

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-506159

(P2019-506159A)

(43) 公表日 平成31年3月7日(2019.3.7)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 N 15/115 (2010.01)	C 12 N 15/115	Z N A Z	4 C O 8 4	
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088		4 C O 8 6	
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1	4 H 0 4 5	
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00			
A 61 P 27/02 (2006.01)	A 61 P 27/02			

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-538551 (P2018-538551)	(71) 出願人	518255101 ヴィトリサ セラピューティクス, イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 949 39, ラークスパー, ラークスパー ランディング サークル 700
(86) (22) 出願日	平成29年1月20日 (2017.1.20)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成30年9月14日 (2018.9.14)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/014458	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 國際公開番号	W02017/127761	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 國際公開日	平成29年7月27日 (2017.7.27)		
(31) 優先権主張番号	62/281,092		
(32) 優先日	平成28年1月20日 (2016.1.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/297,095		
(32) 優先日	平成28年2月18日 (2016.2.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 D因子を阻害するための組成物および方法

(57) 【要約】

本願は、副補体経路の阻害のための方法および組成物を開示する。本方法および組成物は、補体D因子を阻害するためのアプタマーの使用が関与する。本願は、乾性加齢性黄斑変性、地図状萎縮、湿性加齢性黄斑変性またはシュタルガルト病の処置のための抗D因子アプタマーをさらに提供する。一態様では、治療有効量のアプタマーを含む、眼疾患を処置するための医薬組成物であって、アプタマーが、補体D因子に関連する機能を阻害する、医薬組成物が提供される。一部の事例では、アプタマーは、補体D因子に結合する。一部の実例では、アプタマーは、補体D因子の触媒クレフトに結合する。一態様では、治療有効量のアプタマーを含む、眼疾患を処置するための医薬組成物であって、前記アプタマーが、補体D因子に関連する機能を阻害し、前記アプタマーが、補体D因子の活性部位、触媒クレフトまたはエキソサイトに結合する、医薬組成物が提供される。

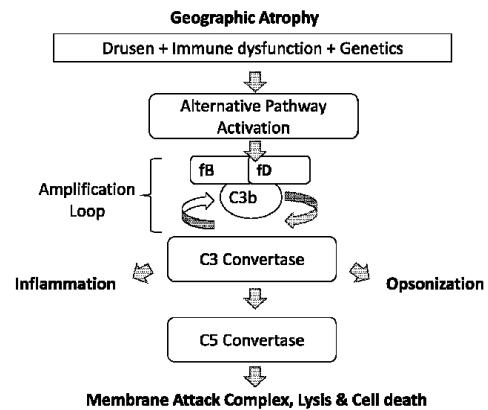


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

補体 D 因子の触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合するアプタマー。

【請求項 2】

前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、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、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識される前記補体 D 因子の領域に結合し、前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

10

【請求項 4】

前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F a b である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記アプタマーが、抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤によって認識される前記補体 D 因子の領域に結合し、前記小分子またはペプチド阻害剤が、補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のアプタマー。

20

【請求項 6】

前記小分子阻害剤が、ジクロロイソクマリンである、請求項 5 に記載のアプタマー。

【請求項 7】

R N A アプタマーまたは修飾 R N A アプタマーである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 8】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 0 n M またはそれ未満の I C₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 9】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 1 0 n M またはそれ未満の I C₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のアプタマー。

30

【請求項 10】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 n M またはそれ未満の I C₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 11】

D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を増加させる、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 12】

D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害する、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 13】

溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性をさらに阻害する、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

40

【請求項 14】

約 5 0 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 15】

約 2 5 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 16】

約 1 0 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載のアプタマー。

50

【請求項 17】

約 5 nM 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 18】

配列番号 73 ~ 80 を含まない、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 19】

補体 D 因子の触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合するアプタマーの治療有効量を対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 20】

前記アプタマーが、補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アプタマーが、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識される前記補体 D 因子の領域に結合し、前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 19 および 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、配列番号 71 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 72 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 fD F ab である、請求項 19 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記アプタマーが、抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤によって認識される前記補体 D 因子の領域に結合し、前記小分子またはペプチド阻害剤が、補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 19 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記小分子阻害剤が、ジクロロイソクマリンである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記アプタマーが、RNA アプタマーまたは修飾 RNA アプタマーである、請求項 19 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記アプタマーが、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 19 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記アプタマーが、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 19 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記アプタマーが、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 19 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記アプタマーが、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を増加させる、請求項 19 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記アプタマーが、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害する、請求項 19 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記アプタマーが、溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性をさらに

10

20

30

40

50

阻害する、請求項 1 9 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記アプタマーが、約 5 0 nM 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記アプタマーが、約 2 5 nM 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 9 から 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記アプタマーが、約 1 0 nM 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 9 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記アプタマーが、約 5 nM 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 1 9 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記アプタマーが、配列番号 7 3 ~ 8 0 を含まない、請求項 1 9 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 0 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、補体 D 因子の機能を阻害するアプタマー。

【請求項 3 8】

触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループにおいて前記補体 D 因子に選択的に結合する、請求項 3 7 に記載のアプタマー。

【請求項 3 9】

前記アプタマーが、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 3 7 および 3 8 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 0】

前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 fD F ab である、請求項 3 7 から 3 9 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 1】

前記アプタマーが、抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記小分子またはペプチド阻害剤が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 3 7 から 4 0 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 2】

前記小分子阻害剤が、ジクロロイソクマリンである、請求項 3 7 から 4 1 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 3】

R N A アプタマーまたは修飾 R N A アプタマーである、請求項 3 7 から 4 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 4】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 1 0 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、前記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 3 7 から 4 3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 5】

C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM またはそれ未満の IC₅₀ で、前

10

20

30

40

50

記補体 D 因子の機能を阻害する、請求項 3 7 から 4 4 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 6】

配列番号 7 3 ~ 8 0 を含まない、請求項 3 7 から 4 5 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 4 7】

D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、i) 対照と比較して、補体 D 因子の活性を増加させる、または ii) 対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害する、アプタマー。

【請求項 4 8】

溶血アッセイによって測定された場合、前記補体 D 因子の活性をさらに阻害する、請求項 4 7 に記載のアプタマー。

【請求項 4 9】

前記補体 D 因子に触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループにおいて選択的に結合する、請求項 4 7 および 4 8 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 0】

前記アプタマーが、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 4 7 から 4 9 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 1】

前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F a b である、請求項 4 7 から 5 0 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 2】

前記アプタマーが、抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 4 7 から 5 1 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 3】

前記小分子阻害剤が、ジクロロイソクマリンである、請求項 4 7 から 5 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 4】

R N A アプタマーまたは修飾 R N A アプタマーである、請求項 4 7 から 5 3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 5】

配列番号 7 3 ~ 8 0 を含まない、請求項 4 7 から 5 4 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 6】

約 5 0 n M 未満の K_d で、補体 D 因子に選択的に結合するアプタマー。

【請求項 5 7】

前記補体 D 因子に触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループにおいて選択的に結合する、請求項 5 6 に記載のアプタマー。

【請求項 5 8】

前記アプタマーが、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 5 6 または 5 7 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 5 9】

前記抗 D 因子抗体またはその抗体断片が、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F a b である、請求項 5 6 から 5 8 のいずれか一項に記載のアプタマー。

10

20

30

40

50

【請求項 6 0】

前記アプタマーが、抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤によって認識される前記補体 D 因子の領域に選択的に結合し、前記抗 D 因子小分子またはペプチド阻害剤が、前記補体 D 因子に関連する機能を阻害する、請求項 5 6 から 5 9 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6 1】

前記小分子阻害剤が、ジクロロイソクマリンである、請求項 5 6 から 6 0 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6 2】

R N A アプタマーまたは修飾 R N A アプタマーである、請求項 5 6 から 6 1 のいずれか一項に記載のアプタマー。 10

【請求項 6 3】

約 2 5 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 5 6 から 6 2 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6 4】

約 1 0 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 5 6 から 6 3 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【請求項 6 5】

約 5 n M 未満の K_d で、補体 D 因子の前記触媒クレフト、エキソサイトまたは自己阻害ループに選択的に結合する、請求項 5 6 から 6 4 のいずれか一項に記載のアプタマー。 20

【請求項 6 6】

配列番号 7 3 ~ 8 0 を含まない、請求項 5 6 から 6 5 のいずれか一項に記載のアプタマー。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****相互参照**

本願は、2016年1月20日に提出された米国仮出願第 6 2 / 2 8 1 , 0 9 2 号および2016年2月18日に提出された 6 2 / 2 9 7 , 0 9 5 号の利益を主張し、それらの出願を参照により本明細書に援用する。 30

【0 0 0 2】**配列表**

本願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出された、その全体を参照により本明細書に組み込む配列表を含有する。2017年1月19日に作成された前記 A S C I I コピーは、4 9 6 4 4 - 7 0 1 _ 6 0 1 _ S L . t x t と命名され、37,821 バイトのサイズである。

【背景技術】**【0 0 0 3】**

視力障害は、肉体的および精神的な健康にマイナスの影響を有する、国家および世界規模の健康上の懸念である。視力障害および失明を患う人の数は、全体的な老齢人口のせいで増加しつつある。視力障害および失明は、あらゆる年代層が罹患する多数の目の疾患および障害のいずれか1種に起因し得る。一例では、加齢性黄斑変性 (A M D) は、現在、先進工業国における50歳またはそれを超える者における視力喪失の主因である、目の障害である。2020年までに、A M D 患者の数が、1億9600万人を超えることが推定され、2040年までに、この数は、2億8800万人に上ると予想される。A M D は、疾患初期から進行期へと進行する目の変性疾患である。この疾患のリスク因子は、加齢、喫煙等の生活習慣因子、および遺伝を含む。A M D への進行の最も明確な指標は、網膜下の黄白色沈着物であるドルーゼンの出現であり、これは、両方の型の A M D : 滲出性 (「湿性」) および非滲出性 (「乾性」) の重要な構成成分である。湿性 A M D は、ブルッフ膜を通る脈絡毛細管における異常血管成長による視力喪失を引き起こす。地図状萎縮と 40

して公知の、最も進行型の乾性AMDは一般に、より漸進的であり、斑状萎縮における感光性細胞が、罹患した目における視覚をばやけさせ視覚を排除すると起こる。現在、湿性AMDにはいくつかの見込みがある処置が存在するが、乾性AMDまたは地図状萎縮には、FDA承認された処置は存在しない。

