修飾ピリミジン、または 3 炭素スパーサーである。

【0071】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列 5' - K P G R M P X P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 136) を含む。式中、Kは、C-5修飾ピリミジン、C、U、T、G、または3炭素スパーサーであり、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、RはAまたはGであり、Mは、C、U、T、C-5修飾ピリミジン、または3炭素スパーサーであり、Vは、A、G、C、または3炭素スパーサーであり、WはGまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、及びXは、置換または非置換の C₂ - C₂₀ リンカー、アルキレングリコール、ポリアルキレングリコールから選

10

【0072】

上述した実施形態のいずれにおいても、Kは、C-5修飾ピリミジン、CまたはGであっても良く、各Mは、各出現において、それぞれ独立して、CまたはC-5修飾ピリミジンであっても良く、及び/またはLは、AまたはC-5修飾ピリミジンであっても良い。

【0073】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列 5' - P A W P S V G P A Y R P P - 3' (配列番号: 156) を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、Wは、Gまたは3炭素スパーサーであり、Sは、Cまたは3炭素スパーサーであり、VはA、GまたはCであり、YはC、UまたはTであり、及びRはGまたはAである。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列 5' - P A W P S V G P A C G P P - 3' (配列番号: 134) を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、Wは、Gまたは3炭素スパーサーであり、及びSは、Cまたは3炭素スパーサーであり、VはA、GまたはCである。

30

【0075】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列番号: 4 ~ 130 及び 138 ~ 151 から選択される、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含む。ここで、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、各PはN a p d Uである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列番号: 4 ~ 28、32 ~ 34、37 ~ 75、78 ~ 118、121 ~ 130、及び139 ~ 151 から選択される、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%同一である配列を含む。ここで、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、各PはN a p d Uである。

40

【0076】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、第1の領域及び第2の領域を含み、第1の領域は、配列 5' - P A G P C - 3' (配列番号: 132) を含み、第2の領域は、配列 5' - G P A Y R P P - 3' (配列番号: 157) を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、Yは、C、U、またはTであり、及びRはGまたはAである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、第1の領域及び第2の領域を含み、第1の領域は、配列 5' - P A G P C - 3' (配列

50

番号：132)を含み、第2の領域は、配列5'-GPACGPP-3'(配列番号：133)を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。

【0077】

いくつかの実施形態では、第1の領域の3'末端は、第2の領域の5'末端に共有連結されている。いくつかの実施形態では、第1領域及び第2領域は、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのリンカーによって共有連結されており、各リンカーは、ヌクレオチド、置換または非置換のC₂-C₂₀リンカーアルキレングリコール、及びポリアルキレングリコールから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各リンカーは、ヌクレオチド、3炭素スパーサー、及びヘキサエチレングリコールから独立して選択される。

10

【0078】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-PAGPC-3'(配列番号：132)を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-GPACGPP-3'(配列番号：133)を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列5'-GPAYRPP-3'(配列番号：157)を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンであり、Yは、C、U、またはTであり、及びRはGまたはAである。

20

【0079】

いくつかの実施形態では、C3タンパク質に結合するアプタマーが提供され、そのアプタマーは、配列番号：125の配列を含む。式中、各Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。いくつかの実施形態では、各PはNapdUである。

【0080】

本明細書に記載のアプタマーのいくつかの実施形態では、各C-5修飾ピリミジンは、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PEdU)、5-(N-チオフェニルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(iBudU)、5-(N-チロシルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(TyrdU)、5-(N-3,4-メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(MBndU)、5-(N-4-フルオロベンジルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(FBndU)、5-(N-3-フェニルプロピルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(PPdU)、5-(N-イミジゾリルエチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ImdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(Trp dU)、5-(N-R-トレオニルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(ThrdU)、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(3-トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジンクロリド、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン(Nap dU)、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-O-メチルウリジン、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-フルオロウリジン、5-(N-[1-(2,3-ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド)-2'-デオキシウリジン)、5-(N-2-ナフチルメチルカ

30

40

50

ルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2' - フルオロウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2' - デオキシウリジン (N a p d U) である。

【0081】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、少なくとも1つの2' - O - メチル修飾ヌクレオチドを含み得る。

【0082】

本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、約24～約100ヌクレオチドの長さ、または約30～約60ヌクレオチドの長さ、または約28～約60ヌクレオチドの長さ、または約40～約50ヌクレオチドの長さ、または約28ヌクレオチドの長さでも良い。本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても、アプタマーは、24～100ヌクレオチドの長さ、または30～60ヌクレオチドの長さ、または長さ28～60ヌクレオチドの長さ、または28～50ヌクレオチドの長さ、または28～40ヌクレオチドの長さ、または40～50ヌクレオチドの長さ、または28～32ヌクレオチドの長さでも良い。

【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーは、C3タンパク質に結合し、

C3タンパク質の切断を阻害する。いくつかの実施形態では、C3のタンパク質は、ヒトC3タンパク質である。

【0084】

いくつかの実施形態では、C3アプタマーは、約100ヌクレオチドまで、約95ヌクレオチドまで、約90ヌクレオチドまで、約85ヌクレオチドまで、約80ヌクレオチドまで、約75ヌクレオチドまで、約70ヌクレオチドまで、約65ヌクレオチドまで、約60ヌクレオチドまで、約55ヌクレオチドまで、約50ヌクレオチドまで、約45ヌクレオチドまで、約40ヌクレオチドまで、約35ヌクレオチドまで、約30ヌクレオチドまで、最高約25ヌクレオチド、または約20ヌクレオチドまでを含み得る。いくつかの実施形態では、C3アプタマーは、100ヌクレオチドまで、95ヌクレオチドまで、90ヌクレオチドまで、85ヌクレオチドまで、80ヌクレオチドまで、75ヌクレオチドまで、70ヌクレオチドまで、65ヌクレオチドまで、60ヌクレオチドまで、55ヌクレオチドまで、50ヌクレオチドまで、45ヌクレオチドまで、40ヌクレオチドまで、35ヌクレオチドまで、30ヌクレオチドまで、25ヌクレオチドまで、または20ヌクレオチドまでからなり得る。

【0085】

本開示の別の態様では、C3アプタマーは、配列番号：4～151のいずれかと、少なくとも99%同一、少なくとも95%同一、または少なくとも90%同一、少なくとも85%同一、少なくとも80%同一、少なくとも75%同一であっても良い。本開示の別の態様では、C3アプタマーは、配列番号：4～28、32～34、37～75、78～118、121～130、及び139～151のいずれかと、少なくとも95%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも85%同一、少なくとも80%同一、少なくとも75%同一であっても良い。いくつかの実施形態では、C3に結合するアプタマーは、配列番号：4～28、32～34、37～75、78～118、121～130、及び139～151から選択される配列と95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。関連する態様では、その断片は、25～49ヌクレオチドの長さである(すなわち、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48または49のヌクレオチドの長さから26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48または49ヌクレオチドの長さまで)。いくつかの実施形態では、C3に結合するアプタマーは、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48または49ヌクレオチドの長さである。

【0086】

本開示の別の態様では、C3アプタマーは、約10nM以下のC3の解離定数(K_d)を有しても良い。別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約15nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約20nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約25nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約30nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約35nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約40nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約45nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約50nM以下のC3の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、約2pM～約10nMの範囲(すなわち、2pM、3pM、4pM、5pM、6pM、7pM、8pM、9pM、10pM、15pM、20pM、25pM、30pM、35pM、40pM、45pM、50pM、60pM、70pM、80pM、90pM、100pM、150pM、200pM、250p

M、300 pM、350 pM、400 pM、450 pM、500 pM、550 pM、600 pM、650 pM、700 pM、750 pM、800 pM、850 pM、900 pM、950 pM、1000 pM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、または10 nM)のC3タンパク質の解離定数(K_d)を有する。さらに別の例示的な実施形態では、C3アプタマーは、少なくとも2 pMの範囲(すなわち、少なくとも2 pM、3 pM、4 pM、5 pM、6 pM、7 pM、8 pM、9 pM、10 pM、15 pM、20 pM、25 pM、30 pM、35 pM、40 pM、45 pM、50 pM、60 pM、70 pM、80 pM、90 pM、100 pM、150 pM、200 pM、250 pM、300 pM、350 pM、400 pM、450 pM、500 pM、550 pM、600 pM、650 pM、700 pM、750 pM、800 pM、850 pM、900 pM、950 pM、1000 pM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、または10 nM)のC3タンパク質の解離定数(K_d)を有する。実施例2に記載したように、適切な解離定数は、多点での力価測定を使用して結合アッセイを行い、式： $y = (\text{最大} - \text{最小}) (\text{タンパク質}) / (K_d + \text{タンパク質}) + \text{最小}$ にフィッティングすることで決定することができる。解離定数の決定は、それらが測定される条件に大きく依存し、したがって、これらの数値は、平衡時間などの要因に関連して著しく変化しても良いことが理解されるべきである。本明細書に記載の実施形態のいずれかでは、アプタマー、核酸分子は、DNA、RNAまたはそれらの組み合わせのヌクレオチドを含む。

【0087】

SELECT

SELECTには通常、核酸の候補混合物を調製すること、候補混合物を所望の標的分子に結合させて親和性複合体を形成させること、親和性複合体を結合しなかった候補核酸から分離すること、親和性複合体から核酸を分離・単離すること、核酸を精製すること、及び特定のアプタマー配列を同定すること、が含まれる。プロセスは、選択されたアプタマーの親和性をさらに向上するために複数のラウンドを含んでも良い。プロセスは、プロセス内の1つまたは複数のポイントで増幅ステップを含むことができる。たとえば、「核酸リガンド」という名称の、米国特許第5,475,096号を参照のこと。SELECTプロセスは、標的と共有結合するアプタマー、ならびに標的と非共有結合するアプタマーを生成するために使用することができる。たとえば、「指数濃縮によるリガンドの体系的進化：ケミセレックス」という名称の、米国特許第5,705,337号を参照のこと。

【0088】

SELECTプロセスは、アプタマーの改善された特性、たとえば、改善されたインビボでの安定性または改善された送達特性などの特性を付与する修飾ヌクレオチドを含む、高親和性アプタマーを同定するために使用することができる。このような修飾の例には、リボース及び/またはリン酸及び/または塩基の位置における化学的置換が含まれる。SELECTプロセスによって同定された、修飾ヌクレオチドを含むアプタマーについては「修飾されたヌクレオチドを含む高親和性核酸リガンド」という名称の米国特許第5,660,985号に記載されており、ここでは、ピリミジンの5'位及び2'位を化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドが説明されている。米国特許第5,580,737号(上記参照)では、2'-アミノ(2'-NH₂)、2'-フルオロ(2)-2'-デ- F)、及び/または2'-O-メチル(2'-OMe)で修飾したヌクレオチドを1つまたは複数含む、高度に特異的なアプタマーが説明されている。「SELECT及びPHOTOSELECT」という名称の米国特許公開公報第20090098549号も参照のこと。ここでは、多様な物理的及び化学的特性を有する核酸ライブラリー及びそれらのSELECT及びphotoSELECTの使用が記載されている。

【0089】

SELECTは、所望のオフ速度特性を有するアプタマーを同定することに使用することもできる。標的分子に結合することができるアプタマーを生成するための改善されたSELECT法を記載した、「向上したオフ速度を有するアプタマーを生成するための方法」という名称の米国特許出願公開第20090004667号を参照のこと。前述したように

、これらのオフ速度のアプタマーは、「SOMAmers」として知られている。それぞれの標的分子からの解離のより遅い速度を有するアプタマーまたはSOMAmers及び光アプタマーまたはSOMAmersを製造するための方法が記載されている。この方法は、候補混合物と標的分子を接触させて、核酸-標的複合体の形成を可能にすること、及び遅いオフ速度の濃縮プロセスを実施することを含み、この遅いオフ速度の濃縮プロセスでは、速い解離速度を有する核酸-標的複合体は解離し、かつ、再形成されないが、遅い解離速度を有する複合体は完全な状態で維持される。さらに、この方法は、改善されたオフ速度性能を有するアプタマーまたはSOMAmersを生成するための候補核酸混合物の製造における修飾ヌクレオチドの使用を含む。

【0090】

このアッセイの変形は、それらの標的分子に対して共有結合または「光架橋」するアプタマーを有効にする光反応性官能基を含むアプタマーを使用する。たとえば、「診断用核酸リガンド バイオチップ」という名称の米国特許第6,544,776号を参照のこと。これらの光反応性アプタマーは、光アプタマーとも呼ばれる。たとえば、「Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands及びSolution SELEX」と名称の米国特許第5,763,177号、米国特許第6,001,577、及び米国特許第6,291,184号のそれぞれを参照のこと。また、たとえば、「Photoselection of Nucleic Acid Ligands」という名称の米国特許第6,458,539号も参照のこと。マイクロアレイを試料と接触させ、光アプタマーがその標的分子と結合する機会を得た後、光アプタマーを光活性化し、固体支持体を洗浄して、いかなる非特異的結合分子も除去する。光アプタマーに結合した標的分子は、光アプタマー上の光活性化された官能基数によって生成される共有結合のために、一般的に、除去されないため、激しい洗浄条件を使用しても良い。

【0091】

これらのアッセイ形式のどちらでも、試料と接触させる前に、アプタマーまたはSOMAmerを固体支持体上に固定する。しかし、特定の状況下では、試料と接触させる前のアプタマーまたはSOMAmerの固定は、最適なアッセイを提供しない可能性もある。たとえば、アプタマーまたはSOMAmerを予め固定した結果、固体支持体表面上で、ターゲット分子とアプタマーまたはSOMAmerが不十分にしか混合されず、これがおそらく長い反応時間につながり、したがって、標的分子に対するアプタマーまたはSOMAmerの効率的な結合を可能にするためには、長時間のインキュベーション期間を要することになり得る。さらに、光アプタマーまたは光SOMAmerがアッセイに使用され、固体支持体として利用する物質に依存しているとき、固体支持体は、光アプタマーまたは光SOMAmerとその標的分子間に共有結合を形成するため使用される光を散乱または吸収する傾向があり得る。さらに、固体支持体の表面もまた、使用される任意の標識化剤に曝露されて影響を受け得るので、使用方法によって、それらのアプタマーまたは光SOMAmersに結合した標的分子の検出は不正確になる可能性がある。最後に、固体支持体上のアプタマーまたはSOMAmerの固定は、一般的に、アプタマーまたはSOMAmerを試料に曝露する前に、アプタマーまたはSOMAmerを調製する工程（たとえば、固定）を含み、この調製工程はアプタマーまたはSOMAmerの活性または機能に影響を与え得る。