【0004】

第2の例は、一般に生後二十年以内に中心視の喪失を伴う遺伝的で希少な若年性黄斑ジストロフィーである、シュタルガルト1としても公知の小児期発症シュタルガルト病（「STGD」）である。STGDは、米国においておよそ1/20,000の有病率を有し、およそ30,000名が罹患する。STGDは、多くの年齢が罹患し、小児期発症人口は、最高リスクがあり、最も必要がある。小児期発症STGD患者は、初期重症視力喪失、顕著に損なわれた網膜機能、および急速な網膜色素上皮（RPE）細胞萎縮と付随する網膜機能喪失を発症する傾向がある。発病の年齢中央値およびベースライン試験における年齢中央値は、それぞれ8.5（範囲3～16）および12歳（範囲7～16）である。成人発症疾患患者は、より長い時間視力を保ち、より軽微な網膜機能障害を示す可能性がより高い。STGDは、ABC A4遺伝子における突然変異に起因する、常染色体劣性遺伝疾患または複雑なヘテロ接合性疾患である。ABC A4遺伝子は、光受容体細胞からのオールトランスレチナールの除去の原因となる、光受容体タンパク質ABC A4トランスポーターをコードする。光受容体細胞におけるオールトランスレチナールの蓄積は、酸化ストレスによりRPE細胞を損傷し、RPE細胞への補体媒介性損傷を誘発または促進し、網膜萎縮をもたらすと考えられる。STGD3としても公知の、シュタルガルト様黄斑ジストロフィーと呼ばれる関連疾患は、優性常染色体様式で遺伝し、ELOVL4遺伝子における突然変異によるものである。ELOVL4は、ELOVL脂肪酸エロンガーゼ（elongase）4であるELOVL4タンパク質をコードする。STGDに関連するELOVL4タンパク質における突然変異は、ELOVL4タンパク質のミスフォールディングおよび網膜細胞におけるその凝集体の蓄積をもたらし、これは、網膜細胞機能に影響を与え、最終的に、細胞死および網膜萎縮をもたらす。STGDまたはシュタルガルト様疾患には、処置が存在しない。

10

20

30

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様では、治療有効量のアプタマーを含む、眼疾患を処置するための医薬組成物であって、アプタマーが、補体D因子に関連する機能を阻害する、医薬組成物が提供される。一部の事例では、アプタマーは、補体D因子に結合する。一部の実例では、アプタマーは、補体D因子の触媒クレフトに結合する。一態様では、治療有効量のアプタマーを含む、眼疾患を処置するための医薬組成物であって、前記アプタマーが、補体D因子に関連する機能を阻害し、前記アプタマーが、補体D因子の活性部位、触媒クレフトまたはエキソサイトに結合する、医薬組成物が提供される。

【0006】

一部の実例では、アプタマーは、補体D因子のエキソサイトに結合することができる。一部の事例では、アプタマーは、抗D因子抗体またはその抗体断片によって認識される補体D因子の領域に結合し、抗D因子抗体またはその抗体断片は、補体D因子に関連する機能を阻害する。一部の例では、抗D因子抗体またはその抗体断片は、配列番号71に従った重鎖可変領域および配列番号72に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD

Fab；配列番号85もしくは86に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号87～89に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD Fab；またはMAb 166-32もしくはLS-C135735である。一部の事例では、アプタマーは、抗D因子小分子またはペプチドによって認識される補体D因子の領域に結合し、抗D因子小分子またはペプチドは、補体D因子に関連する機能を阻害する。一部の事例では、小分子は、ジクロロイソクマリン（DIC）または図13A～図13Dに描写されている小分子のいずれか1種である。一部の事例では、領域は、抗D因子抗体またはその抗体断片

40

50

によって認識されるエピトープである。一部の事例では、アブタマーは、RNAアブタマー、修飾RNAアブタマー、DNAアブタマー、修飾DNAアブタマーまたはこれらのいずれかの組合せである。一部の事例では、アブタマーは、高分子量ポリエチレングリコール(PEG)ポリマーにカップリングされている。PEGポリマーは、約10kDa～約80kDaの分子量を有することができる。医薬組成物は、硝子体内投与のために製剤化され得る。医薬組成物は、外用投与のために製剤化され得る。一部の事例では、眼疾患は、黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、乾性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、地図状萎縮である。一部の事例では、眼疾患は、湿性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、シュタルガルト病である。一部の事例では、アブタマーは、ヒトにおける約7日間超の眼中半減期を有する。一部の事例では、アブタマーは、C3溶血アッセイによって測定された場合、約50nMまたはそれ未満のIC₅₀で、補体D因子の機能を阻害する。一部の事例では、アブタマーは、C3溶血アッセイによって測定された場合、約5nMまたはそれ未満のIC₅₀で、補体D因子の機能を阻害する。一部の事例では、アブタマーは、D因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体D因子の活性を増加させ、溶血アッセイによって測定された場合、補体D因子の活性をさらに阻害する。他の事例では、アブタマーは、D因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体D因子の活性を阻害せず、溶血アッセイによって測定された場合、補体D因子の活性を阻害する。一部の事例では、アブタマーは、約50nM未満のK_dで、補体D因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約5nM未満のK_dで、補体D因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約500pM未満のK_dで、補体D因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約50pM未満のK_dで、補体D因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約5pM未満のK_dで、補体D因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約50nM、5nM、50pMまたは5pM未満のK_dで、fDの触媒クレフト、活性部位、エキソサイトおよび/または自己阻害ループに結合する。一部の実例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度でC3、C5、B因子、H因子またはI因子のいずれかに結合するよりも少なくとも10倍大きい特異性で、補体D因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度でC3、C5、B因子、H因子またはI因子のいずれかに結合するよりも少なくとも50倍大きい特異性で、補体D因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度でC3、C5、B因子、H因子またはI因子のいずれかに結合するよりも少なくとも100倍大きい特異性で、補体D因子に結合する。一部の事例では、治療有効量は、片目当たり約25μl～約100μl容量における約0.01mg～約60mgである。一部の事例では、医薬組成物は、4週間に1回の対象への送達のために製剤化される。一部の事例では、医薬組成物は、6週間に1回の対象への送達のために製剤化される。一部の事例では、医薬組成物は、8週間に1回の対象への送達のために製剤化される。一部の事例では、医薬組成物は、10週間に1回の対象への送達のために製剤化される。一部の事例では、医薬組成物は、12週間に1回の対象への送達のために製剤化される。

【0007】

別の態様では、対象における眼疾患を処置するための方法であって、治療有効量のアブタマーを含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、アブタマーが、補体D因子に関連する機能を阻害する、方法が提供される。一部の事例では、アブタマーは、補体D因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、補体D因子の触媒クレフトに結合する。一部の実例では、アブタマーは、補体D因子のエキソサイトに結合する。一部の事例では、アブタマーは、抗D因子抗体またはその抗体断片によって認識される補体D因子の領域に結合し、抗D因子抗体またはその抗体断片は、補体D因子に関連する機能を阻害する。一部の事例では、抗D因子抗体またはその抗体断片は、配列番号71に従った重鎖可変領

10

20

30

40

50

域および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F a b ; または配列番号 8 5 もしくは 8 6 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 8 7 ~ 8 9 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F a b ; または M A b 1 6 6 - 3 2 もしくは L S - C 1 3 5 7 3 5 である。一部の事例では、アブタマーは、抗 D 因子小分子またはペプチドによって認識される補体 D 因子の領域に結合し、抗 D 因子小分子またはペプチドは、補体 D 因子に関連する機能を阻害する。一部の事例では、小分子は、ジクロロイソクマリン (D I C) または図 1 3 A ~ 図 1 3 D に描寫されている小分子のいずれか 1 種である。一部の事例では、領域は、抗 D 因子抗体またはその抗体断片によって認識されるエピトープである。一部の事例では、アブタマーは、R N A アブタマー、修飾 R N A アブタマー、D N A アブタマー、修飾 D N A アブタマーまたはこれらのいずれかの組合せである。一部の事例では、アブタマーは、高分子量ポリエチレングリコール (P E G) ポリマーにカップリングされている。一部の事例では、P E G ポリマーは、約 1 0 k D a ~ 約 8 0 k D a の分子量を有する。一部の事例では、医薬組成物は、硝子体内投与によって投与される。一部の事例では、医薬組成物は、外用投与によって投与される。一部の事例では、眼疾患は、黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、乾性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、地図状萎縮である。一部の事例では、眼疾患は、湿性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、シユタルガルト病である。一部の事例では、アブタマーは、約 7 日間超の眼内半減期を有する。一部の事例では、アブタマーは、C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 0 n M またはそれ未満の I C₅₀ で、補体 D 因子の機能を阻害する。一部の事例では、アブタマーは、C 3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 n M またはそれ未満の I C₅₀ で、補体 D 因子の機能を阻害する。一部の事例では、アブタマーは、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を増加させ、溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性をさらに阻害する。他の事例では、アブタマーは、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害し、溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性をさらに阻害する。さらに他の事例では、アブタマーは、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害せず、溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性を阻害する。一部の実例では、アブタマーは、約 5 0 n M 未満の K_d で、補体 D 因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、約 5 n M 未満の K_d で、補体 D 因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、約 5 0 0 p M 未満の K_d で、補体 D 因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、約 5 0 p M 未満の K_d で、補体 D 因子に結合する。一部の実例では、アブタマーは、約 5 p M 未満の K_d で、補体 D 因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、約 5 0 n M 、 5 n M 、 5 0 p M または 5 p M 未満の K_d で、f D の触媒クレフト、活性部位、エキソサイトおよび / または自己阻害ループに結合する。一部の事例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度で C 3 、 C 5 、 B 因子、 H 因子または I 因子のいずれかに結合するよりも少なくとも 1 0 倍大きい特異性で、補体 D 因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度で C 3 、 C 5 、 B 因子、 H 因子または I 因子のいずれかに結合するよりも少なくとも 5 0 倍大きい特異性で、補体 D 因子に結合する。一部の事例では、アブタマーは、アブタマーが、相対血清濃度で C 3 、 C 5 、 B 因子、 H 因子または I 因子のいずれかに結合するよりも少なくとも 1 0 0 倍大きい特異性で、補体 D 因子に結合する。一部の事例では、治療有効量は、片目当たり約 2 5 μ l ~ 約 1 0 0 μ l 容量における約 0 . 0 1 m g ~ 約 6 0 m g を含む。一部の事例では、医薬組成物は、4 週間に 1 回対象に投与される。一部の事例では、医薬組成物は、6 週間に 1 回対象に投与される。一部の事例では、医薬組成物は、8 週間に 1 回対象に投与される。一部の事例では、医薬組成物は、1 0 週間に 1 回対象に投与される。一部の事例では、医薬組成物は、1 2 週間に 1 回対象に投与される。

参照による援用

【 0 0 0 8 】

10

20

30

40

50

本明細書にて言及されているあらゆる刊行物、特許および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許または特許出願のそれぞれが、参照により本明細書に組み込まれていると特にかつ個々に示されているのと同じ程度まで、参照により本明細書に組み込まれている。

【0009】

添付の特許請求の範囲において、本発明の新規特色を詳細に記す。本発明の特色および利点についてのさらに深い理解は、本発明の原理が利用された説明的な実施形態を記す、次の詳細な説明と、下に説明する添付の図面を参照することにより得られるであろう：

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、副補体経路の一側面を描写する。

10

【0011】

【図2A】図2は、様々なIVT濃度の抗D因子アブタマーによるD因子の硝子体内(IVT)阻害のモデリングを描写する。図2Aおよび図2Bは、様々なIVT濃度の抗D因子アブタマーにおけるD因子のIVT阻害を実証する。Fab(7日間、LUCENTIS(登録商標))およびペグ化アブタマー(10日間、MACUGEN(登録商標))に報告されたIVT半減期、ならびに関連するIVT濃度における各治療法によるD因子の1:1阻害(IC₅₀データ)を仮定する、標準2コンパートメントモデルを使用して、IVT-D因子阻害の有効な阻害をモデリングした。図2Aに描写される通り、抗D因子Fab(破線)、抗D因子アブタマー-VT-001(実線)の、IVT注射後の有効阻害曲線が示され、血清レベルのD因子(点線)による妨害は、臨床的に関連するD因子阻害の喪失の代用として可視化され得る。図2Bは、IVT注射後の週数にわたる、ペグ化アブタマー(点線)および抗D因子抗体(実線)の予測されるIVT薬物濃度(nM)を描写する。

20

【図2B】同上。

【0012】

【図3AB】図3A～図3Cは、本開示の実施形態に従った抗D因子アブタマーの生成に利用することができる、アブタマーライブラー配列の非限定的な例を描写する。図3Aは、配列番号95を開示する。図3Bは、出現順にそれぞれ配列番号95および65を開示する。

30

【図3C】同上。

【0013】

【図4】図4は、本開示の実施形態に従った抗D因子アブタマーを選択するための方法の非限定的な例を描写する。

【0014】

【図5】図5は、本開示の実施形態に従ったフローサイトメトリーによる抗D因子アブタマーの結合解析を描写する。

【0015】

【図6】図6Aおよび図6Bは、本開示の実施形態に従った抗D因子アブタマーのK_d値の測定を描写する。

40

【0016】

【図7】図7は、本開示の実施形態に従った競合アッセイを描写する。

【0017】

【図8】図8は、ヒト補体fDに対するDNAアブタマーの生成において同定された特有の配列のパーセンテージのプロットを描写する。

【0018】

【図9】図9は、ヒト補体fDに対するDNAアブタマーの選択ラウンドにわたる平均塩基頻度のプロットを描写する。

【0019】

【図10】図10は、ヒト補体fDに対するDNAアブタマーの複数の配列アライメントに基づき生成される配列ロゴを描写する。

50

【0020】

【図11】図11は、本開示の実施形態に従った溶血アッセイから得られるデータの例を描寫する。

【0021】

【図12】図12は、本開示の実施形態に従ったfDエステラーゼ活性アッセイから得られるデータの例を描寫する。

【0022】

【図13】図13A～図13Dは、fDの小分子阻害剤の非限定的な例を描寫する。

【0023】

【図14】図14は、ヒト補体D因子のアミノ酸配列、キモトリプシンナンバリングスキームおよびfDナンバリングスキームを描寫する。 10

【発明を実施するための形態】**【0024】**

本明細書における開示は、眼疾患または障害の処置のための方法および組成物を提供する。一部の事例では、眼疾患は、黄斑変性である。一部の事例では、黄斑変性は、加齢性黄斑変性である。一部の事例では、加齢性黄斑変性は、乾性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、乾性加齢性黄斑変性は、進行型乾性加齢性黄斑変性（すなわち、地図状萎縮）である。一部の事例では、眼疾患は、湿性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、眼疾患は、シユタルガルト病である。一部の事例では、方法および組成物は、副補体経路の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、D因子（fD）に関連する機能の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、眼疾患の処置のための、fDに関連する機能の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、乾性加齢性黄斑変性または地図状萎縮の処置のための、fDに関連する機能の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、湿性加齢性黄斑変性の処置のための、fDに関連する機能の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、シユタルガルト病の処置のための、fDに関連する機能の阻害が関与する。一部の事例では、方法および組成物は、抗fDアプタマーの使用を含む。 20

【0025】

本明細書に開示されている一部の実施形態の実施は、他に断りがなければ、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスおよび組換えDNAの従来技法を当業者の技能範囲内で用いる。例えば、SambrookおよびGreen、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版（2012年）；Current Protocols in Molecular Biologyシリーズ（F. M. Ausubelら編）；Methods In Enzymologyシリーズ（Academic Press, Inc.）、PCR 2: A Practical Approach（M. J. MacPherson, B. D. HamesおよびG. R. Taylor編（1995年））、HarrowおよびLane編（1988年）Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications、第6版（R. I. Freshney編（2010年））を参照されたい。 30 40

【0026】

一般に、「配列同一性」は、それぞれ2種のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の一一致を指す。典型的には、配列同一性を決定するための技法は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定する、および／またはこれにコードされるアミノ酸配列を決定し、これらの配列を第2のヌクレオチドまたはアミノ酸配列と比較するステップを含む。2種またはそれよりも多い配列（ポリヌクレオチドまたはアミノ酸）は、その「パーセント同一性」を決定することにより比較することができる。核酸であれアミノ酸配列であれ、2種の配列のパーセント同 50

一性は、短い方の配列の長さで割り、100を掛けた、2種の整列された配列の間の正確なマッチの数である。パーセント同一性は、例えば、国立衛生研究所(National Institutes of Health)から入手できる、バージョン2.2.9を含む先進BLASTコンピュータプログラムを使用して、配列情報を比較することにより決定することもできる。BLASTプログラムは、KarlinsおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻: 2264~2268頁(1990年)のアライメント方法に基づき、Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻: 403~410頁(1990年); KarlinsおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻: 5873~5877頁(1993年);ならびにAltschulら、Nucleic Acids Res. 25巻: 3389~3402頁(1997年)に記述されている通りである。手短に説明すると、BLASTプログラムは、2種の配列のうち短い方における記号の総数で割った、同一の整列された記号(一般にヌクレオチドまたはアミノ酸)の数として同一性を規定する。プログラムを使用して、比較されているタンパク質の長さ全体にわたるパーセント同一性を決定することができる。例えば、blastpプログラムによる短い問い合わせ配列による検索を最適化するためのデフォルトパラメータが提供される。プログラムは、WoottonおよびFederhen、Computers and Chemistry 17巻: 149~163頁(1993年)のSEGプログラムによって決定される通り、問い合わせ配列のセグメントのマスクを外す(mask-off)ためのSEGフィルターの使用も可能にする。所望の程度の配列同一性の範囲は、およそ80%~100%およびその間の整数値である。典型的には、開示されている配列および特許請求されている配列の間のパーセント同一性は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも98%である。

【0027】

用語「ペプチド」および「タンパク質」は、いずれかの長さのアミノ酸のポリマーを指すように本明細書において互換的に使用されている。ポリペプチドは、いずれかのタンパク質、ペプチド、タンパク質断片またはその構成成分となることができる。ポリペプチドは、自然において天然起源のタンパク質、または通常自然において存在しないタンパク質となることができる。ポリペプチドは、大部分は、標準的な20種のタンパク質構築アミノ酸からなることができる、または非標準アミノ酸を取り込むように修飾されていてよい。ポリペプチドは、典型的には、宿主細胞によって、例えば、リン酸化、アセチル化、アシル化、ホルミル化、アルキル化、メチル化、脂質付加(例えば、パルミトイ化、ミリストイル化、ブレニル化等)および炭水化物付加(例えば、N結合型およびO結合型グリコシリ化等)を含む、いずれかの数の生化学的官能基を付加することにより修飾されていてよい。ポリペプチドは、ジスルフィド架橋の形成またはタンパク質分解性切断等、宿主細胞において構造変化を起こすことができる。本明細書に記載されているペプチドは、例えば、疾患の処置に利用される治療用ペプチドとなることができる。

【0028】

用語「アブタマー」は、本明細書において、特異的標的分子に結合することができる、オリゴヌクレオチドおよび/または核酸アナログを指す。アブタマーは、RNA、DNA、いずれかの核酸アナログおよび/またはこれらの組合せを含むことができる。アブタマーは、一本鎖オリゴヌクレオチドとなることができる。理論に制約されることは望まないが、アブタマーは、標的分子の三次元構造に結合すると考えられる。アブタマーは、単量体(单一の単位で構成される)または多量体(複数の単位で構成される)となることができる。多量体アブタマーは、ホモマー(複数の同一単位で構成される)またはヘテロマー(複数の非同一単位で構成される)となることができる。

【0029】

用語「エキソサイト」は、本明細書において、別のタンパク質に結合することができるタンパク質ドメインまたはタンパク質の領域を指すことができる。エキソサイトは、本明細書において、「二次結合部位」、例えば、一次結合部位(例えば、活性部位)から遠隔

10

20

30

30

40

50

のまたはそれから離れた結合部位と称することもできる。一部の事例では、一次および二次結合部位は、重複し得る。エキソサイトへの分子の結合は、タンパク質に物理的変化（例えば、立体構造変化）を引き起こすことができる。一部の事例では、タンパク質の活性は、エキソサイトの占有に依存し得る。一部の例では、エキソサイトは、アロステリック部位とは別個のものとなり得る。

【0030】

用語「触媒クレフト」または「活性部位」は、本明細書において、基質分子が結合し、化学反応を起こす、酵素のドメインを指す。活性部位は、基質と一時的結合を形成するアミノ酸残基（例えば、結合部位）、および該基質の反応を触媒するアミノ酸残基（例えば、触媒部位）を含むことができる。活性部位は、酵素内の深いトンネルまたは多量体酵素の界面間に位置することができる、酵素の溝またはポケット（例えば、クレフト）となることができる。10

【0031】

用語「エピトープ」は、本明細書において、抗体によって特異的に認識される抗原（例えば、それに対する抗体を生成するように免疫系を刺激する物質）の部分を指す。一部の事例では、抗原は、タンパク質またはペプチドであり、エピトープは、抗体によって認識および結合されるタンパク質またはペプチドの特異的領域である。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、抗 f D 抗体またはその抗体断片に対するエピトープである f D の領域に結合し、抗 f D 抗体は、f D に関連する機能を阻害する。一部の事例では、f D のアプタマー結合領域は、抗 f D 抗体に対するエピトープまたは別の f D 阻害分子の結合部位の少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または 100% と重複する。20

【0032】

用語「対象」および「患者」は、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトを指すように本明細書において互換的に使用されている。哺乳動物として、マウス、サル、ヒト、家畜、競技用動物およびペットが挙げられるがこれらに限定されない。in vivo で得られるまたは in vitro で培養される生物学的実体の組織、細胞およびその後代も包含される。30

補体系および副補体経路

【0033】

補体系は、生物から病原体を排除する抗体および貪食細胞の能力を増強する自然免疫系の一部である。この系は、適応不能であり、個体の生涯の経過にわたって変化しないが、リクルートされ、適応免疫系によって作用され得る。

【0034】

補体系は、血液中に存在し、肝臓によって一般に合成され、正常では不活性前駆体（プロタンパク質）として循環する、いくつかの小型のタンパク質からなる。いくつかの誘発のうち 1 種によって刺激されると、この系におけるプロテアーゼは、特異的タンパク質を切断して、サイトカインを放出し、さらなる切断の増幅カスケードを惹起する。この補体活性化または補体固定化カスケードの最終結果は、応答の大量増幅および細胞を死滅させる膜侵襲複合体の活性化である。血清タンパク質、漿膜タンパク質および細胞膜受容体を含む、30 種を超えるタンパク質およびタンパク質断片が、補体系を構成する。40

【0035】

副補体経路は、補体系活性化および増幅のための急速な抗体非依存性経路である。副経路は、いくつかの構成成分を含む：C3、B 因子（f B）および f D。副経路の活性化は、C3 のタンパク質分解性切断型である C3b が、細菌等の活性化表面剤に結合されると起こる。続いて、f B が、C3b に結合され、f D によって切断されて、C3 コンバター ゼ C3bBb を生じる。追加的な C3b が产生および沈着されると、C3 コンバター ゼ活性の増幅が起こる。増幅応答は、分解から活性コンバター ゼを安定化し、その半減期を 1 ~ 2 分間から 18 分間へと延長する、正の調節因子タンパク質プロバージン（P 因子）の結合によってさらに助けられる。50