【0092】

SOMAmerが溶液中の標的を捕捉することを可能にし、次いで、検出に先立ってSOMAmer-標的混合物の特定の成分を除去するように設計される工程を使用するSOMAmerアッセイもまた記載されている（「試験試料の多重分析」という名称の米国特許出願公開第20090042206号を参照のこと）。記載されるSOMAmerアッセイ法は、核酸（すなわち、SOMAmer）を検出及び定量化することによって、試験試料の非核酸標的（たとえば、タンパク質標的）の検出及び定量化を可能にする。記載さ

10

20

30

40

50

れる方法は、非核酸標的を検出及び定量化するための核酸代用物（すなわち、S O M A m e r）を作製する。そのため、増幅を含む、多種多様な核酸技術を、タンパク質標的を含む、所望の標的のより広い範囲に適用することが可能になる。

【0093】

標的がペプチドであるS E L E Xプロセスの実施形態は、「M o d i f i e d S E L E X P r o c e s s e s W i t h o u t P u r i f i e d P r o t e i n」という名称の米国特許第6,376,190号に記載されている。本件では、標的は、C3-タンパク質である。

【0094】

補体成分3（C3）タンパク質

10

S E L E Xプロセスで使用する天然ヒト循環C3-タンパク質は、血液から精製し、Q u i d e l（登録商標）社、サンディエゴ、カリフォルニア州（カタログ番号A401）から入手した。C o m p l e m e n t T e c h n o l o g y社、タイラー、テキサス州（カタログ番号A113）から得られた循環ヒトC3-タンパク質と同様にQ u i d e lからの循環天然C3-タンパク質は結合及び活性の研究のために使用される。

【0095】

アプタマーの化学修飾

アプタマーは、その性質及び特性を改善する修飾ヌクレオチドを含んでいても良い。そのような改善の非限定的な例には、インビボ安定性、分解に対する安定性、その標的に対する結合親和性、及び/または改善された送達特性が含まれる。

20

【0096】

このような修飾の例には、リボース及び/またはリン酸及び/またはヌクレオチドの塩基の位置における化学的置換が含まれる。S E L E Xプロセスによって同定された、修飾ヌクレオチドを含むアプタマーについては「修飾されたヌクレオチドを含む高親和性核酸リガンド」という名称の米国特許第5,660,985号に記載されており、ここでは、ピリミジンの5'位及び2'位を化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドが説明されている。米国特許第5,580,737号（上記参照）では、2'-アミノ（2'-N H₂）、2'-フルオロ（2'-F）、及び/または2'-O-メチル（2'-O M e）で修飾したヌクレオチドを1つまたは複数含む、高度に特異的なアプタマーが説明されている。「S E L E X及びP H O T O S E L E X」という名称の米国特許公開公報第20090098549号も参照のこと。ここでは、多様な物理的及び化学的特性を有する核酸ライブラリー及びそれらのS E L E X及びp h o t o S E L E Xの使用が記載されている。

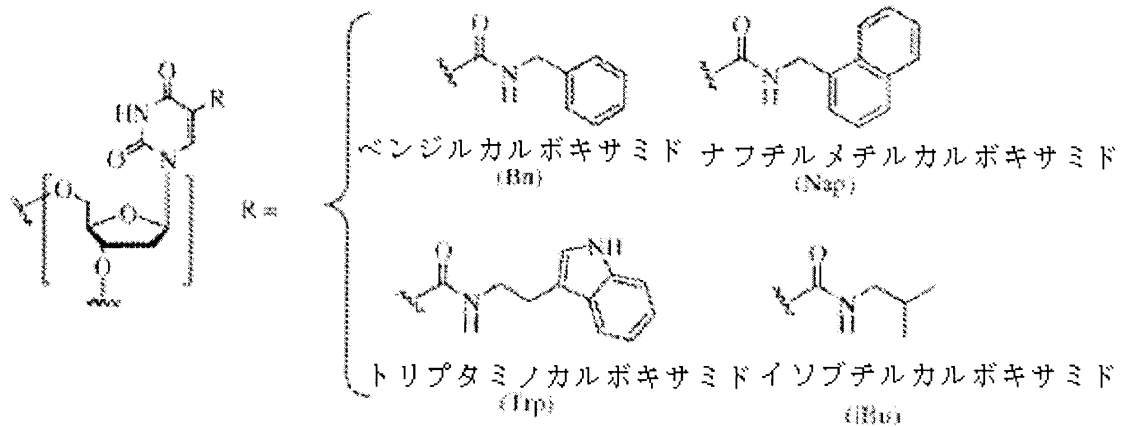
30

【0097】

C-5修飾の特定の例には、C-5位に下記から独立して選択された置換基を有するデオキシウリジンの置換が含まれる。下記に示すように、ベンジルカルボキサミド（あるいは、ベンジルアミノカルボニル）（B n）、ナフチルメチルカルボキサミド（あるいは、ナフチルメチルアミノカルボニル）（N a p）、トリプタミノカルボキサミド（あるいは、トリプタミノカルボニル）（T r p）、及びイソブチルカルボキサミド（あるいは、イソブチルアミノカルボニル）（i B u）である。

40

【化 1】



10

【 0 0 9 8 】

C - 5 修飾ピリミジンの化学修飾は、単独または任意の組み合わせ、2) - 2 ' - デ - 位の糖修飾、環外アミンでの修飾、及び4 - チオウリジンの置換などと組み合わせることもできる。

【 0 0 9 9 】

代表的な C - 5 修飾ピリミジンには、下記のものが含まれる。5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジン (B n d U)、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - ベンジルカルボキサミド) - 2) - 2 ' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジン (i B u d U)、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - イソブチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジン (T r p d U)、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - トリプトアミノカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - [1 - (3 - トリメチルアンモニウム) プロピル] カルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジンクロリド、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - フルオロウリジンまたは 5 - (N - [1 - (2、3 - ジヒドロキシプロピル)] カルボキシアミド) - 2) - 2 ' - デ - デオキシウリジン)。

20

30

【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態では、各X、Y、及びZまたはZは、 $5 - (\text{N} - \text{ベンジルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (BndU)、 $5 - (\text{N} - \text{ベンジルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - O - メチルウリジン、 $5 - (\text{N} - \text{ベンジルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - フルオロウリジン、 $5 - (\text{N} - \text{フェネチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (PedU)、 $5 - (\text{N} - \text{チオフエニルメチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (ThdU)、 $5 - (\text{N} - \text{イソブチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン ($i\text{BudU}$)、 $5 - (\text{N} - \text{イソブチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - O - メチルウリジン、 $5 - (\text{N} - \text{イソブチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - フルオロウリジン、 $5 - (\text{N} - \text{トリプトアミノカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (TrpdU)、 $5 - (\text{N} - \text{トリプトアミノカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - O - メチルウリジン、 $5 - (\text{N} - \text{トリプトアミノカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - フルオロウリジン、 $5 - (\text{N} - [1 - (3 - \text{トリメチランモニウム})\text{プロピル}] \text{カルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジנקロリド、 $5 - (\text{N} - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (NapdU)、 $5 - (\text{N} - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (NapdU)、 $5 - (\text{N} - \text{ナフチルメチルカルボキシアミド}) - 2) - 2'$ - デ - デオキシウリジン (NapdU)、

40

50

ド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、及び5 - (N - [1 - (2, 3 - ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジンから独立して選択される。いくつかの実施形態では、各Zは、5 - (N - ベンジルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (BndU) である。

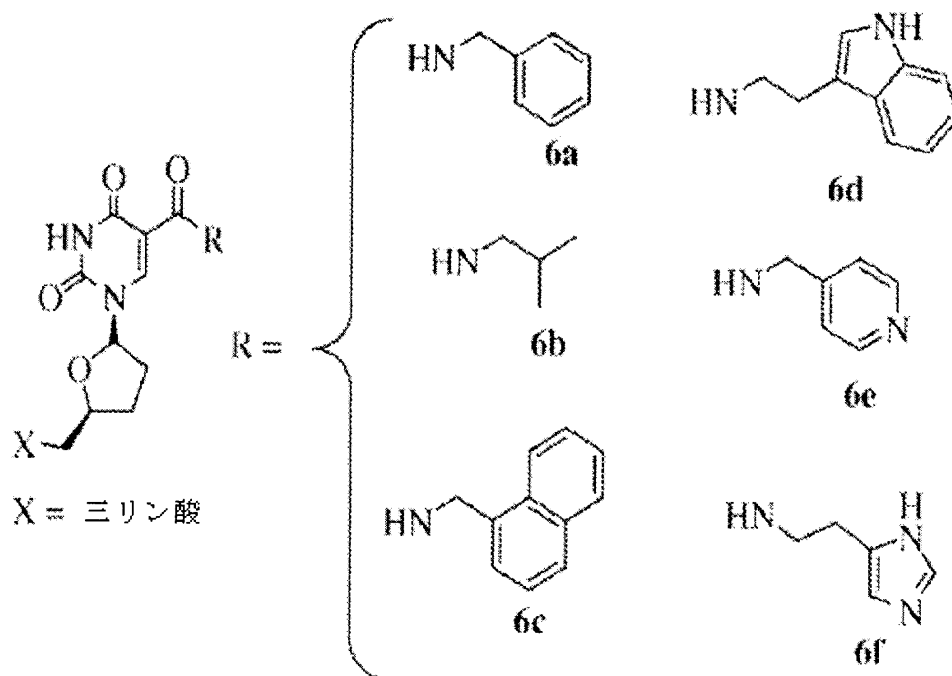
【0101】

存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリヌクレオチドの組み立て前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分によって中断される可能性がある。ポリヌクレオチドは、標識成分との結合などによって、重合後にさらに修飾することができる。

【0102】

さらに、C - 5 修飾ピリミジンヌクレオチドには、次のものが含まれる。

【化2】



【0103】

いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ耐性を付与する。C - 5 位の置換を持つピリミジンは、修飾ヌクレオチドの例である。修飾は、骨格修飾、メチル化、ならびにイソ塩基類、イソシチジン及びイソグアニジンなどの異常塩基対合の組み合わせを含むことができる。修飾には、キャッピングなどの3) - 2' - デ及び5) - 2' - デ修飾も含めることができる。他の修飾には、天然に存在するヌクレオチドを1つまたは複数の類似体で置換したもの、ヌクレオチド間修飾で置換したものなど、たとえば、非荷電連結（たとえば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート、など）及び荷電連結（たとえば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、など）、インターカレーター（たとえば、アクリジン、ソラレン、など）、キレート剤（たとえば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属、など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、及び修飾連結（たとえば、アルファ - アノマー核酸、など）を含むことができる。さらに、ヌクレオチドの糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれも、ホスホン酸基またはリン酸基で置換されていても、標準的な保護基で保護されていても、または追加のヌクレオチドまたは固体支持体に追加の結合を調製するように活性化されていても良い。5) - 2' - デ及び3) - 2' - デ末端のOH基は、リン酸化することも、またはアミン類、約1 ~ 約20個の炭素原子の有機キャッピング基部分、一実施形態では、約10 ~ 約80 kDaの範囲のポリエチレングリコール (PEG

）ポリマー、別の実施形態では、約20～約60kDaの範囲のPEGポリマー、またはその他の親水性または疎水性の生体ポリマーまたは合成ポリマーで置換することができる。一実施形態では、修飾は、ピリミジンのC-5位である。これらの修飾は、直接C-5位で、または結合のその他の種類によって、アミド結合を介して製造することができる。

【0104】

ポリヌクレオチドは、2)-2'-デ-O-メチル-、2)-2'-デ-O-アリル、2)-2'-デ-フルオロ-または2)-2'-デ-アジド-リボース、炭素環糖の類似体、a-アノマー糖、アラビノース、キシロースまたはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリル酸類似体及びメチルリボシドなどの脱塩基ヌクレオシド類似体を含む、当該分野において一般的に知られているリボース糖またはデオキシリボース糖の類似形態も含むことができる。上述のように、1つまたは複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えても良い。これらの代替の連結基は、リン酸塩がP(0)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(0)NR₂(「アミデート」)、P(0)R、P(0)OR)-2'-デ、COまたはCH₂(「ホルムアセタール」)で置換されており、各RまたはR)-2'-デは、独立して、Hまたは、必要に応じてエーテル(-O-)結合、アリル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルジルを含む、置換もしくは非置換アルキル(1-20C)である実施形態を含む。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。類似形態の糖、プリン、及びピリミジンの置換は、たとえば、ポリアミド骨格のような別の骨格構造をとることができるため、最終産物の設計の点で有利になる場合がある。

【0105】

本発明は、配列番号：4～130及び138～151からなる群から選択される2つ以上の核酸配列を含む製剤をさらに提供する。式中、Pは、各出現において、それぞれ独立して、C-5修飾ピリミジンである。

【0106】

別の様態では、各C-5修飾ピリミジンは、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(BndU)、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-O-メチルウリジン、5-(N-ベンジルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-フルオロウリジン、5-(N-フェネチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(PedU)、5-(N-チオフエニルメチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(ThdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(iBudU)、5-(N-チロシルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(TyrdU)、5-(N-3、4-メチレンジオキシベンジルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(MBndU)、5-(N-4-フルオロベンジルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(FBndU)、5-(N-3-フェニルプロピルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(PPdU)、5-(N-イミジゾリルエチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(ImdU)、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-O-メチルウリジン、5-(N-イソブチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-フルオロウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(TrpdU)、5-(N-R-トレオニルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(ThrdU)、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2)-2'-デ-O-メチルウリジン、5-(N-トリプトアミノカルボキシアミド)-2)-2'-デ-フルオロウリジン、5-(N-[1-(3-トリメチルアンモニウム)プロピル]カルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジクロリド、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン(NapdU)、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-O-メチルウリジン、5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2)-2'-デ-フルオロウリジン、5-(N-[1-(2、3-ジヒドロキシプロピル)]カルボキシアミド)-2)-2'-デ-デオキシウリジン)、5-(N

- 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジンから独立して選択される。

10

【 0 1 0 7 】

別の様態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (N a p d U)、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (2 N a p d U)、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (N E d U)、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 1 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (2 N E d U)、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 2 - ナフチルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (B F d U)、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾフラニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジン、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (B T d U)、5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - O - メチルウリジン、及び 5 - (N - 3 - ベンゾチオフエニルエチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - フルオロウリジンから独立して選択される。