【0036】

C3コンバターゼは、C5コンバターゼ(C3b3bBb)へとさらにアセンブルする。この複合体はその後、補体構成成分C5を2個の構成成分：C5aポリペプチド(9kDa)およびC5bポリペプチド(170kDa)へと切断する。C5aポリペプチドは、本来白血球に関連付けられており、現在は肝細胞およびニューロンを含む種々の組織に発現されることが公知の、7回膜貫通Gタンパク質共役受容体に結合する。C5a分子は、ヒト補体系の主要走化性構成成分であり、白血球走化性、平滑筋収縮、細胞内シグナル伝達経路の活性化、好中球・内皮接着、サイトカインおよび脂質メディエーター放出ならびに酸化体形成を含む、種々の生物学的応答を誘発することができる。

【0037】

副補体経路は、加齢性黄斑変性、地図状萎縮、シュタルガルト病、全身性エリテマトーデス、関節リウマチおよび喘息を含む、種々の虚血性、炎症性および自己免疫性疾患の病態形成における役割を果たすと考えられる。よって、副補体経路の構成成分は、これらの疾患の処置のための重要な標的となり得る。

加齢性黄斑変性

【0038】

加齢性黄斑変性(「AMD」)は、米国、欧洲および日本における回復不能な視力喪失の主因である、慢性かつ進行性の目の疾患である。AMDは、斑と称される、網膜の中心部の進行性増悪によって特徴付けられる。AMDへの進行の最も明確な指標は、網膜細胞の代謝性老廃物に由来する材料のラークである、網膜下の黄白色沈着物であるドルーゼンの出現である。ドルーゼンの出現は、両方の型のAMD：滲出性(「湿性」)および非滲出性(「乾性」)の重要な構成成分である。多数の中間～大型のドルーゼンの存在は、地図状萎縮および/または新血管新生によって特徴付けられる、後期疾患への進行の最大リスクに関連する。湿性AMD患者の大部分は、疾患診断後数ヶ月から2年間以内に、罹患した目における重症視力喪失を経験するが、視力喪失は、数時間または数日間以内に起こり得る。乾性AMDは、より漸進的であり、斑における感光性細胞が徐々に萎縮すると起こり、罹患した目における中心視を漸進的にぼやけさせる。視力喪失は、ドルーゼンの形成および蓄積、場合により、網膜の増悪によって悪化されるが、異常な血管成長および出血を伴わない。地図状萎縮は、進行型乾性AMDを指すために使用される用語である。地図状萎縮は、萎縮した光受容体細胞の「島(island)」によって特徴付けられる。副補体経路が、AMDの病態形成における役割を果たし得ることが考えられる。

シュタルガルト病

【0039】

シュタルガルト病(「STGD」)は、米国においておよそ30,000個体が罹患する、1/20,000の発生率による、希少な遺伝的黄斑ジストロフィーである。STGDは、ABC A4遺伝子における突然変異に起因する、常染色体劣性または複雑なヘテロ接合性遺伝疾患である。ABC A4遺伝子は、光受容体細胞からのオールトランスレチナールの除去の原因となる、光受容体タンパク質ABC A4トランスポーターをコードする。光受容体細胞におけるオールトランスレチナールの蓄積は、酸化ストレスによりRPE細胞を損傷し、RPE細胞に対する補体媒介性損傷を誘発または促進し、網膜萎縮をもたらすと考えられる。STGDは、一般に生後二十年以内に始まる、斑と称される、網膜の中心部の進行性増悪によって特徴付けられる。STGDの進行の最も明確な指標は、オールトランスレチナールおよび他のビタミンA関連代謝物を含む網膜細胞の代謝性老廃物に由来する材料のラークである、網膜下の黄白色沈着物であるドルーゼンの出現である。STGDの発病は典型的に、6～20歳の間であり、初期症状は、読字および光調整の困難を含む。小児期発症STGD患者は、初期重症視力喪失、顕著に損なわれた網膜機能および急速な網膜色素上皮(RPE)細胞萎縮と付随する網膜機能喪失を発症する傾向がある。発病の年齢中央値およびベースライン試験における年齢中央値は、それぞれ8.5(範囲3～16)および12歳(範囲7～16)である。成人発症疾患患者は、より長い時間視力を保ち、より軽微な網膜機能障害を示す可能性がより高い。光受容体細胞における

10

20

30

40

50

オールトランスレチナールの蓄積は、炎症、酸化ストレス、網膜色素上皮における自家蛍光リポフスチン色素の沈着、および網膜萎縮をもたらす。リポフスチン沈着物（ドルーゼン）および酸化産物は、細胞死をもたらす炎症性応答へと副補体経路を誘発する。S T G Dにおける副補体の役割を支持するデータは、ヒト細胞モデル、遺伝的マウスモデル、および疾患進行中のヒトのドルーゼンにおける補体因子の蓄積を含む。したがって、補体、特に、補体D因子の阻害剤は、S T G D個体における視力喪失の進行を停止するまたは遅くすることが予期される。S T G D 3としても公知のシュタルガルト様黄斑ジストロフィーと呼ばれる関連疾患は、優性常染色体様式で遺伝し、E L O V L 4 遺伝子における突然変異によるものである。E L O V L 4 は、E L O V L 脂肪酸エロンガーゼ4であるE L O V L 4タンパク質をコードする。S T G Dに関連するE L O V L 4タンパク質における突然変異は、E L O V L 4タンパク質のミスフォールディングおよび網膜細胞におけるE L O V L 4タンパク質凝集体の蓄積をもたらし、これは、網膜細胞機能に影響を与え、最終的に、細胞死および網膜萎縮をもたらす。補体経路活性化は、シュタルガルト様疾患における役割を果たすとも考えられ、したがって、補体、特に、補体D因子の阻害剤は、シュタルガルト様疾患個体における視力喪失の進行を停止するまたは遅くすることが予期される。

アブタマー

【0040】

一部の事例では、本明細書に記載されている方法および組成物は、眼疾患の処置のための1種または複数のアブタマーを利用する。アブタマーという用語は、本明細書において、非ワトソン・クリック塩基対形成相互作用を介して高い親和性および特異性で標的（例えば、タンパク質）に結合するオリゴヌクレオチド分子を指す。一般に、本明細書に記載されているアブタマーは、障害または疾患の処置のために単離および使用される、非天然起源のオリゴヌクレオチド（すなわち、合成により產生された）である。アブタマーは、タンパク質、オリゴヌクレオチド、炭水化物、脂質、小分子さらには細菌細胞を限定することなく含む、基本的にいかなる標的分子にも結合することができる。本明細書に記載されているアブタマーは、副補体経路のタンパク質に結合するオリゴヌクレオチドである。m R N A等、多くの天然起源のオリゴヌクレオチドが、その線形塩基配列に情報をコードする一方、標的分子へのアブタマーの結合が、保存された線形塩基配列よりもアブタマーの二次および三次構造に依存し、アブタマーが一般に、その線形塩基配列に情報をコードしないという点において、アブタマーは、そのような天然起源のオリゴヌクレオチドから区別することができる。

【0041】

アブタマーは、治療剤として適することができ、他の治療剤よりも好ましくなることができ、その理由として次のことが挙げられる：1)アブタマーは、完全にin vitroプロセスによって開発することができるため、アブタマーの產生は迅速かつ経済的となることができ；2)アブタマーは、低い毒性を有することができ、免疫原性応答を欠くことができ；3)アブタマーは、その標的に対し高い特異性および親和性を有することができ；4)アブタマーは、優れた溶解性を有することができ；5)アブタマーは、調節可能な薬物動態特性を有し；6)アブタマーは、P E Gおよび他の担体の部位特異的コンジュゲーションを受け入れられ；7)アブタマーは、外界温度で安定することができる。

【0042】

本明細書に記載されているアブタマーは、アブタマーの機能または親和性に影響を与えることができる、いずれかの数の修飾を含むことができる。例えば、アブタマーは、修飾されていないくてよい、または安定性、ヌクレアーゼ抵抗性または送達特徴を改善するために修飾ヌクレオチドを含有することができる。斯かる修飾の例として、糖および/またはリン酸および/または塩基位置、例えば、リボースの2'位、ピリミジンの5位およびプリンの8位における化学的置換、様々な2'修飾ピリミジン、ならびに2' - アミノ(2' - N H₂)、2' - フルオロ(2' - F)および/または2' - O - メチル(2' - O M e)置換基による修飾を挙げることができる。一部の事例では、本明細書に記載されて

10

20

30

40

50

シウリジン(M P E d U) ; 4 - ピリジニルメチル - 2 ' - デオキシウリジン(Pyrd U) ; または 1 - ベンズイミダゾール - 2 - エチル - 2 ' - デオキシウリジン(Bid U) ; 5 - (アミノ - 1 - プロペニル) - 2 ' - デオキシウリジン ; 5 - (インドール - 3 - アセトアミド - 1 - プロペニル) - 2 ' - デオキシウリジン ; または 5 - (4 - ピバロイルベンズアミド - 1 - プロペニル) - 2 ' - デオキシウリジンを生成することができる。

【 0 0 4 3 】

本開示において企図されるアプタマーの修飾は、核酸アプタマー塩基にまたは全体としての核酸アプタマーに、追加的な電荷、分極率、疎水性、水素結合、静電相互作用および官能性を取り込む他の化学基を提供する修飾を限定することなく含む。スクレアーゼに対し抵抗性であるオリゴスクレオチド集団を生成するための修飾は、1個または複数の置換、スクレオチド間連結、変更された糖、変更された塩基またはこれらの組合せを含むこともできる。斯かる修飾として、2'位糖修飾、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、環外アミンにおける修飾、4 - チオウリジンの置換、5 - ブロモまたは5 - ヨード - ウラシルの置換；骨格修飾、ホスホロチオエートまたはアルキルリン酸修飾、メチル化、ならびにイソ塩基であるイソシチジンおよびイソグアノシン等の珍しい塩基対形成組合せが挙げられるがこれらに限定されない。修飾は、キャッピング、例えば、エキソスクレアーゼ抵抗性を増加させるための3' - 3' - d T キャップの付加等、3' および 5' 修飾を含むこともできる。

10

【 0 0 4 4 】

アプタマーの長さは、可変的となることができる。一部の事例では、アプタマーの長さは、100スクレオチド未満である。一部の事例では、アプタマーの長さは、10スクレオチドを超える。一部の事例では、アプタマーの長さは、10 ~ 90スクレオチドの間である。アプタマーは、限定することなく、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85または約90スクレオチドの長さとなることができる。

20

【 0 0 4 5 】

一部の実例では、ポリエチレングリコール(P E G)ポリマー鎖が、アプタマーに共有結合により結合され、これは、本明細書において、ペグ化と称される。理論に制約されることはないが、ペグ化は、生理的条件でのアプタマーの半減期および安定性を増加させることができる。一部の事例では、P E Gポリマーは、アプタマーの5'端に共有結合により結合される。一部の事例では、P E Gポリマーは、アプタマーの3'端に共有結合により結合される。一部の事例では、P E Gポリマーは、ピリミジンの5位またはプリンの8位を含む、アプタマー内の核酸塩基における特異的部位に共有結合により結合される。