20

30

40

【 0 1 0 8 】

別の様態では、各 C - 5 修飾ピリミジンは、5 - (N - ナフチルメチルカルボキシアミド) - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (N a p d U) である。

【 0 1 0 9 】

別の様態では、製剤の 2 つ以上の核酸分子は、2) - 2' - デ - O - メチル修飾ヌクレオチド、C 3 スペース及びそれらの組み合わせからなる群から選択される少なくとも 1 つの追加の修飾をさらに含む。

【 0 1 1 0 】

別の様態では、製剤の 2 つ以上の核酸分子は、H E G リンカーまたは P E G リンカーで

50

置換される少なくとも1つのヌクレオチド位置をさらに含み、及び/またはH E G リンカーまたはP E G リンカーをさらに含む。

【0111】

別の態様では、製剤の2つ以上の核酸分子は、それぞれ独立して、約24～約100ヌクレオチドの長さ、または約30～約60ヌクレオチドの長さ、または約40～約50ヌクレオチドの長さであり、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50個の追加のヌクレオチドをさらに含む。

10

【0112】

別の様態では、補体成分3 (C3) タンパク質は、ヒト補体成分3 (C3) タンパク質である。

【0113】

アプタマーを含む医薬組成物

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の少なくとも1つのアプタマー及び少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が提供される。好適な担体は、Lippincott Williams & Wilkinsから出版されている「Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第21版」に記載されており、この文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の少なくとも1つのアプタマー及び少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物は、C3の阻害剤ではない1つまたは複数の活性物質を含んでも良い。

20

【0114】

本明細書に記載のアプタマーを、薬学的に許容可能な剤形のいずれにおいて使用しても良く、そのような剤形には、注入可能な剤形、分散液、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、凍結乾燥製剤、乾燥粉末、錠剤、カプセル、制御放出性製剤、易溶性製剤、遅延放出性製剤、持続放出性製剤、律動的放出性製剤、即時放出性製剤及び制御放出性製剤の組み合わせ、などが含まれるがこれらには限定されない。具体的には、本明細書に記載のアプタマーは、(a) 硝子体内、経口、経肺、静脈内、動脈内、鞘内、関節内、直腸内、眼内、結腸内、非経口、槽内、腔内、腹腔内、局部、頬内、経鼻、及び局所投与のいずれかから選択される投与用；(b) 分散液、ゲル、エアロゾル、軟膏、クリーム、錠剤、サシェ及びカプセルのいずれかから選択される剤形；(c) 凍結乾燥製剤、乾燥粉末、易溶性製剤、制御放出性製剤、遅延放出性製剤、持続放出性製剤、律動的放出性製剤、及び即時放出性製剤と制御放出性製剤の組み合わせのいずれかから選択される剤形；または(d) それらの任意の組み合わせ、として製剤化することができる。

30

【0115】

非経口、皮内、または皮下に使用するための溶液または懸濁液は、以下の成分を1つまたは複数を含むことができる。(1) 注射用の水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの無菌的な希釈剤(2) ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤(3) アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤(4) エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤(5) 酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤、及び(5) 塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧調節剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩で調整することができる。非経口用製剤は、アンプル、使い捨ての注射器または複数回投与用のガラス製もしくはプラスチック製のバイアルに封入することができる。

40

【0116】

注射用途に適した医薬組成物は、無菌水溶液(水溶性の場合)または分散液、及び無菌注射溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末を含んでも良い。静脈内投与に好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (BASF、パーシッパニー、ニュージャージー)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が挙げられる。すべての例

50

において、組成物は無菌、かつ、容易に注入できる程度の流体であるべきである。医薬組成物は、製造及び保存の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されるべきである。

【0117】

本明細書で使用する場合、「安定な」という用語は、対象への投与に適している状態または状況に維持されていることを意味する。

【0118】

担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含む、溶媒または分散媒体でも良い。適切な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合では、必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に、等張剤、たとえば、糖、マンニトールまたはソルビトールなどのポリアルコール、及び塩化ナトリウムなどの無機塩を含むことが好ましい。注射用組成物の持続的な吸収は、組成物中に吸収を遅らせる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたすことができる。

【0119】

滅菌注射用溶液は、活性薬剤（たとえば、アブタマー）を、所望の通り、上記に挙げた成分のうちの1つまたは成分の組み合わせと共に、適切な溶媒の適切な量に組み入れ、その後、濾過滅菌することで調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒及び任意の他の所望の成分を含む滅菌ビヒクル中に少なくとも1つのアブタマーを組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の例示的な方法は、真空乾燥及び凍結乾燥が含まれ、その両方とも、予め濾過滅菌したその溶液からアブタマーの粉末及び任意の追加の所望の成分を生じる。

【0120】

いくつかの実施形態では、アブタマーは、硝子体内注射用に製剤化される。硝子体内注射用の好適な製剤は、たとえば、Lippincott Williams & Wilkinsから出版されている「Remington: The Science 及び Practice of Pharmacy第21版」に記載されている。眼への薬剤送達については、たとえば、Rawas-Qalajiら(2012) Curr. Eye Res. 37:345; Bochotら(2012) J. Control Release 161:628; Yasukawaraら(2011) Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 5:1; 及びDoshiら(2011) Semin. Ophthalmol. 26:104で議論されている。いくつかの実施形態では、アブタマーを含む医薬組成物は、硝子体内注射により、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、6週間に1回、7週間に1回、8週間に1回、9週間に1回、10週間に1回、11週間に1回、12週間に1回、または12週間に1回より少ない頻度で投与される。

【0121】

経口組成物は一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。それらは、たとえば、ゼラチンカプセルの中に封入するか、または錠剤として打錠することができる。経口治療投与の目的のために、アブタマーは、賦形剤と配合され、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で 사용할ことができる。経口組成物は、洗口剤として流体担体を使用して調製することができ、液体担体中の化合物は、口に入れられ、音をたててすすぐようにして使用され、その後、吐き出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合する結合剤及び/または補助的な物質を組成物の一部として含めることができる。

【0122】

吸入による投与の場合、化合物は、適切な噴射剤、たとえば、二酸化炭素などのガス、

10

20

30

40

50

霧状の液体、または適切なデバイスからの乾燥粉末を含む加圧容器またはディスペンサーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。経粘膜または経皮投与の場合、浸透する障壁に適した浸透剤が製剤中に使用される。このような浸透剤は、一般に当技術分野で周知であり、たとえば、経粘膜投与用には、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成することができる。経皮投与の場合、一般に当技術分野で知られているように、活性剤は、軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。試薬は、直腸送達のために、坐剤（たとえば、ココアバター及び他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤と共に）または保持浣腸の形態で調製することができる。

【 0 1 2 3 】

10

いくつかの実施形態では、アプタマーは、身体からの急速な排泄から保護する担体を使用して調製される。たとえば、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤を使用することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性で、生体適合性のポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製方法は当業者には明らかであろう。材料は、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals、Incから商業的に入手することもできる。

【 0 1 2 4 】

リボソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いた、感染細胞を標的にするリボソームを含む）もまた、薬学的に許容可能な担体として使用することができる。これらは、米国特許第4,522,811号に記載されているように、たとえば、当業者に知られている方法に従って調製することができる。

20

【 0 1 2 5 】

さらに、アプタマーの懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製しても良い。適切な親油性溶媒または媒体は、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリド、またはリボソームなどの合成脂肪酸エステルを含む。非脂質ポリカチオン性アミノポリマーを送達のために使用しても良い。任意で、懸濁液は、化合物の溶解度を高め、高濃度溶液の調製を可能にする適切な安定剤または薬剤を含んでも良い。

【 0 1 2 6 】

場合によっては、投与を容易にし、かつ投薬量を均一化するために、用量単位形態で経口または非経口組成物を調製することは特に有効であり得る。本明細書で使用する場合、用量単位形態とは、治療する対象に対する単位用量として適した物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる医薬担体と関連して所望の治療効果を生じるように計算された、所定量のアプタマーを含む。本明細書に記載のアプタマーの容量単位形態の仕様は、特定のアプタマーの特徴及び達成される特定の治療効果ならびに患者の治療の目的で、そのような活性薬剤を配合する分野に固有の制限によって規定され、それらに直接依存する。

30

【 0 1 2 7 】

少なくとも1つのアプタマーを含む医薬組成物は、1つまたは複数の医薬賦形剤を含むことができる。このような賦形剤の例には、これらに限定されないが、結合剤、充填剤、潤滑剤、懸濁化剤、甘味剤、香味剤、防腐剤、緩衝剤、湿潤剤、崩壊剤、発泡剤、及びその他の賦形剤が含まれる。このような賦形剤は当技術分野において周知である。典型的な賦形剤には、以下のものが含まれる。（1）様々なセルロース及び架橋ポリビニルピロリドン、Avicel PH101及びAvicel PH102などの微結晶セルロース、ケイ化微結晶セルロース（ProSolv SMC（商標））、トラガカントゴム及びゼラチンを含む結合剤（2）様々なデンプン、乳糖、乳糖一水和物、無水乳糖などの充填剤（3）アルギン酸、プリモゲル、コーンスターチ、軽度架橋されたポリビニルピロリドン、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、及び加工デンプン、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、デンプングリコール酸ナトリウム、及びこれらの混合物などの崩壊剤（4）打錠する粉末の流動性に作用する薬剤、ステアリン酸マグネシウ

40

50

ム、Aer os i l 2 0 0 などのコロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、及びシリカゲルを含む、滑沢剤（５）コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤（６）ソルビン酸カリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸及びその塩、ブチルパラベンなどのパラヒドロキシ安息香酸の他のエステル、エチルまたはベンジルアルコールなどのアルコール、フェノールなどのフェノール化合物、または塩化ベンザルコニウムなどの第四級化合物、などの防腐剤（７）微結晶セルロース、乳糖、二塩基性リン酸カルシウム、糖類、及び／または前述のいずれかの混合物などの薬学的に許容可能な不活性充填剤などの希釈剤。希釈剤の例には、A v i c e l P H 1 0 1 及び A v i c e l P H I 0 2 などの微結晶セルロース、乳糖－水和物、無水乳糖、及び P h a r m a t o s e D C L 2 1、E m c o m p r e s s などの二塩基性リン酸カルシウム、マンニトール、デンプン、ソルビトール、スクロース、及びグルコースが含まれる（８）ショ糖、サッカリンショ糖、キシリトール、サッカリンナトリウム、シクラメート、アスパルテム、及びアセスルファムなどの任意の天然または人工甘味料を含む甘味料（９）ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料、M a g n a s w e e t (M A F C O の商標)、バブルガムフレーバー、フルーツフレーバーなどの香味剤、及び（１０）有機酸及び炭酸塩または重炭酸塩などの発泡性カップルを含む発泡剤。適切な有機酸には、たとえば、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、フマル酸、アジピン酸、コハク酸、及びアルギン酸ならびに無水物及び酸性塩が含まれる。適切な炭酸塩及び重炭酸塩には、たとえば、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、炭酸マグネシウム、ナトリウムグリシン炭酸塩、L - リジン炭酸塩及びアルギニン炭酸塩が含まれる。あるいは、発泡性カップルの重炭酸ナトリウム成分のみが存在しても良い。

10

20

【 0 1 2 8 】

様々な実施形態では、本明細書に記載の製剤は、実質的に純粋である。本明細書で使用する場合、「実質的に純粋」とは、活性成分（たとえば、アプタマー）が存在する主な種であること（すなわち、モル基準で、組成物中の他の個々の種よりも豊富であること）を意味している。いくつかの実施形態では、実質的に精製された画分が組成物であり、その活性成分が存在するすべての高分子種の（モル基準で）少なくとも約 5 0 % を含む。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約 8 0 % 超を含む。様々な実施形態では、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % を含む。様々な実施形態では、活性成分は、均一になる（汚染物質種が従来の検出方法によって組成物中に検出できない）まで精製され、その組成物は本質的に単一の高分子種からなる。

30

【 0 1 2 9 】

アプタマーを含むキット

本開示は、本明細書に記載のアプタマーのいずれかを含むキットを提供する。このようなキットは、たとえば、（１）少なくとも一つのアプタマー、及び（２）溶媒または溶液などの、少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な担体を含むことができる。追加のキット成分は、必要に応じて、たとえば、（１）安定剤、緩衝剤などの、本明細書中で同定された薬学的に許容可能な賦形剤のいずれか（２）キット部品を保持及び／または混合するための容器、バイアルまたは同様の装置の少なくとも 1 つ、及び（３）送達装置、を含むことができる。

40

【 0 1 3 0 】

治療の方法

本開示は、本明細書に記載のアプタマーの使用を介して、病状を予防または治療（たとえば、１つまたは複数の症状を緩和）する方法を提供する。方法は、そのようなアプタマーの治療有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む。記載のアプタマーは、予防的治療のために使用することもできる。いくつかの実施形態では、アプタマーは、硝子体内に投与される。いくつかの実施形態では、アプタマーは、経口または静脈内に投与される。

50

【0131】

治療の方法で使用されるアプタマーは、本明細書に記載のアプタマー、その薬学的に許容可能な塩、そのプロドラッグ、またはそのプロドラッグの薬学的に許容可能な塩であり得る。

【0132】

個体または対象は、これらに限定されないが、ネコ、イヌ、ウマ、ブタ及びウシ、及び好ましくはヒトを含む、任意の動物（家庭用、家畜または野生）であり得る。本明細書で使用する場合、患者、個体、及び対象は互換的に使用することができる。

【0133】

本明細書で使用する場合、「治療する」とは、疾患、状態、または障害を治療する目的で患者の管理及びケアを説明するものであり、疾患、状態または障害の症状または合併症の発症を予防するために、疾患、状態、または障害の症状または合併症を軽減するために、または患者の疾患、状態または障害の存在を排除するためにアプタマーを投与することを含む。より具体的には、「治療」とは、疾患（障害）状態、疾患進行、疾患原因因子またはその他の異常な状態の少なくとも1つの有害な症状または影響を反転、減衰、軽減、最小化、抑制または停止することを含む。治療は、一般的に、症状及び/または病状が改善されるまでの間は継続される。

10

【0134】

本明細書で 사용되는場合、「予防する」とは、全体的にまたは部分的に予防することを意味し、改善することまたは制御すること、縮小させること、軽減させること、または減少させること、または遅延させることまたは停止させることを意味する。

20

【0135】

様々な実施形態では、開示される組成物及び方法が、加齢性黄斑変性症、自己免疫疾患、血液疾患、感染症、敗血症、炎症性疾患、または神経変性疾患を治療するために使用される。

【0136】

いくつかの実施形態では、開示された化合物またはその薬学的に許容可能な塩、またはプロドラッグは、上述の疾患状態を改善または根絶する他の治療と組み合わせて投与することができる。開示されたアプタマーを含む組成物は、たとえば、2つ以上のアプタマーを含んでも良い。いくつかの例では、1つまたは複数アプタマーを含む組成物は、疾患を治療するための別の有用な薬剤（たとえば、加齢性黄斑変性症、自己免疫疾患、血液疾患、感染症、敗血症炎症性疾患、または神経変性疾患を治療するための有用な薬剤）と併用して投与される。いくつかの実施形態では、このような併用で使用する周知の治療薬の現在利用可能な剤形が好適であろう。

30

【0137】

「併用療法」（または「共同治療」）は、これらの治療剤の相互作用による有益な効果を提供することを意図した特定の治療計画の一部として、アプタマー組成物と少なくとも1つの第2の薬剤の投与を含む。併用の有益な効果は、これらに限定されないが、治療薬の併用により生じる薬物動態学的または薬力学的な相互作用を含む。これらの治療薬の併用の投与は、典型的には、定義された期間（通常、選択した併用に応じて、数分、数時間、数日または数週間）にわたって行われる。

40

【0138】

「併用療法」は、一般的ではないが、偶然及び恣意的に本開示の併用を生じる別々の単独療法レジメンの一部として、これらの治療剤の2つ以上の投与を包含することを意図するものである。「併用療法」は、逐次的にこれらの治療剤の投与を包含することが意図される。すなわち、これらの治療剤、または少なくとも2つの治療薬を実質的に同時に投与するだけでなく、各治療剤を異なる時刻でも投与する。実質的に同時の投与は、たとえば、対象に、各治療薬の固定比率を有する単一用量を投与する、またはそれぞれの治療薬の複数の単一用量を投与することによって達成することができる。

【0139】

50

アプタマーを使用する投与計画は、たとえば、対象の型、種、年齢、体重、性別及び医学的状态、治療すべき症状の重症度、投与経路、対象の腎臓機能及び肝臓機能、及び使用される特定のアプタマーまたはその塩を含む様々な要因に従って選択される。通常の技能を有する医師または獣医は、状態の進行を阻止し、対処し、停止させるために必要な組成物の有効量を容易に決定及び処方することができる。

【0140】

一般に、投薬量、すなわち、治療有効量は、1日あたり、治療を受ける対象の体重1 kgに対して約1 µg ~ 約100 mgの範囲である。

【0141】

以下の実施例は、ある特定の特征及び/または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、記載された特定の特征または実施形態に本開示を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0142】

実施例1：C3 - タンパク質に対する結合特異性を有するアプタマーの選択及び同定

この実施例は、ヒトC3 - タンパク質に対するDNAアプタマーの選択及び製造のための代表的な方法を提供する。

【0143】

候補混合物の調製

部分的にランダム化されたssDNAオリゴヌクレオチドの候補混合物を、ビオチン化ssDNA鋳型にアニーリングしたDNAプライマーのポリメラーゼ伸長により調製した(以下の表1に示す)。候補混合物は、dATP、dGTP、dCTP及び5-(N-ナフチルメチルカルボキシアミド)-2'-デ-デオキシウリジン三リン酸(NapdUTP)を含有する40ヌクレオチドのランダム化カセットを含有した。

【表1】

【表1】 テンプレート及びプライマーの配列

オリゴヌクレオチド名称	配列 (5' → 3')	配列番号:
テンプレート1	AB'AB'TTT TTT TTGTG TCT GTC TGT GTC CTC-(N) ₄₀ -GGAGTGGTAGAGGACTGG	1
プライマー1	ATATATATCCAGTCCTCTACCACTCC	2
プライマー2	AB'AB'TT TTT TTT GTG TCT GTC TGT GTC CTC	3

B'は、ビオチン

【0144】

Streptavidin Plus UltraLink Resin (PIERC E)の50%スラリーの5ミリリットルを、SB18T0.05の2.5 mL (40 mMのHEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸)緩衝液は、NaOHでpH 7.5、102 mMのNaCl、5 mMのKCl、5 mMのMgCl₂及び0.05% TWEEN 20に調製した)で1回洗浄し、16 mMのNaClの2.5 mLで3回洗浄した。2つのビオチン残基(配列でB)-2'-デと示す)及び40のランダム化位置(配列でN₄₀として示す)を有するテンプレート1の20ナノモル(配列番号:1)は、洗浄されたULTRALINK SAPIーズに添加され、30分間37で回転させた。次いで、ビーズを16 mMのNaClで3回洗浄した。各洗浄の間に、ビーズを遠心分離により回収した。現在捕捉されたテンプレートを含み、ビーズは、プライマーの24ナノモル(配列番号:2)を含む伸長の反応緩衝液の1.25 mL、1X SQ20緩衝液(120 mMのTris-HCl、pH 7.8、10 mMのKCl、7 mMのMgSO₄、6 mMの(NH₄)₂SO₄、0.001%のBSA及び0.1%のTriton X-100)、KOD XL DNAポリメラーゼ(EMD MILLIP

ORE)の187.5ユニット、及びdATP、dCTP、dGTP及びNadUTPの各0.5mMに懸濁した。ビーズを2時間68℃でインキュベートした。次いで、ビーズを16mMのNaClで3回洗浄した。アプタマーライブラリーを、20mMのNaOH 1mLで、ビーズから溶出させた。溶出したライブラリーとすぐに15μLの1N HCl及び10μLのHEPES pHは7.5及び1μLの10%のTWEEN-20で中和した。ライブラリーは、アミコン ウルトラセル YM-10フィルターで約0.2mLに濃縮し、ライブラリーの濃度は、紫外線吸光分光法により決定する。

【0145】

固定化のための標的タンパク質の標識

標的タンパク質のAlexa488標識

10

正常血清(Quidel社、カタログ番号A401)から精製されたタグなしのヒトC3-タンパク質は、Alexa Fluor(登録商標)488(Molecular Probes社(商標))を第一級アミンに共有結合させることによって標識させた。C3-タンパク質(68μL中263ピコモル)は、Alexa Fluor(登録商標)488反応性染料の137倍モル過剰と混合し、反応を室温で2時間インキュベートした。未反応の標識は、Zeba(商標)スピン脱塩カラム(Pierce)を用いて除去し、緩衝液をSB18T0.05に交換した。

【0146】

ヒトC3-タンパク質のビオチン標識

20

正常血清Quidel社、カタログ番号A401)から精製されたタグなしのヒトC3-タンパク質は、第一級アミンを含む残基にNHS-PEO4ビオチン(PIERCE、EZ-LinkのNHS-PEG4-ビオチン)の共有結合によりビオチン化した。タンパク質(75μL中200ピコモル)は、NHS-PEG4-ビオチンの7倍モル過剰量と混合し、反応物を16時間4℃でインキュベートした。反応が完了した後、緩衝液を交換し、未反応のNHS-PEG4-ビオチンをYM3フィルター(MILLIPORE)を用いて限外濾過によって除去した。交換緩衝液はSB18T0.05であった。

【0147】

標的タンパク質の固定化

30

Alexa-Fluor(登録商標)488標識された標的タンパク質を、SELEXプロセスのラウンド4を介して第1ラウンドのためにプロテインG磁気ビーズ(Dynabeads(登録商標)、LIFE TECHNOLOGIES、または以下、プロテインGビーズと記載する)上に固定化した。抗体被覆ビーズを、1mLのSB18T0.05緩衝液のウサギIgG anti-Alexa fluor(登録商標)488(Invitrogen、Molecular Probes、A11094)70μgでビーズ10mgを混合することによって調製した。混合物を30分間、37℃でインキュベートした。未結合の抗体を除去し、ビーズをSB18T0.05の14mLで3回洗浄した。最後に、ビーズをSB18T0.05の1mL(10mg/mL)中で懸濁し、使用するまで4℃で保存した。

【0148】

ビオチン標識された標的タンパク質は、SELEXプロセスのラウンド9を介してラウンド5のためにMyOne-SA常磁性ビーズ(MyOne SA、Invitrogen、または以下、SAビーズと記載する)の上に固定化した。ビーズ(50mg)は、SB18T0.05の14mLで3回洗浄することにより調製した。最後に、ビーズをSB18T0.05の10mg/mL中で懸濁し、使用するまで4℃で保存した。

40

【0149】

遅いオフ速度の濃縮プロセスを有するアプタマーの選択

SELEXプロセスの9ラウンドの合計は、親和性と遅いオフ速度の選択で完了した。各ラウンドの前に、バックグラウンドを低減させ、タンパク質への非特異的結合を有するアプタマーを得る可能性を低減するために対抗選択を実行した。次のように対抗選択を実行した。

50

【0150】

ラウンド1の場合、SB18T0.05のDNAの約1ナノモルを含むDNA候補混合物の100 μ Lを5分間95 $^{\circ}$ Cで加熱し、次いで5分間70 $^{\circ}$ Cまで冷却し、次いで5分間48 $^{\circ}$ Cまで冷却し、次いで5分間37 $^{\circ}$ Cのブロックに移した。次いで、試料を、タンパク質の競合混合物(0.1% HSA、10 μ Mのカゼイン、及びSB18T0.05の10 μ Mのプロトロンビン)の10 μ L、及びプロテインGビーズの1mg(100 μ L)と組み合わせ、混合しながら10分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。ビーズを磁気分離によって除去した。

【0151】

ラウンド2～9の場合、前のラウンドから得られたDNAの候補混合物の65 μ Lアリコート(eDNAの65%は、前のラウンドから得た)を、5 \times SB18T0.05の16 μ Lと混合した。試料を3分間95 $^{\circ}$ Cまで加熱し、0.1 $^{\circ}$ C/秒の速度で37 $^{\circ}$ Cまで冷却した。次いで、試料を、タンパク質競合混合物(0.1% HSA、10 μ Mのカゼイン、及びSB18T0.05で10 μ Mプロトロンビン)の9 μ L、及びプロテインGビーズ(ラウンド5～9)、またはSAビーズ(ラウンド2～4)の0.1mg(10 μ L)と組み合わせ、混合しながら10分間37 $^{\circ}$ Cまでインキュベートした。ビーズを磁気分離によって除去した。

【0152】

第1の対抗選択に続き、標的タンパク質は、ラウンド1選択プロセスのプロテインGビーズに予め固定化される。これを達成するために、固定された抗Alexa Fluor(登録商標)488抗体をプロテインGビーズの2mgのAlexa-Fluor(登録商標)488標識された標的タンパク質の50ピコモルと混合し、30分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。未結合の標的は、SB18T0.05でビーズを洗浄することにより除去した。対抗選択されたDNAの候補混合物(100 μ L)をビーズに添加し、混合しながら60分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。遅いオフ速度の濃縮プロセスは、最初のラウンドでは使用せずに、ビーズは単純に100 μ LのSB18T0.05で5回洗浄した。洗浄に続き、20mMのNaOHの170 μ Lを添加し、混合しながら5分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートすることによりビーズから結合したアプタマーを溶出した。アプタマー含有溶出液(165 μ L)は、ビーズの磁気分離後に、新しいチューブに移し、80mMのHClを含有する25mMのTris-HCl pH7.5の41 μ Lを加えることによって溶液を中和した。

【0153】

ラウンド2～9の場合、以下に説明するようにDNAの候補混合物及び標的タンパク質を用いて選択を実施するとともに、並行して、DNAの候補混合物を用いるが、標的タンパク質は用いず、同一の選択を実行する。標的タンパク質(信号S)を用いた試料と標的タンパク質(バックグラウンドB)を用いない試料のPCRから得られたCt値の比較は、次のラウンドの標的の濃度を削減するための指針として使用した。デルタCt値が、4よりも大きく8未満であった場合には、標的タンパク質は、次のラウンドで1/3になった。デルタCt値が、8よりも大きい場合には、標的タンパク質は、次のラウンドで1/10になった。

【0154】

ラウンド2の場合、標識された標的タンパク質(10 μ L中5ピコモル)は、対抗選択されたDNA候補混合物の40 μ Lと混合し、15分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。遅いオフ速度の濃縮プロセスは、10mMの硫酸デキストランの50 μ Lを添加し、続いて固定された抗Alexa Fluor(登録商標)488抗体でプロテインGビーズ0.2mgを即時添加することにより開始された。これを、混合しながら15分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いで、ビーズを、SB18T0.05の30%のグリセロールで1回洗浄し、SB18T0.05の100 μ Lで5回洗浄した。20mMのNaOHの85 μ Lを添加し、混合しながら5分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートすることによってビーズからアプタマー鎖を溶出した。ビーズを磁気分離によって除去し、アプタマー溶出液の80 μ L

を新しいチューブに移し、25 mMのTris-HCl pH 7.5及び80 mMのHClからなる溶液20 µLで中和した。

【0155】

ラウンド3及び4は、硫酸デキストランを、固定された抗Alexa Fluor（登録商標）488抗体を用いてプロテインGビーズを添加する15分前に添加した以外はラウンド2に記載したように実施した。また、グリセロール洗浄は実行しなかった。

【0156】

ラウンド5から9は、ビオチン標識された標的タンパク質を用いて実行した。ラウンド5の場合、標的（10 µL中1.6ピコモル）は、対抗選択されたDNA候補混合物の40 µLと混合し、混合しながら15分間37 °Cでインキュベートした。次いで、遅いオフ速度の濃縮プロセスは、10 mMの硫酸デキストランの50 µLを添加し、混合物を混合しながらさらに15分間インキュベートすることにより開始された。SAビーズ（0.2 mg）を標的タンパク質-アプタマー複合体を捕捉するために添加した（混合しながら37 °Cで15分間インキュベーションした）。次いで、ビーズをSB18T0.05の100 µLで5回洗浄した。20 mMのNaOHの85 µLを添加し、混合しながら5分間37 °Cでインキュベートすることによってビーズから結合したアプタマーを溶出した。ビーズを磁気分離によって除去し、アプタマー溶出液の80 µLを新しいチューブに移し、25 mMのTris-HCl pH 7.5及び80 mMのHClからなる溶液20 µLで中和した。