30

【 0 0 4 6 】

一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、一般式、H - (O - C H₂ - C H₂)_n - O H を有するP E Gにコンジュゲートされ得る。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、一般式、C H₃ O - (C H₂ - C H₂ - O)_n - H のメトキシ - P E G (m P E G)にコンジュゲートされ得る。一部の事例では、アプタマーは、直鎖P E Gまたはm P E Gにコンジュゲートされる。直鎖P E Gまたはm P E Gは、最大約30kDの平均分子量を有することができる。複数の直鎖P E Gまたはm P E Gを、一般的な反応基に連結して、多腕または分枝状P E Gまたはm P E Gを形成することができる。例えば、2個以上のP E Gまたはm P E Gを、アミノ酸リンカー(例えば、リシン)またはグリセリン等の別のリンカーを介して一体に連結することができる。一部の事例では、アプタマーは、分枝状P E Gまたは分枝状m P E Gにコンジュゲートされる。分枝状P E Gまたはm P E Gは、その総質量によって参照され得る(例えば、2個の連結された20kD m P E Gは、40kDの総分子量を有する)。分枝状P E Gまたはm P E Gは、3本以上の腕を有することができる。多腕分枝状P E Gまたはm P E Gは、その総質量によって参照され得る(例えば、4個の連結された10kD m P E Gは、40kD 40

40

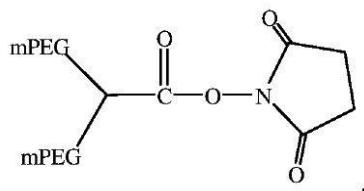
50

の総分子量を有する)。一部の事例では、本開示のアプタマーは、約 5 kD ~ 約 200 kD、例えば、約 5 kD、約 10 kD、約 20 kD、約 30 kD、約 40 kD、約 50 kD、約 60 kD、約 70 kD、約 80 kD、約 90 kD、約 100 kD、約 110 kD、約 120 kD、約 130 kD、約 140 kD、約 150 kD、約 160 kD、約 170 kD、約 180 kD、約 190 kD または約 200 kD の総分子量を有する PEG ポリマーにコンジュゲートされる。非限定的な一例では、アプタマーは、約 40 kD の総分子量を有する PEG にコンジュゲートされる。

【0047】

一部の事例では、ペグ化アプタマーの生成に使用することができる試薬は、20 kD、40 kD または 60 kD 総分子量を有する、一般式：

【化1】

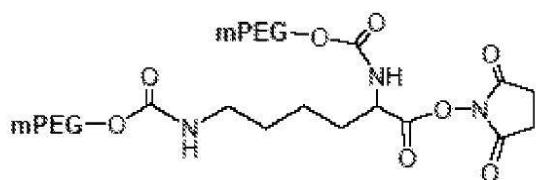


(例えば、式中、各 mPEG は、約 10 kD、20 kD または約 30 kD である) を有する分枝状 PEG-N-ヒドロキシサクシニミド (mPEG-NHS) である。上述の通り、分枝状 PEG は、アミノ酸 (例えば、リシンまたはグリシン残基) 等、いずれか適切な試薬を介して連結され得る。

【0048】

非限定的な一例では、ペグ化アプタマーの生成に使用される試薬は、式：

【化2】

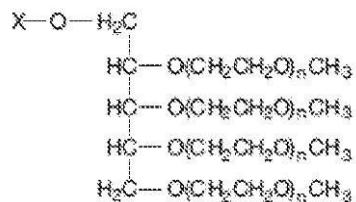


を有する [N²- (モノメトキシ 20 K ポリエチレングリコールカルバモイル) - N⁶- (モノメトキシ 20 K ポリエチレングリコールカルバモイル)] - リシン N - ヒドロキシサクシニミドである。

【0049】

さらに別の非限定的な例では、ペグ化アプタマーの生成に使用される試薬は、式：

【化3】



(式中、X は、N - ヒドロキシサクシニミドであり、PEG 腕は、およそ均等な分子量のものである) を有する。斯かる PEG 構造物は、2 腕または単腕直鎖状 PEG にコンジュゲートされた同様のアプタマーと比較して低下した粘性を有する化合物を提供することができる。

【0050】

一部の例では、ペグ化アプタマーの生成に使用される試薬は、式：

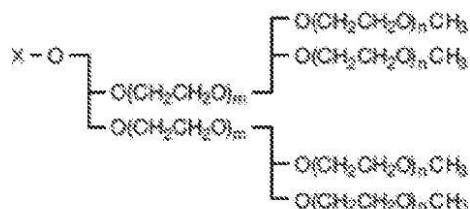
10

20

30

40

【化4】



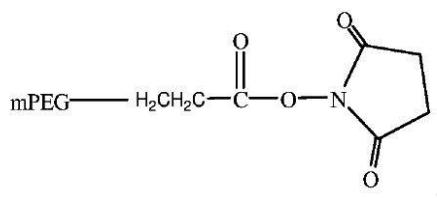
(式中、Xは、N-ヒドロキシサクシニミドであり、PEG腕は、異なる分子量のものである、例えば、この構造物の40kD PEGは、5kDの2本の腕および7.5kDの4本の腕で構成され得る)を有する。斯かるPEG構造物は、2腕PEGまたは単腕直鎖状PEGにコンジュゲートされた同様のアプタマーと比較して、低下した粘性を有する化合物を提供することができる。

10

【0051】

一部の事例では、ペグ化アプタマーの生成に使用することができる試薬は、一般式：

【化5】



20

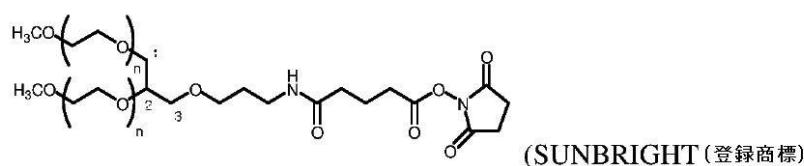
(式中、mPEGは、約20kDまたは約30kDである)を有する非分枝状mPEG-サクシニミルプロピオネート(mPEG-SPA)である。一例では、反応性エステルは、-O-CH₂-CH₂-CO₂-NHSとなることができる。

【0052】

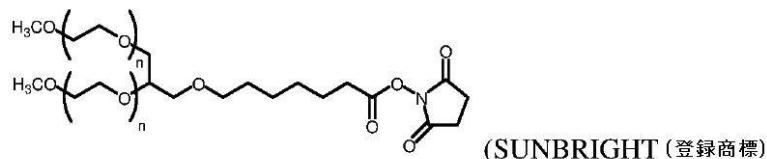
一部の実例では、ペグ化アプタマーの生成に使用することができる試薬は、NOF Corporation、Japan製のSunbright(商標)シリーズ等、グリセロールにより連結された分枝状PEGを含むことができる。これらの試薬の非限定的な例として、次のものが挙げられる：

30

【化6】



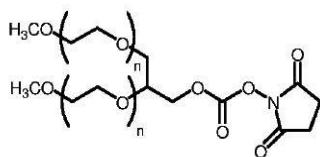
GL2-400GS2);



40

GL2-400HS); および

【化7】



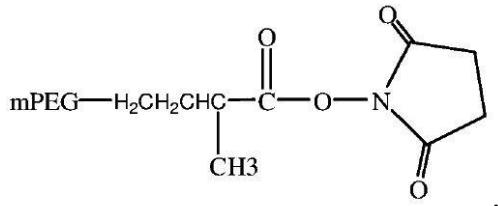
(SUNBRIGHT(登録商標)GL2-400TS).

【0053】

別の例では、試薬は、一般式：

10

【化8】



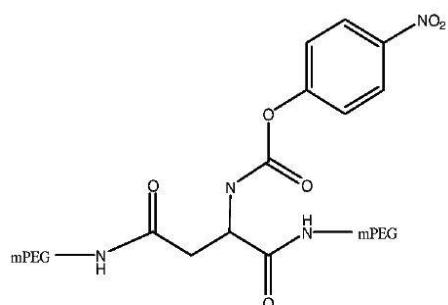
(式中、mPEGは、10～30kDの間である)を有する非分枝状mPEGサクシニミジルアルファ-メチルブタノエート(mPEG-SMB)を含むことができる。一例では、反応性エステルは、-O-CH₂-CH₂-CH(CH₃)-CO₂-NHSとなることができる。

20

【0054】

他の実例では、PEG試薬は、一般式：

【化9】



30

を有するニトロフェニルカーボネート連結されたPEGを含むことができる。

【0055】

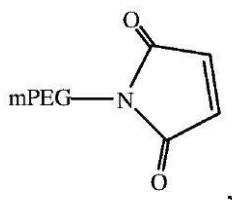
ニトロフェニルカーボネートを含む化合物は、一级アミン含有リンカーにコンジュゲートされ得る。

【0056】

一部の事例では、ペグ化アプタマーの生成に使用される試薬は、チオール修飾リンカーと共に使用することができる、チオール-反応基を有するPEGを含むことができる。非限定的な一例として、次の一般構造：

40

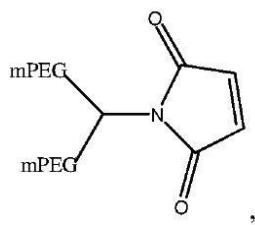
【化10】



(式中、mPEGは、約10kD、約20kDまたは約30kDである)を有する試薬を挙げることができる。別の非限定的な例として、次の一般構造：

50

【化11】



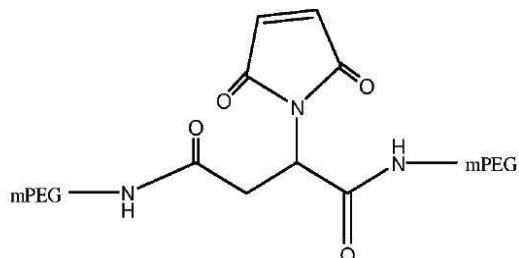
(式中、各 m P E G は、約 1 0 k D 、約 2 0 k D または約 3 0 k D であり、総分子量は、それぞれ約 2 0 k D 、約 4 0 k D または約 6 0 k D である) を有する試薬を挙げることができる。上述の通り、チオール修飾リンカーと共に使用することができるチオール反応基を有する分枝状 P E G は、分枝状 P E G が約 4 0 k D または約 6 0 k D の総分子量を有する(例えば、各 m P E G が約 2 0 k D または約 3 0 k D である) 試薬を含むことができる。

10

【0057】

一部の事例では、ペグ化アプタマーの生成に使用される試薬は、次の構造：

【化12】



20

を有する試薬を含むことができる。一部の事例では、反応は、約 p H 6 ~ 約 p H 1 0 の間で、または約 p H 7 ~ p H 9 の間でまたは約 p H 8 で行われる。