【0157】

ラウンド6は、30分間のデキストランチャレンジを使用して、標識された標的タンパク質はSAビーズの0.05 mgで補足すること以外は、ラウンド5のように実施した。ラウンド7及び8は、標的タンパク質の0.16ピコモルのみを使用したことを以外はラウンド6と同様に実行した。9ラウンドのSELEXプロセスは、標的タンパク質の0.05ピコモルのみを使用したことを以外はラウンド8と同様に実行した。

【0158】

アプタマー増幅及び精製

各ラウンドから選択されたアプタマーDNAをQPCRにより増幅し定量化した。48 µLのDNAを、12 µLのQPCR混合物（10X KOD DNAポリメラーゼ緩衝液、Novagen社#71157、5倍希釈、25 mMのMgCl₂、5 µMのフォワードPCRプライマー（プライマー1、配列番号：2）、5 µMのビオチン化リバーSPCRプライマー（プライマー2、配列番号：3）、5X SYBR Green I、0.075 U/µLのKOD XL DNAポリメラーゼ、及びdATP、dCTP、dGTP及びdTTPの各1 mM）に添加し、Bio-Rad社 MyIQ QPCR装置において以下のプロトコルで熱サイクルを行った。1サイクルの96 °Cで15秒間、55 °Cで10秒間、及び69 °Cで30分間、続いて30サイクルの96 °Cで15秒間、69 °Cで1分間。装置のソフトウェアを用いて定量化を行い、選択されたDNAのコピー数を標的タンパク質の有無で比較してシグナル/バックグラウンド比を決定した。

【0159】

増幅後、PCR産物は、ビオチン化アンチセンス鎖を介してSAビーズ上に捕捉した。1.25 mLのSAビーズ（10 mg/mL）を、14 mLの20 mMのNaOHで1回、14 mLのSB18T0.05で2回洗浄し、1.25 mLの3 MのNaCl + 0.05 %のTween中で再懸濁し、4 °Cで保管した。25 µLのSAビーズ（3 MのNaCl中の10 mg/mL）を、50 µLの二本鎖QPCR産物に添加し、混合しながら15分間25 °Cでインキュベートした。ビーズを、16 mMのNaClで1回洗浄し、次いで、100 µLの20 mMのNaOHを添加し、混合しながら1分間37 °Cでインキュベートすることによって「センス」鎖をビーズから溶出した。溶出した鎖を廃棄し、ビーズをSB18T0.05で3回、16 mMのNaClで1回洗浄した。

【0160】

NapdUを含むアプタマーセンス鎖は、固定されたアンチセンス鎖からのプライマー

伸長によって調製した。ビーズを40 μ Lのプライマー伸長反応混合物(1Xプライマー伸長緩衝液(120 mMのTris-HCl pH7.8、10 mMのKCl、7 mMのMgSO₄、6 mM(NH₄)₂SO₄、0.1%のTRITON X-100、及び0.001%のウシ血清アルブミン)、3 μ Mのフォワードプライマー(プライマー1、配列番号:2)、各0.5 mMのdATP、dCTP、dGTP及びNaPdUTP、及び0.015 U/ μ LのKOD XL DNAポリメラーゼ)中で懸濁し、混合しながら60分間68℃でインキュベートした。ビーズをSB18T0.05で3回洗浄し、20 mMのNaOHの85 μ Lを添加し、混合しながら1分間37℃でインキュベートすることによってビーズからアプタマー鎖を溶出した。磁気分離した後、80 μ Lのアプタマー溶出物を新しいチューブに移し、20 μ Lの80 mMのHClで中和し、5 μ Lの0.1 M HEPES pH7.5で緩衝した。

10

【0161】

選択ストリンジェンシー及びフィードバック

選択工程の相対的な標的タンパク質濃度は、以下のルールに従ってQPCR信号(C_t)に応じて、各ラウンドで低下させた。

$C_t < 4$ であれば、 $[P]_{(i+1)} = [P]_{(i)}$

4 $C_t < 8$ であれば、 $[P]_{(i+1)} = [P]_{(i)} / 3.2$

$C_t \geq 8$ であれば、 $[P]_{(i+1)} = [P]_{(i)} / 10$

式中、 $[P]$ = タンパク質濃度であり、 i = 現在のラウンド数である。

【0162】

20

各選択ラウンド後、濃縮されたDNAの混合物の収束状態を決定した。10 μ Lの二本鎖QPCR産物は、1X SYBR Green Iを含有する4 mMのMgCl₂で200 μ Lに希釈した。試料は、二本鎖オリゴヌクレオチドの複合体混合物に関するハイブリダイゼーション時間を測定する C_0t 分析を使用して、収束に関して分析した。以下のプロトコルで、試料に熱サイクルを行った。3サイクルの98℃1分間、85℃1分間、2サイクルの98℃1分間、その後85℃30分間。85℃で30分間の間に、5秒間隔で蛍光画像を測定した。蛍光強度を時間の対数の関数としてプロットし、各SELEXラウンドによるハイブリダイゼーションの増加率が観察され、配列の収束を示した。

【0163】

濃縮されたプールの配列決定及びアプタマーの同定

30

SELEXプロセスの9ラウンドの後、収束したプールを配列決定した。次のように配列の準備を行った。プールは、一意のバーコード/インデックスシーケンス(各プールの一意のシーケンス識別子)を含むSELEXライブラリー特異的プライマーを用いてPCRにより増幅した。個々のPCR産物は、Quant-iT(商標)PicoGreen(登録商標)のdsDNA試薬(Life Technologies社)アッセイを用いて定量化し、等モル濃度で組み合わせ、濃縮/緩衝液はアミコン ウルトラ-0.5遠心フィルター装置(Millipore)を使用して交換した。次いで、混合物をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製し、溶出液をアミコン ウルトラ-0.5遠心フィルター装置を使用して濃縮し、最終混合物の大きさ、純度及び収率を確認するために、PAGEによって可視化した。試料は、Ion Torrent PGM配列決定のためにSeqWright ゲノム サービス(GE Healthcare社、ヒューストン、TX)に提出した。40,000超の配列を含む配列のプールから、384個がランダムに選択され、配列カウント/コピー数を決定し、ローカルアラインメント アルゴリズムを使用して共通の収束パターンを識別するカスタムソフトウェアを使用して、収束について分析した。プール内の最大の表現/コピー数を有する配列及びすべての収束パターンの少なくとも1つの配列を、さらなる特徴付けのために選択した。収束パターン1は、配列8491-3__3(配列番号:4)、8491-94__3(配列番号:5)、8491-189__3(配列番号:8)及び8491-282__3(配列番号:9)から最初に同定した。これら4つの配列に由来するコンセンサス領域は、40,000超の配列の全ラウンド9配列プール内の収束パターン1の他のメンバーを同定するた

40

50

めに使用した。

【0164】

アプタマーの合成

結合及び抑制ポテンシャルの決定のために、個々のアプタマーを固相合成によって調製した。固相合成に使用された修飾デオキシウリジン - 5 - カルボキサミドアミダイト試薬は以下により調製した。5) - 2' - デ - O - (4, 4) - 2' - デ - ジメトキシトリチル) - 5 - トリフルオロエトキシカルボニル - 2) - 2' - デ - デオキシウリジン (Nomura ら。 (1997) Nucl. Acids Res. 25: 2784) を適切な [1 - ナフチルメチルアミン] 一級アミンと濃縮し (RNH_2 、1.2 当量、 Et_3N 、3 当量、アセトニトリル中 60℃、4 時間)、2 - シアノエチル - N, N - ジイソプロピルクロロホスホラミダイトと 3) - 2' - デ - O - ホスホフィチジル化し (1.2 当量、 iPr_2EtN 、3 当量、 CH_2Cl_2 、-10℃から 0℃、4 時間)、中性シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーで精製した (Still ら。 (1978) J. Org. Chem. 43: 2923)。アプタマーはホスホラミダイトメソッド (Beaucage 及び Caruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22: 1859) を用いた固相合成により調製された。本明細書で開示される独特の塩基修飾のためプロトコルをいくらか修正した。脱トリチル化はトルエン中 10% ジクロロ酢酸で 45 秒行われた。カップリングは 1:1 アセトニトリル: ジクロロメタン 0.1 M 中で 5 - ベンジルメルカプトテトラゾールにより活性化され、3 回 5 分間反応させることで行われた。キャッピング及び酸化は装置ベンダーの推奨に従って行われた。脱保護は、パーステンレス鋼反応器内の最適化された圧力、時間、及び温度下で気体状アンモニアまたはメチルアミンで行われた。生成物を、脱イオン水を用いて適切な 96 ウェルプレートに溶出し、LCMS 特徴付けのために統計的にサンプリング ($N+1$) し、UV 分光光度法により定量化し、緩衝水溶液中のタンパク質結合親和性について試験した。

【0165】

実施例 2: C3 - タンパク質に対するアプタマーの平衡結合定数 (K_d)

この実施例では、アプタマー - C3 - タンパク質結合親和性を測定し、 K_d を決定するために本明細書で使用される方法を提供する。簡潔には、放射性標識 DNA アプタマー (^{32}P) を、SB18T0.01 緩衝液 (40 mM の HEPES、pH 7.5、125 mM の NaCl、5 mM の KCl、5 mM の MgCl_2 、0.01% の TWEEN-20) 中で 95℃ で 3 分間加熱し、ゆっくりと 37℃ まで冷却した。複合体は、60 μL の反応容量の SB18T0.01 緩衝液中、 $1 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-12} \text{ M}$ の濃度範囲で組換え C3 - タンパク質を用いて約 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ で放射性標識された DNA を混合し、60 分間 37℃ でインキュベートすることによって形成した。各反応 (5 μL) の一部は、ナイロン膜に移し、乾燥させ、各反応の総カウント数を決定した。複合体を、ZORBAX 樹脂 (30 ng/ μL 、AGILENT) 上に捕捉し、真空下でマルチスクリーン HV プレート (Millipore) を通過させ、非結合 DNA からタンパク質に結合した複合体を分離するために 180 μL の SB18T0.01 緩衝液で洗浄した。ナイロン膜及びマルチスクリーン HV プレートを FUJIFILM FLA-3000 phosphor imager (登録商標) で撮像し、各試料中の放射能の量を ImageQuant (商標) 解析ソフトウェアを用いて定量化した。捕捉された DNA の画分は、C3 - タンパク質濃度 (P_t) の関数としてプロットし、平衡結合定数 (K_d) は、以下の式を用いて決定した。 $y = (\text{最大} - \text{最小}) / (K_d + P_t) + \text{最小}$ 。

【0166】

図示の例のように、図 2 は、ヒト C3 - タンパク質の結合曲線を示すグラフを示す。DNA アプタマー 8491-94__3 (配列番号: 5)、8491-94__53 (配列番号: 58)、及び 8491-94__97 (配列番号: 125) は、それぞれ、 $3.13 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $3.34 \times 10^{-11} \text{ M}$ 及び $5.49 \times 10^{-11} \text{ M}$ の K_d で C3 - タンパク質に結合した。図 3 は、アプタマー 8491-94__53 (配列番号: 58) 及び 84

9 1 - 9 4 __ 9 7 (配列番号 : 1 2 5) のヒト C 5 タンパク質への結合を示すグラフを示す。C 3 - タンパク質のこれらのアプタマーの特異性を示す、ヒト C 5 タンパク質への明らかな結合は検出されていない。

【 0 1 6 7 】

表 2 は、収束パターン 1 のメンバーの C 3 のアプタマー配列との親和性を示す。

【表 2】

表 2 収束パターン 1 の代表的な配列。ランダム領域で収束として示す配列。すべての配列は、5' - 及び 3' プライマーの 5 塩基 (図示せず)、ならびに 3' 末端でデオキシチミジンに連結した 3' - 3 も含む。

アプタマ 番号	配列 (5' → 3')	K_d (M)	配列 番号
8491-3_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	1.19e-10	4
8491-94_3	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G	3.13e-11	5
8491-389_3	A-P-G-P-C-G-G-C-G-P-P-P-G-G-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-C-G-P	2.95e-11	6
8491-390_3	P-A-C-A-A-A-G-C-G-A-P-P-G-G-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-P-C-P-C-G-C-P-C	4.12e-10	7
8491-189_3	A-G-A-C-P-G-P-A-G-P-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-A-C-A-P-P-G	3.35e-11	8
8491-282_3	P-A-C-G-G-P-P-G-G-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-A-P-A-C-C-C-C	2.70e-10	9
8491-395_3	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	3.52e-9	10
8491-394_3	C-P-P-A-A-A-A-G-G-G-P-C-G-P-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-C-C-G-A	4.48e-10	11
8491-397_3	G-P-C-P-G-G-C-P-A-A-C-P-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-G-P-G-A-G-C-G-P-G-A-P-P-A-P	3.11e-9	12
8491-396_3	P-G-P-P-G-A-C-P-C-A-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-C-G-G-C-A-A-P-A-G-C-A-C-A	3.11e-10	13
8491-393_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-C-G-P-P-C-A-C-A-A-G	2.5e-10	14
8491-406_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-P-G-A-A-C-G-P-G	2.47e-9	15
8491-387_3	C-P-A-A-C-A-C-G-G-C-C-G-A-G-P-P-G-A-C-P-C-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-C	5.19e-10	16
8491-405_3	A-P-G-P-C-G-G-C-G-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-G-C-A-G-G-G	1.59e-10	17
8491-388_3	A-C-G-G-P-G-A-C-P-C-C-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-C-G-G-A-C-G-C-A-C-C	7.1e-10	18
8491-403_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-P-P-P-G-G-G-C-C-G-G-G-G-G-G-C-A-G	1.53e-10	19
8491-385_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-P-P-P-G-A-C-C-G-G-G-G-C-A-G-G-G-G	1.46e-10	20

10

20

30

40

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d (M)	配列番号
8491-407_3	G-A-G-C-A-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-A-C-G-C-G-P	2.08e-10	21
8491-402_3	P-C-C-C-A-C-A-C-G-A-C-G-A-A-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A	7.39e-11	22
8491-408_3	C-A-A-G-C-C-P-C-P-C-G-G-P-P-P-G-G-C-P-A-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-C-A-C	1.61e-10	23
8491-400_3	P-P-G-A-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-G-C-G-G-A-A-P-A-C-C-A-G-C-P-G-A-C	1.20e-9	24
8491-404_3	G-A-G-C-P-P-P-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-P-P-G-G-C-C-G-G-C-A-G-G-G	1.85e-10	25
8491-386_3	A-G-C-A-A-C-P-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-P-A-P-G-C-G-A-G-A-A-C-A	1.04e-10	26
8491-399_3	C-P-A-P-G-A-G-G-G-C-P-G-A-P-P-C-A-A-P-A-G-P-C-A-G-P-A-C-G-P-P-C-G-C-C-C-A-P-C	8.61e-9	27
8491-409_3	P-C-C-C-P-P-P-G-G-C-P-C-G-A-P-A-G-P-C-G-G-P-A-C-G-P-P-P-P-G-G-G-A-G-G-C-G-P-G	3.16e-10	28
8491-401_3	G-A-G-P-A-C-P-P-C-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-P-A-C-G-P-P-P-G-G-C-C-G-G-C-A-G-G-C	NB	29
8491-398_3	C-G-P-G-A-C-P-C-G-A-P-G-A-G-P-C-A-P-A-G-P-C-G-G-P-P-C-C-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G	NB	30

PはN a p d U

NBは結合なし

【0168】

実施例3：補体媒介溶血の阻害。

この実施例では、抗体被覆されたヒツジ赤血球の補体媒介溶血のアプタマー阻害を測定するために本明細書で提供される方法を提供する。C3 - タンパク質枯渇ヒト血清 (Complement Technologies カタログ番号 A314) の1:20希釈は、示された最終濃度のアプタマーの有無にかかわらず、20または25 nMのヒトC3 - タンパク質 (図に示す) と抗体被覆ヒツジ赤血球 (7×10^7 細胞/mL Complement Technologies カタログ番号 B200) とを混合させたものである。アプタマーを添加しないまたはC3 - タンパク質及びアプタマーを添加しない対照サンプルには、すべての赤血球が溶解された陽性対照もともに含まれている。試料は希釈され、アッセイは、ゼラチンベロナル緩衝液 (GVB++; 0.1%ゼラチン、0.15 mMの塩化カルシウム、0.5 mMの塩化マグネシウム、5 mMのベロナル、145 mMのNaCl、0.025%のNaN₃、pH7.3、Complement Technologies カタログ番号 B102) の0.075 mLの総容量で行い、37で30分間インキュベートした。試料は(10分間200×gで)遠心分離し、412 nmで上清の吸光度をGVB++緩衝液の4希釈中1希釈の後に測定した。補体媒介溶血を阻害する収束パターン1のアプタマーの能力は、図4及び図5に示されている。

【0169】

収束パターン1のアプタマーは、所望の高親和性結合 (表2) 及び阻害特性 (図4) を有することが見出された。27個の独立した配列は、40,000超の配列の元の配列プールからこのパターン内で同定された。27個の配列すべてを、ヒトC3 - タンパク質への結合について試験した。25個は、高親和性 (表2) を用いて、ヒトC3 - タンパク質に結合することが見出された。抗体被覆されたヒツジ赤血球 (図4) の補体媒介溶血を阻害する能力についてこれらの配列の20個を試験した。溶血アッセイにおいて強力な阻害剤であった18アプタマーは、高い親和性でC3 - タンパク質に結合したものであった。

C3 - タンパク質に結合しなかったものは阻害剤 (< 25% 阻害) ではなかった。さらなる対照として、8491 - 94__3 配列 (配列番号: 5) 内でヌクレオチドを修飾した単一の NapdU をデオキシチミジンヌクレオチドで置換した、2つの配列を C3 - タンパク質への結合について及び C3 - タンパク質の阻害について試験した。これら2つの配列、8491 - 94__14 (配列番号: 35) 及び 8491 - 94__15 (配列番号: 36) は、高い親和性で C3 - タンパク質に結合する (表3を参照) または溶血を阻害しなかった (図4)。これらのデータは、C3 - タンパク質への高親和性結合が観察された阻害特性のために必要であり、修飾 NapdU ヌクレオチドが結合の全体的な親和性に大きく寄与することを示す。

【0170】

C3 - タンパク質に結合するために図示しない2つの配列を除いた後、残りの25個の配列は、コンセンサス領域の23ヌクレオチドの長さを明らかにするために整列させた (図1)。各配列が同定された数字がこの図に示されている。任意の他の配列から5つ超のヌクレオチドの相違を有する配列は、独立して選択された配列であると見なした。図1に示される任意の特定配列から1~5つのヌクレオチドの相違を有する配列は、その配列の総配列数に含まれている。この領域は、位置2、6、10、13、17、21及び22で保存 NapdU 塩基 (P) を有することを特徴とする。位置1は、25個の配列のうち20個の配列で P であり、3個の配列 [8491 - 94__3 (配列番号: 5)、491 - 395__3 (配列番号: 10) 及び 8491 - 388__3 (配列番号: 18)] でグアニン (G) であり、2個の配列 [8491 - 397 (配列番号: 12) 及び 8491 - 399 (配列番号: 27)] でシトシン (C) だった。位置3は G であるが、位置4は A が19回出現し G が6回出現するプリン塩基である。位置5は、1つの配列 [8491 - 399__3 (配列番号: 27)] が P である以外はすべて C である。位置7は、配列の23個で C であり、2つの配列 [8491 - 397__3 (配列番号: 12) 及び 8499 - 408__3 (配列番号: 23)] で A である。位置8は、検討中の25個の配列のうち17個の配列で A であり、5個の配列で C 及び3個の配列で G である。位置8と9の間のコンセンサスモチーフ内の単一塩基挿入 (C または A) は、4つの配列 [8491 - 387 (配列番号: 16)、8491 - 396 (配列番号: 13)、8491 - 397 (配列番号: 12)、及び 8491 - 404 (配列番号: 25)] で観察される。位置9は、2つの配列 [8491 - 404 (配列番号: 25) 及び 8491 - 397 (配列番号: 12)] が P である以外は A であるこれらの配列のうちの1つは、3.1 nM の K_d を有する C3 - タンパク質と結合することが示された。[8491 - 397__3 (配列番号: 12)] 位置10~14は、配列5) - 2' - デ - P - A - G - P - C - 3) - 2' - デ (配列番号: 132) で完全に保存されている。位置15は、3つの配列 [8491 - 390__3 (配列番号: 7)、8491 - 282__3 (配列番号: 9) 及び 8491 - 399__3 (配列番号: 27)] は A、1つの配列 [8491 - 409__3 (配列番号: 28)] は G、それ以外は C である。位置16~22は、C3 - タンパク質に結合するこれらの配列で完全に保存されている。これらの位置は、配列5) - 2' - デ - G - P - A - C - G - P - P - 3) - 2' - デ (配列番号: 133) を含む。検討中の25個の配列のうち、位置23は、20例で P であるが、5例で C である。

【0171】

ヒト C3 - タンパク質のこれらの高親和性阻害剤のうち、配列 8491 - 94__3 (配列番号: 5) は、改善された特性及び特徴を識別するために、ポスト S E L E X 修飾に選出した。図5Aに示すように、この配列は、14.8 nM での IC_{50} を用いて、この系における抗体コーティングしたヒツジ赤血球の溶血を阻害することができる。

【0172】

実施例4: C3aの放出の阻害。

この実施例では、C3a及びC3bへのC3 - タンパク質のタンパク質分解的切断を防止し、したがって、ヒト C3 - タンパク質の活性化を防止するアプタマーの能力を測定するために本明細書で使用される方法を提供する。アッセイの主体は、アプタマーの存在下

10

20

30

40

50

または非存在下で、予備活性化ザイモサンA (Complement Technologies カタログ番号B400)を用いて、ヒト血清中の補体系の代替経路を開始することである。経路が開始されると、C3aは解放され、次に、血清中にすでに存在するエンドペプチダーゼによってC3a desArgに急速に代謝される。C3a desArgの相対量を、メーカーの指示に従ってDB OptEIA (商標)ヒトC3a酵素免疫測定法 (ELISA)キット (BD Biosciences社、カリフォルニア州サンディエゴ カタログ番号550499)を用いて測定する。正常ヒト血清 (COMPLEMENT TECHNOLOGIS カタログ番号NHS)は、所定の濃度のアプタマーの添付の有無にかかわらず、10 nMのマグネシウムEGTA (COMPLEMENT TECHNOLOGIS カタログ番号B106)を含むゼラチンベロナル緩衝液 (0.1%ゼラチン、5 mMのベロナル、145 mMのNaCl、0.025%のNa₃N₃、pH 7.3、COMPLEMENT TECHNOLOGIS カタログ番号B101)に10%または34%まで希釈する。補体カスケードは、ザイモサンA (0.5 mg/mL)の添加によって開始され、補体カスケードは、37 °Cで30分間進行させる。次に、ザイモサンAを、室温で遠心分離 (4分間7,000 × g)によって溶液から除去し、ヒトC3a ELISAキットで測定するために試料を適切に希釈する。C3a desArg ELISAの性能を有するアプタマー干渉の可能性の対照として、アプタマーは、30分間の反応の後に添加される。ザイモサンA誘導性の補体活性化後のC3aの放出を阻害しない、代表的な収束パターン1の配列、8491-3__3 (配列番号: 4)、(8491-94__3 (配列番号: 5)、8491-189__3 (配列番号: 8)、8491-387__3 (配列番号: 16)及び8491-389__3 (配列番号: 6)の能力が、図12Aに示されている。図12Bに示すように、観察された阻害は、C3aの検出系 (C3a desArg ELISA)のアプタマーの干渉によるものではない。この対照では、図12Aに示す対応する阻害実験と同じ濃度でアプタマーが存在するように補体カスケードを実行した後、アプタマーを添加する。図6のパターン1のメンバーでは、8491-94__3 (配列番号: 5)は、2 μMのIC₅₀を用いて、34%正常ヒト血清中のC3aの放出を阻害することが示されている。

【0173】

8491-94__3 (50-mer)のNapdUためのデオキシチミジン置換。

デオキシチミジン (dT) ウォークは、8491-94__3 (配列番号: 5)で実行される。単一のdTは、修飾ヌクレオチド (NapdU)を含む8つの位置うちの1つと置換した。dTウォークは、高親和性結合に必要ではない高親和性結合修飾ヌクレオチドのために、各修飾ヌクレオチドの寄与が、潜在的に非修飾塩基で置換するまたは削除することができると決定するためのものである。この表では、「P」はNapdUを表し、A、T、C及びGは、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し、「NB」は最高100 nMのヒトC3-タンパク質まで結合がなかったことを表す。このウォークの結果を表4に示す。修飾された最初の7つのヌクレオチド (5')-2'-デ末端に最も近い7つの置換は、いずれの置換もしない50-merと比べてC3-タンパク質の相対的な親和性を減少させた。3')-2'-デ末端に最も近いNapdUの置換は、結合に有意な影響を与えなかった。

【表 3】

表 3 50-mer 8491-94__3 (配列番号: 5) でNapdU修飾塩基 (P) のためのデオキシチミジン (T) の置換。すべての配列は、3'末端で3'-3'連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d (M)	配列番号
8491-94_11	A-C-T-C-C-C-C-G-G-T-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	2.95e-08	32
8491-94_12	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-T-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	8.57e-09	33
8491-94_13	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-T-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	4.17e-08	34
8491-94_14	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-T-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	1.00e-06	35
8491-94_15	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-T-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	1.00e-06	36
8491-94_16	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-T-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	6.94e-08	37
8491-94_17	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-T-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	2.88e-09	38
8491-94_18	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-T-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	4.21e-11	39

【0174】

8491-94__3 (配列番号: 5) を50-merに切断。

配列8491-94__3 (配列番号: 5) が、ポストSELEX修飾及び分析のために選択され、一連の欠失実験で8491-94__53 (配列番号: 58) は28-merに切断された (表4)。切断された配列は、ヒトC3-タンパク質に対して高い親和性を維持し、上記のように、まだ23ヌクレオチドのコンセンサスモチーフを含む。上記のように高い結合親和性に大きく寄与しなかった修飾ヌクレオチドは、この28-merで除去される。20nMの (最終濃度) C3-タンパク質を用いて強化されたC3枯渇ヒト血清を用いて行った溶血アッセイのC3タンパク質を阻害するそれらの能力についても代表的な切断を試験した (図5)。8491-94__26 (配列番号: 54)、8491-94__27 (配列番号: 55)、及び8491-94__53 (配列番号: 58) はそれぞれ、15.1nM、24.6nM及び17.1nMのIC₅₀値で溶血を阻害することができた。8491-94__53 (配列番号: 58) の28-merの切断により、1.5μMのIC₅₀を用いて、34%正常ヒト血清中のC3aの放出が阻害されることも示された (図6)。

【表 4】

表 4 8491-94_3 (配列番号: 5) を 50-mer に切断。すべての配列は、3' 末端で 3'-3' 連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d	配列番号
8491-94_4	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A	2.91e-11	40
8491-94_5	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C	2.98e-11	41
8491-94_6	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A	1.90e-11	42
8491-94_7	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C	1.94e-11	43
8491-94_8	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	3.69e-11	44
8491-94_9	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	2.43e-10	45
8491-94_10	P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	7.60e-09	46
8491-94_19	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.59E-11	47
8491-94_20	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C	1.14e-09	48
8491-94_21	A-C-T-C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P	2.49e-10	49
8491-94_22	C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	1.03e-10	50
8491-94_23	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C-G-A-A-C-G-C-G-G-A-G-G-A	6.21e-11	51
8491-94_24	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G-P-C-C	5.35e-11	52
8491-94_25	C-C-C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	9.28e-11	53

10

20

30

アダプター 番号	配列 (5'→3')	K_d	配列 番号
8491-94_26	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.11e-11	54
8491-94_27	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	6.58e-11	55
8491-94_28	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C	2.65-10	56
8491-94_29	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.81e-11	57
8491-94_53	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	3.34e-11	58
8491-94_87	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-G	1.54e-10	59