【0058】

一部の事例では、アプタマーは、単一の P E G 分子に会合される。他の事例では、アプタマーは、2 個またはそれよりも多い P E G 分子に会合される。

30

【0059】

一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、所望の生物学的特性を有する1個または複数の分子に結合またはコンジュゲートされ得る。いかなる数の分子も、アプタマーに結合またはコンジュゲートされてよく、非限定的な例として、抗体、ペプチド、タンパク質、炭水化物、酵素、ポリマー、薬物、小分子、金ナノ粒子、放射標識、蛍光標識、色素、ハプテン(例えば、ビオチン)、他のアプタマーまたは核酸(例えば、s i R N A)が挙げられる。一部の事例では、アプタマーは、アプタマーの安定性、溶解性またはバイオアベイラビリティを増加させる分子にコンジュゲートされ得る。非限定的な例として、ポリエチレングリコール(P E G)ポリマー、炭水化物および脂肪酸が挙げられる。一部の事例では、細胞浸透ペプチド等、アプタマーの輸送または送達を改善する分子を使用することができる。細胞浸透ペプチドの非限定的な例として、T a t に由来するペプチド、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチドA r g₈配列(配列番号90)、トランスポータン、単純ヘルペスウイルス(H S V)由来のV P 2 2 タンパク質、B u f o r i n I およびS y n B 等の抗菌ペプチド、ポリプロリンスイートアローペプチド分子、P e p - 1 およびM P G を挙げることができる。一部の実施形態では、アプタマーは、コレステロール、ジアルキルグリセロール、ジアシルグリセロール等の親油性化合物、またはポリエチレングリコール(P E G)等の非免疫原性高分子量化合物もしくはポリマー、またはポリアミノアミン(P A M A M)およびデキストランもしくはポリオキサゾリン(P O Z)等の多糖が挙げられるがこれらに限定されない、他の水溶性の薬学的に許容される

40

50

ポリマーにコンジュゲートされる。

【0060】

コンジュゲートされるべき分子は、目的のアプタマーと共有結合により結合され得るまたは非共有結合相互作用により会合され得る。一例では、コンジュゲートされるべき分子は、アプタマーに共有結合により取り付けられる。共有結合による取り付けは、アプタマーにおける種々の位置で、例えば、塩基における環外アミノ基、ピリミジンヌクレオチドの5位、プリンヌクレオチドの8位、リン酸のヒドロキシル基、または5'もしくは3'末端におけるヒドロキシル基もしくは他の基に起こることができる。一例では、共有結合による取り付けは、アプタマーの5'または3'ヒドロキシル基に為される。

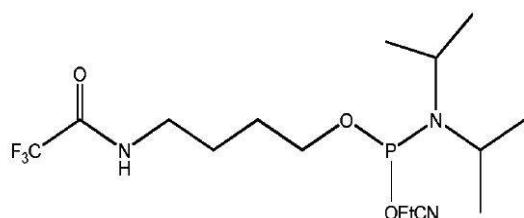
10

【0061】

一部の事例では、アプタマーは、直接的に、またはスペーサーもしくはリンカーの使用により、別の分子に取り付けることができる。例えば、親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物は、リンカーまたはスペーサーを使用して、アプタマーに取り付けることができる。様々なリンカーおよび取り付けのための化学が、本技術分野で公知である。非限定的な例では、6-(トリフルオロアセトアミド)ヘキサノール(2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピル)ホスホラミダイトを使用して、合成されたアプタマーの5'端にヘキシルアミノリンカーを附加することができる。このリンカーは、本明細書に提供されている他のアミノリンカーと同様に、アミンを保護する基が除去されると、PEG-NSエステルと反応されて、共有結合により連結されたPEG-アプタマーを产生することができる。リンカーホスホラミダイトの他の非限定的な例として、構造：

20

【化13】



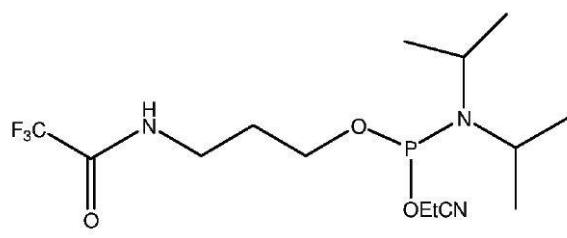
■

を有するTFA-アミノC4CEDホスホラミダイト；

30

構造：

【化14】



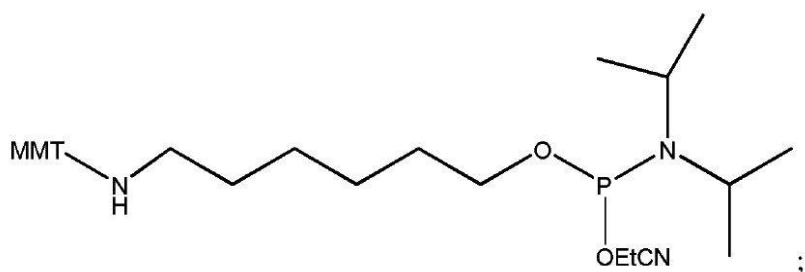
;

を有する5'-アミノ修飾因子C3TFA；

40

構造：

【化15】



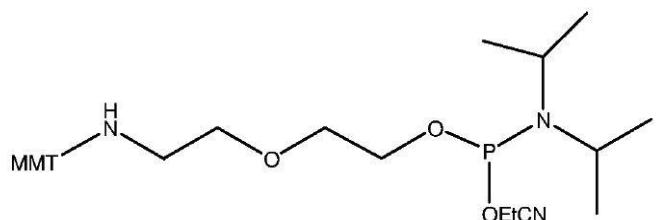
;

50

を有する M T アミノ修飾因子 C 6 C E D ホスホラミダイト；

構造：

【化 1 6】



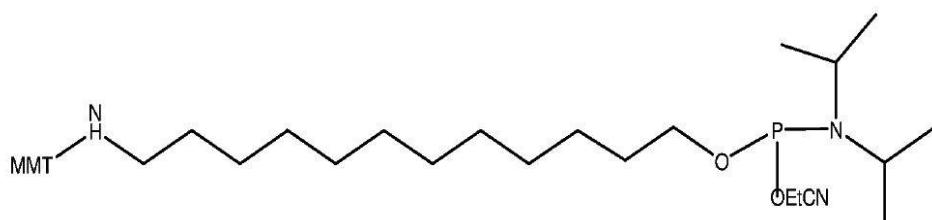
MMT: 4-モノメトキシトリル

10

を有する 5' - アミノ修飾因子 5；

構造：

【化 1 7】



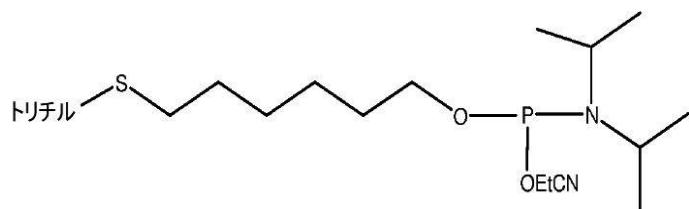
MMT: 4-モノメトキシトリル

20

を有する 5' - アミノ修飾因子 C 1 2；

および構造：

【化 1 8】



30

を有する 5' - チオール - 修飾因子 C 6 を挙げることができる。

【0062】

5' - チオール修飾リンカーは、例えば、PEG - マレイミド、PEG - ビニルスルホン、PEG - ヨードアセトアミドおよびPEG - オルトピリジル - ジスルフィドと共に使用することができる。一例では、アプタマーは、マレイミドまたはビニルスルホン官能性を介して5' - チオールに結合され得る。

40

【0063】

一部の事例では、本開示に従って製剤化されたアプタマーは、リポソーム内への被包によって修飾することもできる。他の事例では、本開示に従って製剤化されたアプタマーは、ミセル内への被包によって修飾することもできる。リポソームおよびミセルは、いずれかの脂質で構成されていてよく、一部の事例では、脂質は、ホスファチジルコリンを含むリン脂質となることができる。

【0064】

一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、副補体経路酵素に関連する機能を阻害するように設計される。一例では、抗fDアプタマーは、fDに関連する機能を阻害するように使用される（例えば、fDの触媒活性を阻害する）。他の事例では、本

50

明細書に記載されているアブタマーは、副補体経路の2個またはそれよりも多いタンパク質の相互作用または結合を防止するように設計される。一例では、アブタマーは、fDに結合し、fDへの複合体C3bBbの結合を防止する。本明細書に記載されているアブタマーは、fDに関連する機能を阻害する抗体またはその抗体断片によって認識されるfDの領域に結合することができる。一部の事例では、fDに関連する機能を阻害する抗体またはその抗体断片は、

【化19】

EVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQA
 PGQGLEWMGWINTYTGETTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYC
 ER
 GGVNNWGGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
 VEPKSCDKTHT (配列番号 71)

10

の重鎖可変領域のアミノ酸配列および

【化20】

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKVPKLLISGGNLRPGV
 PS
 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLQSDSLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

20

【化21】

SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 72).

の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する。

【0065】

一部の事例では、fDに関連する機能を阻害する抗体またはその抗体断片は、

30

【化22】

EVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
 TGETTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEREGGVNNWGQGTL
 VTVSS (配列番号 85); または

EVQLVQSGPELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
 TGETTYAEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCEREGGVSNWGQGTLV
 TVSS (配列番号 86)

の重鎖可変領域のアミノ酸配列；および

【化 2 3】

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITCITSTDIESDMNWYQQKPGKVPKLLISGGNTLRPGVP

SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLQSDSLPYTFGQGTKVEIK (配列番号

87);

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITCITSTDIESDMNWYQQKPGKVPKLLISGGNTLRPGVP

SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLQSESLPYTFGQGTKVEIK (配列番号

88); または

DIQVTQSPSSLSASVGDRVITCITSTSIESDMNWYQQKPGKVPKLLISGGNTLRPGVP

10

SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCLQSDSLPYTFGQGTKVEIK (配列番号

89).

の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する。

【0066】

本明細書に記載されているアプタマーは、fDに関連する機能を阻害する小分子阻害剤によって認識されるfDの領域に結合することができ、非限定的な例として、ジクロロイソクマリンまたは図13A～図13Dに描写されている化合物のうちいずれか1種が挙げられる。本明細書に記載されているアプタマーは、fDに関連する機能を阻害するペプチド阻害剤によって認識されるfDの領域に結合することができる。

20

【0067】

一部の事例では、本開示のアプタマーは、表1に記載されている次の配列のうち1種を含む。

【表1-1】

表1.fDアプタマー配列

配列番号	アプタマー番号	骨格	配列5'から3'
配列番号 1	アプタマー1	RNA	GGGAGUGUGUACGAGGCAUUAGGCCGCCA CCCAAACUGCAGUCUCGUAGUCUGCCUG GCGGCUUUGAUACUUGAUUCGCCUAGAAC
配列番号	アプタマー2	RNA	GGGAGUGUGUACGAGGCAUUAGUCCGCCG AAGUCUUUUGGCUCGGUUUUUCAAGGUC