10

【0175】

8491-94_26 (配列番号: 54) で C3 - スペーサー 単一置換。

C3 アダプターのポスト SELEX 修飾の最初のラウンドは、NapdU を含むそれらの位置を除く 30-mer の 8491-94_26 (配列番号: 54) のすべての位置で C3 - スペーサー ウォークだった。C3 - スペーサー ウォークは、3 炭素 スペーサー (C3 - スペーサー) またはヘキサエチレングリコール (Heg) リンカー またはポリエチレングリコール (PEG) リンカー などの他のリンカー で置き換えられ、潜在的に完全に除去することができる高親和性結合に必要なではない塩基を識別するためのものである。C3 - スペーサー 置換の結果を表 5 に示す。この表では、「P」は NapdU を表し、「C3」は、C3 - スペーサー を表し、A、C 及び G は、天然に存在するデオキシリボヌクレオチドを表し、「NB」は最高 100 nM の C3 - タンパク質まで結合がなかったことを表す。いくつかの部位は、C3 - スペーサー 置換を許容した。3 つの内部位置の C3 - スペーサー の置換は、8491-94_26 (配列番号: 54) と比較して、C3 - タンパク質との結合強化を示した。これらは、8491-94_26 (配列番号: 54) の 5) - 2' - デ末端に相対する位置 8、18、及び 26 であった。位置 8 の置換は、31.5 pM の親和性解離定数 (K_d) を有する C3 - タンパク質に結合するアダプター 8491-94_36 (配列番号: 66) を作製し、位置 18 または 26 の置換は、それぞれ、14.2 pM 及び 30.2 pM の K_d 値を有する C3 - タンパク質に結合するアダプター 8491-94_43 (配列番号: 73) 及び [8491-94_48 (配列番号: 78)] を、それぞれ作製する。

20

30

【0176】

単一 Heg または C3 - スペーサー (「C3」) の置換または複数の C3 - スペーサー の置換は、28-mer のアダプター 8491-94_53 の等価な位置で行われた (表 6)。なお、位置 7、17 及び 25 (8491-94_53 の 5) - 2' - デ末端からの相対番号) の 3 つの C3 - スペーサー 基の置換は、8491-94_53 (配列番号: 58) の 33.4 pM と比べて、22.1 pM の K_d でアダプターにつながる。

40

【0177】

C3 - スペーサー 基を含有する個々の配列は、溶血アッセイで C3 - タンパク質を阻害する能力を維持する (図 5)。配列 8491-94_30 (配列番号: 60)、8491-94_36 (配列番号: 66)、8491-94_37 (配列番号: 67) 及び 8491-94_43 (配列番号: 73) は、それぞれ 20.9 nM、25.0 nM、24.7、及び 19.2 nM の IC₅₀ 値でこのアッセイで溶血を阻害することができた。

【表 5】

表5 30-mer 8491-94_26 (配列番号: 54) でC3-スパーサー置換。すべての配列は、3'末端で3'-3'連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K_d (M)	配列番号
8491-94_30	C3-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	6.22e-11	60
8491-94_31	C-C3-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.4e-10	61
8491-94_32	C-C-C3-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	7.8e-10	62
8491-94_33	C-C-G-C3-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	2.45e-10	63
8491-94_34	C-C-G-G-P-C3-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.41e-8	64
8491-94_35	C-C-G-G-P-G-C3-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.67e-9	65
8491-94_36	C-C-G-G-P-G-A-C3-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	3.15e-11	66
8491-94_37	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C3-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	9.22e-11	67
8491-94_38	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-C3-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.48e-10	68
8491-94_39	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-C3-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	3.10e-10	69
8491-94_40	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-C3-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.99e-9	70
8491-94_41	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-C3-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	5.98e-10	71
8491-94_42	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C3-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	8.60e-10	72

10

20

30

8491-94_43	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.42e-11	73
8491-94_44	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-C3-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-G	1.28e-9	74
8491-94_45	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-C3-C-G-P-P-C-C-C-G-G	2.28e-7	75
8491-94_46	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C3-G-P-P-C-C-C-G-G	NB	76
8491-94_47	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-C3-P-P-C-C-C-G-G	NB	77
8491-94_48	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G-G	3.02e-11	78
8491-94_49	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C3-C-G-G	2.66e-10	79
8491-94_50	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C3-G-G	4.48e-10	80
8491-94_51	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-C3-G	2.27e-10	81
8491-94_52	C-C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G-C3	5.04e-11	82

【表 6】

表6 28-mer 8491-94_53でC3-スパーサー及びヘキサエチレングリコール (Heg) スパーサー置換。すべての配列は、3'末端で3'-3'連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d (M)	配列番号
8491-94_54	C-G-G-P-G-A-C3-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	2.21E-11	83
8491-94_55	C-G-G-P-G-A-C3-P-C3-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	4.15E-11	84
8491-94_56	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C-C-G	4.64E-11	85
8491-94_57	C-G-G-P-G-A-C-P-Heg-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.45E-10	86
8491-94_58	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	7.87E-10	87

【0178】

8491-94_53 (配列番号: 58) で2)-2'-デ- O -メチル単一置換。

切断されたNapdU含有の遅いオフ速度の修飾アプタマー (SOMAmer) 8491-94_53 (配列番号: 58) のヌクレアーゼ耐性を高めるために、2)-2'-デ- O -メチル (2)-2'-デ- OMe) 基は、C3-タンパク質への結合が有意に影響されなかったヌクレオチドの位置に組み込まれた。任意の個々の2)-2'-デ- OMe

の追加のタンパク質結合への影響は、先験的に予測することはできない。したがって、アプタマー 8491-94_53 (配列番号: 58) のいくつかの変異体の「2)-2'-デ-O-Meウオーク」が実行され、各変異体が単一の修飾ヌクレオチドのみを含む「2)-2'-デ-O-Meウオーク」が作製された。各変異体の結合親和性が決定された (配列番号: 88~115)。

【0179】

2)-2'-デ-O-メチル置換は、このヌクレアーゼ耐性置換を許容する可能性がある位置を同定するために行われた。配列及び各構築物の結合親和性は、表7に示す。この表では、上付き文字1 (¹) は、2)-2'-デ-O-メチル置換を有するヌクレオチドを表し、「P」はNapdUを表し、「A」、「C」及び「G」は、天然に存在する核酸塩基を表し、「NB」は最高100 nMのヒトC3-タンパク質まで結合がなかったことを表す。100 pM未満のK_dを維持する間に、置換が位置18で行われる可能性がある。

【表7】

表7 28-mer 8491-94_53 (配列番号: 58) で2'-O-メチル及びデオキシチミジン置換。すべての配列は、3'末端で3'-3'連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d (M)	配列番号
8491-94_59	C ¹ -G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	3.42e-11	88
8491-94_60	C-G ¹ -G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	5.37e-11	89
8491-94_61	C-G-G ¹ -P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	2.37e-11	90
8491-94_62	C-G-G-P ¹ -G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	9.18e-11	91
8491-94_63	C-G-G-P-G ¹ -A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	2.68e-11	92
8491-94_64	C-G-G-P-G-A ¹ -C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	5.12e-10	93
8491-94_65	C-G-G-P-G-A-C ¹ -P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	3.16e-11	94
8491-94_66	C-G-G-P-G-A-C-P ¹ -C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	1.49e-10	95
8491-94_67	C-G-G-P-G-A-C-P-C ¹ -A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	6.99e-11	96

8491-94_68	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A ¹ -A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	4.24e-11	97
8491-94_69	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A ¹ -P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.72e-10	98
8491-94_70	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P ¹ -A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	3.38e-10	99
8491-94_71	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.56e-11	100
8491-94_72	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G ¹ -P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	6.17e-09	101
8491-94_73	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P ¹ -C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	1.32e-09	102
8491-94_74	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C ¹ -C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	1.92e-10	103
8491-94_75	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C ¹ -G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.14e-10	104
8491-94_76	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G ¹ -P-A-C-G-P-P-C-C-C-G	9.30e-10	105
8491-94_77	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P-P-C-C-C-G	2.62e-11	106
8491-94_78	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A ¹ -C-G-P-P-C-C-C-G	7.18e-11	107
8491-94_79	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C ¹ -G-P-P-C-C-C-G	2.73e-10	108
8491-94_80	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G ¹ -P-P-C-C-C-G	6.78e-11	109
8491-94_81	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P ¹ -P-C-C-C-G	2.43e-11	110
8491-94_82	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P ¹ -C-C-C-G	1.18e-11	111
8491-94_83	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C ¹ -C-C-G	4.88e-11	112
8491-94_84	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C ¹ -C-G	7.38e-11	113
8491-94_85	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C ¹ -G	5.24e-11	114
8491-94_86	C-G-G-P-G-A-C-P-C-A-A-P-A-G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G ¹	3.44e-11	115

【 0 1 8 0 】

8 4 9 1 - 9 4 _ 5 3 (配列番号 : 5 8) の C 3 - スペース置換を有する複数の 2) - 2 ' - デ - O - メチル置換または複数の 2) - 2 ' - デ - O - メチル置換。

ヌクレアーゼ耐性を最大にするために、複数の 2) - 2 ' - デ - O - メチル置換を有するアプタマーが所望される。複数の 2) - 2 ' - デ - O - メチル置換と組み合わせた C 3

10

20

30

40

50

- スペーサーまたはH E G部分の添加は、潜在的にさらにヌクレアーゼ安定性を高め得る。上記の2)-2'-デ-O M e ウォークの結合情報に基づいて、いくつかの2)-2'-デ-O M eの添加が、このような置換(配列番号: 116~130)を可能にするためにすでに同定されたシトシンヌクレオチドのためのC3-スペーサーまたはH e g部分の同時置換の有無にかかわらず、各アプタマー内に組み込まれた、いくつかのアプタマーが作製された。さらに、特定の位置での塩基置換は、C3-スペーサー(配列番号: 138~151)の同時置換の有無にかかわらず、いくつかの2)-2'-デ-O M e置換と組み合わせて探索された。作製される配列及び関連する結合親和性を表8に示す。この表では、上付き文字1(¹)は、2)-2'-デ-O-メチル置換を有するヌクレオチドを表し、「P」はN a p d Uを表し、「C3」は、3炭素スペーサーを表し、「H e g」はヘキサエチレングリコールを表し、「A」、「C」、「T」、「U」及び「G」は、天然に存在する核酸塩基を表し、「NB」は最高100 nMのヒトC3-タンパク質まで結合がなかったことを表す。すべての組み合わせが、高親和性結合を維持してはいない。たとえば、8491-94__91(配列番号: 119)、8491-94__92(配列番号: 120)、及び8491-94__126(配列番号: 138)は、識別可能な結合活性をまったく示さなかった。しかし、2)-2'-デ-O-メチルヌクレオチドを含有する、8491-94__97(配列番号: 125)を含む他の組み合わせは、依然として、ヒトC3-タンパク質との高い親和性を維持している。溶血アッセイにおけるC3-タンパク質を阻害するそれらの能力について代表的な配列を試験した(図5b)。アプタマーの8491-94__90(配列番号: 118)、8491-94__97(配列番号: 125)及び8491-94__100(配列番号: 128)は、それぞれ、18.9 nM、15.6 nM、及び19.7 nMのIC₅₀値で阻害した。さらに、アプタマーの8491-94__97(配列番号: 125)は、3 μMのIC₅₀値で34%正常ヒト血清中のC3aの放出を阻害することが示されている(図6)。

10

20

【表 8】

表 8 C3-スパーサー及び／または 28-mer アプタマーの 8491-94_53 (配列番号: 58) のヌクレオチド置換の有無にかかわらず、複数の 2'-O-メチル置換または複数の 2'-O-メチル置換。すべての配列は、3' 末端で 3'-3' 連結されたデオキシチミジンを含む (図示せず)。

アプタマー番号	配列 (5'→3')	K _d (M)	配列番号
8491-94_88	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A-A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G ¹	2.48E-11	116
8491-94_89	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C-C-G ¹	1.73E-11	117
8491-94_90	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A-C-G-P-P-C-C ¹ -C ¹ -G ¹	4.24E-12	118
8491-94_91	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P ¹ -P ¹ -C-C-C-G ¹	NB	119
8491-94_92	C ¹ -G-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C-C-G ¹	NB	120
8491-94_93	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P ¹ -P ¹ -C-C ¹ -C ¹ -G ¹	1.52e-11	121
8491-94_94	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A-C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.57e-11	122
8491-94_95	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	3.57e-11	123
8491-94_96	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-G-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	3.64e-11	124
8491-94_97	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.49e-11	125
8491-94_98	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	9.50e-11	126
8491-94_99	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	1.67e-10	127
8491-94_100	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C3-P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	7.94e-11	128
8491-94_101	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P-A ¹ -C-G ¹ -P-P-C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	2.19e-10	129
8491-94_102	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C3-P-C-A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P-A-C-G-P-P-C3-C ¹ -C ¹ -G ¹	6.03e-11	130
8491-94_126	C ¹ -A-G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-A-P ¹ -A ¹ -C-A-P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A	NB	138

10

20

30

40

8491-94_127	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	4.5e-11	139
8491-94_128	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	3.8e-11	140
8491-94_129	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.79e-11	141
8491-94_130	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.79e-08	142
8491-94_131	T-G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	5.64e-09	143
8491-94_132	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	1.27e-08	144
8491-94_133	C ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -T-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -G ¹	5.06e-09	145
8491-94_134	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	1.07e-10	146
8491-94_135	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	1.53e-08	147
8491-94_136	G ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹	9.10e-09	148
8491-94_137	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-G ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.19e-10	149
8491-94_138	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C3-G-P ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	1.82e-08	150
8491-94_139	U ¹ -G ¹ -G ¹ -P-G ¹ -A-C ¹ -P-C ¹ -A ¹ -A-P-A ¹ -G-P-C-C-G-P ¹ -A ¹ -C-A ¹ -P ¹ -P ¹ -C ¹ -C ¹ -C ¹ -A ¹	2.67e-08	151

¹2'-OMe糖を含むヌクレオチド。

【0181】

実施例5：DNアーゼIまたはDNアーゼIIによる消化にアプタマー感度の決定。

この実施例では、デオキシリボヌクレアーゼI（DNアーゼI）またはデオキシII（DNアーゼII）による消化に対するアプタマーの感度を決定するために本明細書で使用される一般的な方法及び材料の概要を提供する。DNアーゼIのアプタマー安定性アッセイの場合、250 nMの終濃度のポリアクリルアミドゲル精製アプタマーを、100 μLの全反応量で、ヌクレアーゼ緩衝液（10 mM Tris HCl pH 7.6、2.5 mMのMgCl₂、0.5 mMのCaCl₂）において37℃で、2ユニット/mLの組換えヒトDNアーゼI（Cell Sciences、カタログ番号CSI10719）とともにインキュベートした。様々な時間で、15 μLのアリコートを集し、等量の2×ゲルローディング緩衝液（93.85%ホルムアミド、0.2%SDS、20 mMのNa₂EDTA、0.05%キシレンシラノール及び0.1%オレンジG）を添加して反応を停止し、2分間95℃で加熱した。消化産物を15%ポリアクリルアミド変性ゲル（8 M尿素）を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により全長アプタマーから分離した。電気泳動は、トリスホウ酸緩衝液系中で20分間200 Vで行った。約2 μMのSYBR（登録商標）Gold（Molecular Probes、カタログ番号S1149