30

【表1-2】

2			GGCGGCCUUUGAUACUUGAUCGCCCUAGAACG
配列番号 3	アプタマー3	RNA	GGGAGUGUGUACGAGGCCAUUAGGCCGCCA CCUCGUUUGAUUGCGGUUGUUCGCCGCCG GGCGGCCUUUGAUACUUGAUCGCCCUAGAACG
配列番号 4	アプタマー4	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTCCGAGGTTAT TGGGGTTGGGCCTGGCGATTGGGCCCTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 5	アプタマー5	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCTTGGGTTG GGGCCTGGGAGTTGGGGAGCAGAAAGGAC GTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 6	アプタマー6	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTTG TGGGGGTGGGTGGTGGGCCCTCGCCATGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 7	アプタマー7	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCGGTTGGGG TCGAAGGGCGAGGGTGGGAGGTGCGCCGA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 8	アプタマー8	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTATTGGGGC CTGGGTGTTGGGATTGGGACTATGTGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 9	アプタマー9	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGATGGTG GGGGGTGGTGTGGGAGGGCTGGTCGGTCGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 10	アプタマー10	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCCTATAGGGGT GTGGCGAGGGTGGTGGTAGGGCGGCTC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 11	アプタマー11	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCGGAGGTGGGT GGGTGGGTGCGTGCAGGGCGGTGTAGGTC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 12	アプタマー12	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCAAAAGTTAGA TTGACATGGTATGCACCGTCTGAGGTTGGTC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 13	アプタマー13	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCACACGCTAGG GGTGAGGGCGAGGGTGGTAGCGCGTGGC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 14	アプタマー14	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTTG TGGGGCGGGTGGTGGTAGCGTCGGTGGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 15	アプタマー15	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGCTTCCAGCG GTCATGATATGCACTGCTGAAGCTCGGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 16	アプタマー16	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGTTATGATA TGCACCGTCTGAGGGTAGTCGCGGGTGCCTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 17	アプタマー17	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGCTTGTAGT GGGTGGGTGGTGGTAGGTGGTAGCGTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 18	アプタマー18	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCTGGGGTGGG GCCTGGGTGTTGGGGTGGCCTAGAACGCGTA GTTGAGTCTGAGTGCT

10

20

30

40

【表1-3】

配列番号 19	アプタマー 19	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGCTAGGGGTGG GTTGGGGTTGGTGGTGTGCGTGTGGTTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 20	アプタマー 20	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTTGAGGTTG GTGGGGGGTGGCGGTGGGATGGTTGTGCC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 21	アプタマー 21	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTTGACAGTCTG CTTGCAAGGGCCGAGAGCGCCATTGCGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 22	アプタマー 22	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTTGGTGG GGGGGTGGAGGGTGGGAGGCCGTGTGTCCC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 23	アプタマー 23	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTGGTGG GGGAGGGTGGTGGGATGGCCGGCGCTCGTC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 24	アプタマー 24	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGGGTTACGTG GTTCGGGGCTAGGGGGTGGGATGGGTACCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 25	アプタマー 25	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGGTGGTGTGC GGTGGGTTCTGGGTGGGATGGGTGGTACCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 26	アプタマー 26	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTATTAGATCCT CGGTGGGTGGGTGGGTGTGCGGTGGTGTGC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 27	アプタマー 27	DNA	GTGACGACTGACATATCTCGGGCGTCTGAG CGCATGGATGACCCACCGACAGATTGCGGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 28	アプタマー 28	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGCTTGGGTGG GCTCGGTGTGCGGTGTGCGGGTGGGTTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 29	アプタマー 29	DNA	GTGACGACTGACATATCTCGTTGGGTTG GGGCCTGGGAGTTGGGGAGCAGAAAGGGC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 30	アプタマー 30	DNA	GTGACGACTGACATATCTCGGGTGGGTTGG GTTGGGTTGGTGGTGGTGCCTGTTAGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 31	アプタマー 31	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCAAGGTGGTGGG TGGGTGTGTGCGGTGGTGTGATTGGCCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 32	アプタマー 32	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTTGGTGG GGGGCGGGCGGGTGGGAGCCTGGTGTCCGTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 33	アプタマー 33	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTCCGTTGAGG GCTTGTGCGACAGATTGCTGGCACGTACGTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 34	アプタマー 34	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTCTGGTGGTGG TGGTGGGTTGGGATGGGTCTTGGGCTGCCGTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 35	アプタマー 35	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCCTGTGAGGGGAG

10

20

30

40

【表1-4】

35			GGAGGGTGGGTTGGCGGTGGCGCAGGCCGTA GTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号	アプタマー36	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGTGGTGGTGCCT GGGTGGTGGGGGGGGAGCTGGTGCCCCGT AGTTGAGTCTGAGTGCT
36			
配列番号	アプタマー37	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTTG TGGGGTGGTGGTGGTGGCCCTCGCCGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
37			
配列番号	アプタマー38	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTTCGGTATGT GTGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
38			
配列番号	アプタマー39	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTCTCTGTGTTG TGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTGCGTGTGCGT AGTTGAGTCTGAGTGCT
39			
配列番号	アプタマー40	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGGCTGGGTGG GTTGGGTTAGGGTGGTGTGCGGTGGTTGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
40			
配列番号	アプタマー41	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGTTAGGTGG GCGGGTGGTGTGCGGTGGCGGTGGTGA CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
41			
配列番号	アプタマー42	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGGTGATTGGG GTTGGGCCTGGCGTTGGGGACCGCATG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
42			
配列番号	アプタマー43	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGTTGGGGTT GGGGCCTGGAGTTGGGGAGCAGAGAGG ACGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
43			
配列番号	アプタマー44	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTAACCTGTTG GGGTTGGGCCTGGGTGGTGGGTTGTT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
44			
配列番号	アプタマー45	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGGGTTGGT GGGGGGAGGTGGGTGGGTTATGTGCGCTGG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
45			
配列番号	アプタマー46	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTT GTGGGGGTGGGTGGTGGCATTGCGTGTG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
46			
配列番号	アプタマー47	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCGAGTGGGTTCG GTGGTGGTGTGGGAGGGTTGGGTACGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
47			
配列番号	アプタマー48	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGGACATGATT GCACCGTATGAGGTTAGTCGTTAATGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
48			
配列番号	アプタマー49	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCAGTGGGCCCTG GGCGTTGGGTTGGGTGCCTCGTCAGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
49			
配列番号	アプタマー50	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCATGGATTTCG GTGGGTGGGTGGGTGGTGTGGTGGTGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
50			
配列番号	アプタマー51	DNA	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTTGGTGG GGGGGTGGGTGGTGGGAAGGTTCCGGTGCCG

10

20

30

40

【表1-5】

51			TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 52	アプタマー-52	DNA	GTGACGACTGACATATCTGC GGTTGGGGTTG GGGCCTGGGTGTTGGGAGCAGGTAGCACCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 53	アプタマー-53	DNA	GTGACGACTGACATATCTGC GGCCTGGGAGG GTTCGGTGGTGGTGCGAGGGTGGGCAAGCCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 54	アプタマー-54	DNA	ACCTAGTTGGCTTGCAXAAGTAACYAGCAC GTGGGCTAG
配列番号 55	アプタマー-55	DNA	ACGATCGCCCCYGTCTWTAAGAXCGAATACT ATGGGCTAG
配列番号 56	アプタマー-56	DNA	ACCTAGAAAGGCTTAGTGAAGTAAWGATCA GGGCGGGATC
配列番号 57	アプタマー-57	DNA	ACCTAGTTCCCYGTCTAXYAGAXCCGAGXGT ATGCCGATC
配列番号 58	アプタマー-58	DNA	ACCTAGGCAGTCTGCCGAATTACGAGGXGG GGAGGGATC
配列番号 59	アプタマー-59	DNA	ACGATCACTGCYCAGCW TYATTAACYAGCYT CGACCCTAG
配列番号 60	アプタマー-60	DNA	ACGATCTCCGCCAGCTGYATTXCGAAGXGCG TGAGGATC
配列番号 61	アプタマー-61	DNA	ACCTAGGCAGTCTTXCCGTCGTTACGTCCYCGG CCCCTAG
配列番号 62	アプタマー-62	DNA	ACCTAGTTGGCGTAGCGYATTA AWGGGXGCG GCAGCTAG
配列番号 63	アプタマー-63	DNA	ACGATCGCTGACGTXCAXYAGTATGAGGCACG TGGGCTAG

【0068】

一部の態様では、本開示のアプタマーは、アプタマー-1～3（配列番号1～3）のうちいずれか1種の核酸配列を含む。一部の事例では、アプタマー-1～3のうちいずれか1種は、1個または複数の修飾ヌクレオチドを含む。好まれる例では、本開示のアプタマーは、アプタマー-1～3のうち1種を含み、Gは、2'Fであり、A、CおよびUは、2'O Me修飾RNAである。一部の態様では、本開示のアプタマーは、アプタマー-54～63（配列番号54～63）のうちいずれか1種の核酸配列を含む。一部の事例では、アプタマー-54～63のうちいずれか1種は、1個または複数の修飾ヌクレオチドを含む。好まれる例では、本開示のアプタマーは、アプタマー-54～63のうち1種を含み、W=5-（インドール-3-アセトアミド-1-プロペニル）-2'-デオキシウリジン；X=5-（アミノ-1-プロペニル）-2'-デオキシウリジン；およびY=5-（4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル）-2'-デオキシウリジンである。

【0069】

10

20

30

40

50

一部の事例では、本開示のアプタマーは、本明細書に記載されているいづれかのアプタマーと、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または9 9 %配列同一性を有することができる。例えば、本開示の抗 f D アプタマーは、表 1 に記載されているいづれかのアプタマーと、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または9 9 %配列同一性を有することができる。一部の事例では、本開示のアプタマーは、本明細書に記載されているいづれかのアプタマーと、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または9 9 %配列同一性を有することができる。10 例えれば、本開示の抗 f D アプタマーは、表 1 に記載されているいづれかのアプタマーと、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または9 9 %配列同一性を有することができる。例えば、本開示の抗 f D アプタマーは、表 1 に記載されているいづれかのアプタマーと、少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または9 9 %配列同一性を有することができる。

【0070】

特異的ヌクレオチド修飾が列挙されたような事例では、いかなる数および種類のヌクレオチド修飾も置換されてよいことを理解されたい。例えば、2' OMeG は、2' FG に代えて置換され得る。ヌクレオチド修飾の非限定的な例を本明細書に提供してきた。一部の実例では、アプタマーのヌクレオチドの全てが修飾されている。一部の実例では、本開示のアプタマーのヌクレオチドの少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %または 1 0 0 %が修飾されていてよい。20

【0071】

一部の実例では、アプタマーは、次の核酸配列（5'から3'へ）のうち 1 種も含まない：

【化 24】

ACGGAGAAAGAGAGAGTGTATTGCTAGCATAACCGCTGC (配列番号	73);
GTAACCACGTTGCCAGACCGAGTCTACCAGCGATCCTCAG (配列番号	74);
TATGCCCAAATCCCTCAAGTCGGCCAGGATACACCACCGT (配列番号	75);
AATCAAAAGGCTCACGCGGGATTGGTCAACCTTACAACC (配列番号	76);
TCGGCCTTCCCAGACCACCGCAATCCCCAGGAAACAGGCA (配列番号	77);
CATCACACTGTCAACATACCCAGCCTGGGAAAGACGAAC (配列番号	78);
AACCCGCATGCCATCGATGTCGTGCCCTCGCTCCACGCTC (配列番号	79); または
ACCAGGCACCCGACGGACTAACTCATCACTCAGGCGAGGG (配列番号	80).