4) で10分間ゲルを染色して、バンドを可視化した。FlourChem (登録商標) Q解析ソフトウェア (Alpha Innotech) を使用して、各時点での残存全長アプタマーの量を定量化した。必要に応じて、バックグラウンド除去の後に各バンドの強度を測定し、データを、0時点での全長投入DNAの残存パーセンテージとして示す。3) - 2' - デ - 3) - 2' - デ結合dTの「キャップ」を有するアプタマーの版を含む5) - 2' - デ - ヒドロキシルを、これらの実験に利用した。

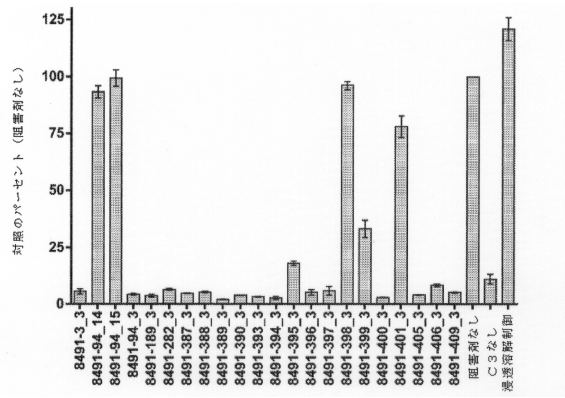
【0182】

DNアーゼIIのアプタマー安定性アッセイの場合、250nMの終濃度のポリアクリルアミドゲル精製アプタマーを、100μLの全反応量で、ヌクレアーゼ緩衝液 (0.1MのNaOAc pH4.6、2.0mMのMgCl₂、15mMのNaCl₂) において37℃で、140ユニット/mLのブタDNアーゼII (Worthington Biochemical Corporation) とともにインキュベートした。様々な時間で、15μLのアリコートを集し、等量の2×ゲルローディング緩衝液 (93.85%ホルムアミド、0.2%SDS、20mMのNa₂EDTA、0.05%キシレンシラノール及び0.1%オレンジG) を添加して反応を停止し、2分間95℃で加熱した。試消化産物は、15%ポリアクリルアミド変性ゲル (8M尿素) を用いて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により全長アプタマーから分離し、電気泳動は、トリスホウ酸EDTA緩衝液系中で20分間200Vで行った。約2μMのSYBR (登録商標) Gold (Molecular Probes、カタログ番号S11494) で10分間ゲルを染色して、バンドを可視化した。FlourChem (登録商標) Q解析ソフトウェア (Alpha Innotech) を使用して、各時点での残存全長アプタマーの量を定量化した。必要に応じて、バックグラウンド除去の後に各バンドの強度を測定し、データを、0時点での全長投入DNAの残存パーセンテージとして示す。3) - 2' - デ - 3) - 2' - デ結合dTの「キャップ」を有するアプタマーの版を含む5) - 2' - デ - ヒドロキシルを、これらの実験に利用した。

【0183】

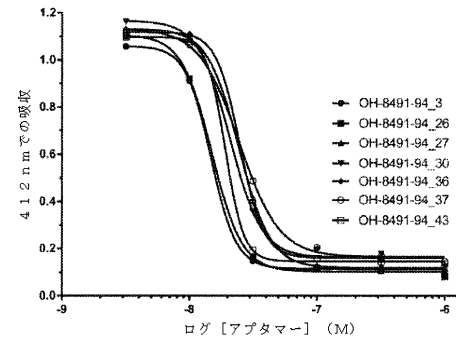
これらのアッセイは、複数の2) - 2' - デ - O - メチル置換を有するアプタマーが、2) - 2' - デ - O - メチル置換を含有するアプタマーの28-merの8491-94__53 (配列番号: 58) と比較してヌクレアーゼ耐性が向上したかどうかを決定するために使用した。8491-94__53における、NapdUヌクレオチド、2) - 2' - デ - OMe置換及び3) - 2' - デ末端での反転デオキシチミジンの添加の使用は、共に、未修飾DNAと比較してかなりの程度のヌクレアーゼ保護を与え得る。それにもかかわらず、8491-94__53は、ヌクレアーゼの存在下で、まだ完全に安定していない。たとえば、8491-94__53 (配列番号: 58) は、ヒト組換えDNアーゼI (図7) 及びブタ膵臓DNアーゼII (図8) により消化することができる。図7に示すように、全長8491-94__53アプタマー (上のバンド) の強度は、2時間かけて約20%の低下、図8では、強度は12時間かけて約75%の低下が、DNアーゼI及びDNアーゼIIによる消化の感受性をそれぞれ示している。複数の2) - 2' - デ - OMe置換を有する4つのアプタマーは、ヌクレアーゼ耐性についても試験した。これらは、8491-94__90 (10__2) - 2' - デ - OMe置換)、8491-94__97 (17__2) - 2' - デ - OMe置換)、8491-94__100 (15__2) - 2' - デ - OMe置換及び3__C3 - スペース置換) 及び8491-94__102 (9__2) - 2' - デ - OMe置換及び3__C3 - スペース置換) である。アプタマーの8491-94__97 (配列番号: 125) 及び8491-94__102 (配列番号: 130) は、DNアーゼIに対する安定性の高さを示し、アプタマーの8491-94__90 (配列番号: 118) 及び8491-94__100 (配列番号: 128) は示さなかった (図7)。アプタマーの8491-94__97 (配列番号: 125) 及び8491-94__100 (配列番号: 128) は、DNアーゼIIに対する安定性の高さを示し、アプタマーの8491-94__90 (配列番号: 118) 及び8491-94__102 (配列番号: 130) は示さなかった (図8)。したがって、アプタマーの8491-94__97 (配列番号: 12

【図4】

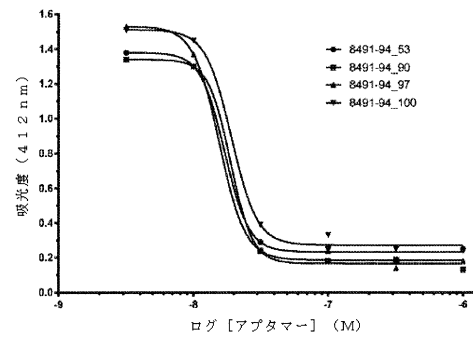


【図5】

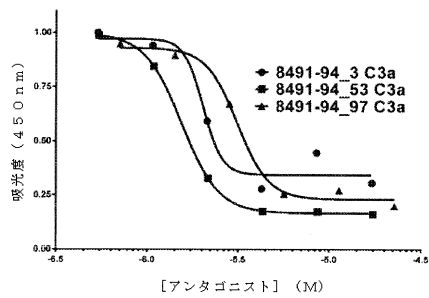
(A)



(B)

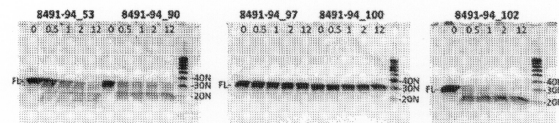


【図6】

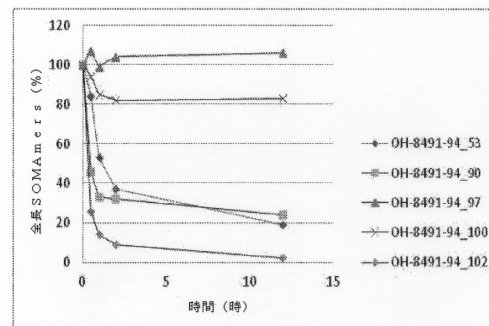


【図8】

(A)

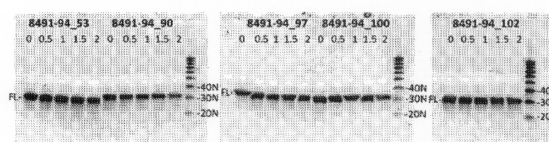


(B)

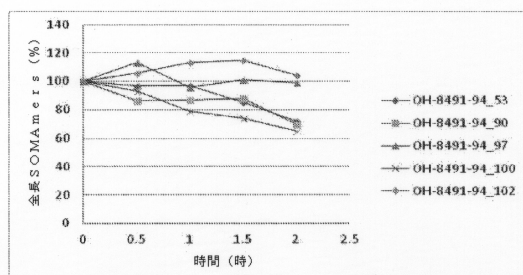


【図7】

(A)



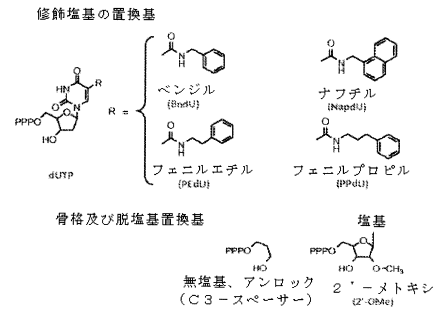
(B)



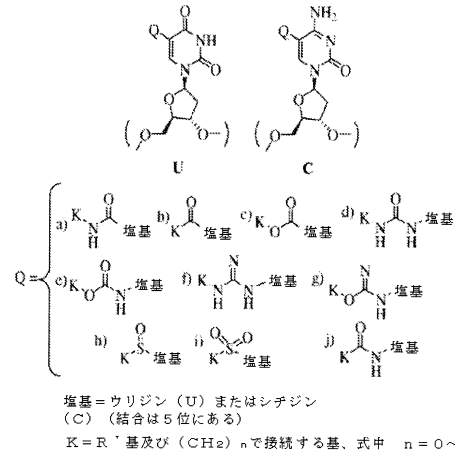
【図 9】

略語	5-d U 修飾	化学構造
Bn	ベンジルメチル	
Nap	1-ナフチルメチル	
PE	2-フェニルエチル	
PP	3-フェニルプロピル	
Ib	イソブチル	
FBn	4-フルオロベンジルメチル	
2Nap	2-ナフチルメチル	
Tyr	チロシル	
NE	1-ナフチルメチル	
MBn	3,4-メチレンジオキシベンジル	
MOE	メルホリノエチル	
BF	3-ベンゾフラニルエチル	
BT	3-ベンゾチオフェニルエチル	
2NE	2-ナフチル-2-エチル	
Trp	3-インドール-2-エチル	

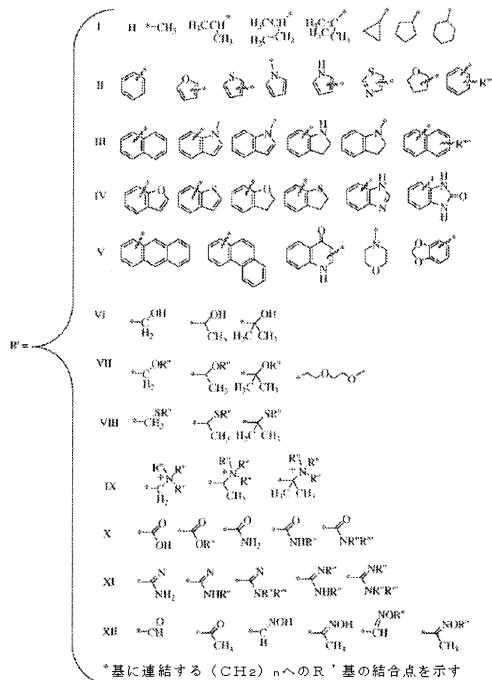
【図 10】



【図 11-1】



【図 11-2】



【図 11-3】

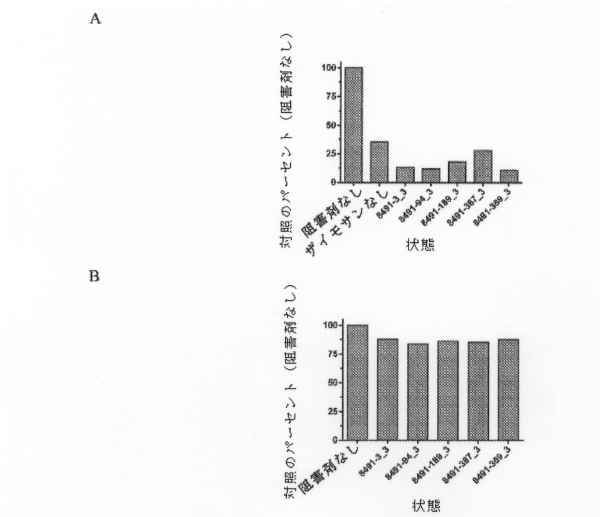
式中、

R' は、分枝状または直鎖状の低級アルキル (C1 ~ C20) ハロゲン (F, Cl, Br, I)、ニトリル (CN) ボロン酸 (BO₂H₂)、カルボン酸 (COOH)、カルボン酸エステル (COOR'), 第一級アミド (CONH₂)、第二級アミド (CONHR'), 第三級アミド (CONR'R'), スルホンアミド (SO₂NH₂)、N-アルキルスルホンアミド (SONHR') からなる基から選択される。

式中、

R', R' は、独立して、分枝状または直鎖状の低級アルキル (C1 ~ C2) フェニル (C₆H₅)、R' 置換されたフェニル環 (R' C₆H₄)、式中、R' は、上記で定義される、カルボン酸 (COOH)、カルボン酸エステル (COOR'), 式中、R' は、分枝または直鎖の低級アルキル (C1 ~ C20) である、及びシクロアルキル、式中、R' = R' = (CH₂)_n、式中、n = 2 ~ 10、からなる基から選択される。

【図 1 2】



【配列表】

0006824041000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)		A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)		A 6 1 P 25/14	
C 1 2 N 15/10 (2006.01)		A 6 1 P 25/16	
		C 1 2 N 15/10	Z

- (72)発明者 チャン チー
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2 9 4 5
- (72)発明者 オコンネル ダニエル ジェイ .
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2 9 4 5
- (72)発明者 グブタ シャシ
 アメリカ合衆国 8 0 3 0 1 コロラド州 ボールダー ワイルダーネス プレイス 2 9 4 5

審査官 星 功介

- (56)参考文献 特表2013-523177(JP,A)
 国際公開第97/042317(WO,A1)
 特表2002-503455(JP,A)
 米国特許出願公開第2002/0082227(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
- JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
 (STN)