抗 f D 組成物

【0072】

f D は、副補体経路の構成成分であり、AMD および他の眼障害の病態形成に関与すると考えられる。f D は、タンパク質分解活性の発現のためにチモーゲンの切断を要求しないという点において、セリンプロテアーゼの中でも特有である。むしろ、f D は、f D の触媒中心および基質結合部位の可逆的再配向をもたらす、複合体 C 3 b B によって誘導されると考えられる立体構造変化を要求する。f D は主に、脂肪細胞によって産生され、血清において低レベルで全身的に利用できる。f D は、f D の触媒活性を防止する自己阻害ループを含有する。f D への C 3 b B 複合体の結合は、自己阻害ループを転置し、f D は、C 3 b B を切断して、C 3 コンバターゼ C 3 b B b を形成する。f D の触媒活性は、複合体形成した f B の文脈においてのみ起こる；f D は、複合体形成していない f B を切断

10

20

30

40

50

しない。fD、fBおよびC3bの複合体は、fDがその律速(rate-limited)酵素である副補体経路の増幅ループを形成する。

【0073】

一部の態様では、本明細書に記載されている方法および組成物は、副補体経路の増幅ステップの阻害をもたらすfDの阻害が関与する。本明細書における抗fD組成物は、眼疾患の処置のための1種または複数の抗fDアブタマーの使用が関与し得る。一部の事例では、眼疾患は、黄斑変性である。一部の事例では、黄斑変性は、加齢性黄斑変性である。一部の事例では、加齢性黄斑変性は、乾性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、乾性加齢性黄斑変性は、進行型乾性加齢性黄斑変性(すなわち、地図状萎縮)である。一部の事例では、加齢性黄斑変性は、湿性加齢性黄斑変性である。一部の事例では、黄斑変性は、シュタルガルト病またはシュタルガルト様疾患である。

抗fD阻害剤

【0074】

本明細書に開示されている抗fD組成物は、高い特異性および親和性でfDの特異的領域に結合するように設計することができる。組成物は、酵素の触媒活性を直接的にまたは間接的に阻害するような仕方で、fDに結合することができる。一部の事例では、抗fDアブタマーは、fDの活性部位(例えば、触媒クレフト)に結合し、fDの触媒活性を直接的に阻害することができる。この例では、アブタマーは、fDの活性部位(例えば、触媒クレフト)を標的とするように設計することができる。アブタマーが、fDの活性部位に結合されると、基質(例えば、C3bB)が、活性部位にアクセスすることを防止することができる。一部の事例では、抗fDアブタマーは、fDのエキソサイトに結合し、例えば、C3bBの結合を防止することにより、fDの触媒活性を間接的に阻害することができる。一部の事例では、エキソサイトは、触媒部位から遠隔となることができる。他の事例では、触媒部位とある程度の重複があってよい。一部の事例では、抗fDアブタマーは、fDの自己阻害ループに結合して、自己阻害ループの転置を防止し、これにより、fDの活性化を防止することができる。

【0075】

fDのアミノ酸残基は、キモトリプシンナンバリングスキームに従って参照することができ、このナンバリング方式は、本開示を通して、fDの特異的アミノ酸残基を指すように使用されている。fDのキモトリプシンナンバリングスキームは、図14に描写されている通りとなることができる(配列番号94)(キモトリプシンナンバリングはアミノ酸配列の上に表示し、fDナンバリングスキームはアミノ酸配列の下に表示した)。

【0076】

本明細書に記載されている抗fDアブタマーは、fDまたはそのfDバリアントの活性をモジュレートまたは阻害することができる。fDバリアントは、本明細書において、fDと基本的に同じ機能を果たすバリアントを包含する。fDバリアントは、fDと基本的に同じ構造を含み、一部の事例では、fDタンパク質のアミノ酸配列(上に示す)に対する少なくとも80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または99.9%配列同一性を含む。

【0077】

本開示のある特定の実施形態では、fDのエピトープに特異的に結合するfDアブタマーの同定のための方法が提供される。このような方法を利用して、例えば、アブタマーの結合部位および/または作用機序を決定することができる。

【0078】

一実例では、赤血球細胞の副補体依存性溶血においてfDアブタマーを検査するための方法が提供される。C1q枯渇により古典的補体経路が欠損させられたヒト血清は、fDに依存し得る活性である、ウサギ赤血球細胞を溶解するために副補体活性に依存し得る(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation

10

20

30

40

50

by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。一部の事例では、本明細書に開示されているfDアプタマーは、赤血球細胞の副補体依存性溶血を阻害することができる(実施例4を参照)。

【0079】

別の実例では、fDエステラーゼ活性アッセイにおいてfDアプタマーを検査するための方法が提供される(実施例5を参照)。fDの修飾ペプチド基質、Z-Lys-S-Bz1の切断は、切断産物還元5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)によってモニターすることができる。FDは、ペプチドチオエステル基質を使用する場合、他の補体プロテアーゼよりも低い触媒反応速度を有することができ、斯かる一基質Z-Lys-SBz1は、fDによって切断され、合成基質として有用であることが判明した(fDは、Kam、McRaeら(1987年)Human complement proteins D, C2, and B.、J. Biol. Chem. 262巻、3444~3451頁においてタンパク質Dと呼ばれる)。一部の事例では、fDに結合する分子は、触媒クレフトにおいて結合して、fDの触媒残基へのペプチド基質のアクセスを立体的に防止することにより、触媒活性を遮断することができる(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。他の事例では、fDに結合する分子は、酵素の構造変化を誘導するアロステリック機序によって触媒活性を遮断することができる。さらに他の事例では、fDに結合する分子は、fDエキソサイト領域に結合して、合成修飾ペプチド基質Z-Lys-SBz1ではなく、生理的基質タンパク質C3bBの結合を立体的に阻害することができる(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。一部の実例では、分子が、fD結合およびFBのタンパク質分解性切断を阻害するが、Z-Lys-SBz1を阻害しない場合、結合は、抗D因子Fab抗体断片が、エキソサイトに結合し、fD切断Z-Lys-S-Bz1を増加させる僅かな立体構造変化を誘導する仕方と同様のものになり得る(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。

【0080】

別の実例では、精製タンパク質fD、FBおよびC3bで構成された、再構成された生化学的fD活性アッセイにおけるfDアプタマーを検査するための方法が提供される(実施例6を参照)。fDが、FBおよびC3bの複合体(C3bB)に結合すると、FBは、fDによって断片BaおよびBbへと切断される(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。fDの活性は、Baに特異的に結合する抗体(Quidell、A033)を使用するELISAを使用して、またはBaレベルを測定するための本技術分野で公知の他の手段によって、FB切断およびBa断片産生の速度によってモニターすることができる。一部の事例では、FBおよびC3bの濃度は等しいため、1:1複合体を形成し、これは次いで、fDに結合し、酵素活性を有するfDが、FBを断片BaおよびBbへと切断することを可能にすることができる。一部の事例では、FB:C3b複合体は、fDの4倍過剰で存在する。他の事例では、fDおよび/またはC3bBの濃度は、 k_{cat} 、 K_m および k_{cat}/K_m が挙げられるがこれらに限定されない、酵素定数

10

20

30

40

50

を測定するような様式で変動される。

【0081】

さらに別の実例では、複合体におけるC3bBへのfD結合の同定のための方法が提供される（実施例7を参照）。FDは、副補体経路における律速酵素であり、プロコンバターゼC3bBおよびC3b₂Bを変換して、活性C3コンバターゼC3bBbまたは活性C5コンバターゼC3b₂Bbを形成する（Katschkeら、2012年）。FBとの安定複合体におけるfDを検出するための表面プラズモン共鳴（SPR）のため、FB:C3b複合体への結合によりFBを切断しないように、触媒的に不活性なfD（S195A）を使用することができる（Katschke、Wu、Ganesanら（2012年）Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁）。C3bが、CM5チップにアミンカップリングされると、SPRは、質量増加としてFBの結合を検出することができ、C3b:FB複合体へのfDの結合は、さらなる質量増加として検出することができる。一態様では、fD結合化合物は、SPRによって検出される質量低下によって決定される通り、fDに結合し、FB:C3bへのfD結合を防止するアプタマーである。

【0082】

一部の事例では、シュタルガルト病の細胞モデルを使用して、抗fDアブタマーの活性を検出することができる（実施例8を参照）。網膜色素上皮（RPE）細胞は、シュタルガルト病進行の初期に細胞死を起こす場合があり、証拠は、RPE細胞死における副補体経路（AP）の関与を指し示す（Berchuck、Yangら（2013年）All-trans-retinal (atRAL) sensitizes human RPE cells to alternative complement pathway-induced cell death.、Invest Ophthalmol Vis Sci 54巻、2669~2677頁）。ARPE-19細胞は、19歳男性の正常な目に由来する自発的に生じるRPE細胞株である。特異的培養培地において培養された立方状基底細胞層を使用して確立されたARPE-19細胞株は、RPE特異的マーカーの細胞性レチナルデヒド結合タンパク質およびRPE-65を発現する。シュタルガルト病は、オールトランスレチナールをプロセシングするタンパク質をコードするABC A4遺伝子にホモ接合型突然変異を有する患者において起こる遺伝性若年性黄斑変性である（Molday（2007年）ATP-binding cassette transporter ABC A4: molecular properties and role in vision and macular degeneration.、J. Bioenerg Biomembr 39巻、507~517頁）。シュタルガルト病のABC A4およびRDH8マウスモデルは、蓄積されたatRALに起因する網膜病理を呈し、ABC A4突然変異は、AMD患者の16%において存在し、上昇したatRALが、シュタルガルト病およびAMD疾患進行に寄与し得ることを示唆する（Berchuckら、2013年）。機構的には、atRALは、in vitroでRPE細胞におけるCD46およびCD59の発現を減少させ、これは、RPE細胞膜に結合する抗RPE抗体に応答して、副補体によって媒介される細胞溶解に対する感受性を増加させた（Berchuckら、2013年）。一部の事例では、本開示は、ヒト網膜色素上皮細胞の副補体媒介性溶解を阻害するfD阻害剤の同定を提供する。

【0083】

本明細書に開示されている抗fDアブタマーは、一部の事例では、活性部位クレフトを含むfDの領域に結合することができる。C3bBへの結合による活性化後に、fDは、fBに向けたセリンプロテアーゼ活性を示す。基質結合によるfDの活性化は、二段階プロセスである：第一に、fDは、ループ内のそのエキソサイト残基145~149、169~173、185~188および220~224を介して主に相互作用する、fBのフォン・ヴィルブランド因子A型（VWA）-セリンプロテアーゼ（SP）界面においてオ

ーブン C 3 b B 立体配置で f B に結合する。C 3 b B への f D の結合は、f D の自己阻害ループを活性部位クレフトから転置させる。f D の全般的構造物は、2 個の逆平行ベータバレルドメインで構成され、各ドメインは、両方のドメインにおいて同じトポロジーを有する 6 または 7 個のベータストランドで構成される。ベータストランドは、14 個のターン / ループおよび 3 個の短いアルファヘリックスによって接続される。活性部位クレフトは、2 個のベータバレルの間に形成されたループ内に位置し、ヘリックス 1 、ループ 7 およびベータストランド 7 、ループ 11 およびベータストランド 11 、ベータストランド 12 、ループ 13 およびベータストランド 13 を含む構造的エレメントを包含する (Jingら、1998 年)。活性部位クレフトに結合するアプタマーは、その内部に活性部位クレフトが存する f D の部分を含む、アルファヘリックス、ループおよびベータストランドのいずれかの部分を認識することができ、この領域に結合することにより、活性部位クレフトへのアクセスを防止することができる。斯かる残基は、触媒三連構造、His 57 、Asp 102 および Ser 195 、残基 193 および Ser 195 の骨格アミンを含むオキシアニオンホール、残基 16 、194 および Ser 195 含む塩橋を介して触媒三連構造をオキシアニオンホールに連結する残基、残基 189 ~ 192 、214 ~ 216 および 224 ~ 228 を含む S1 ポケット、ならびに S2 、S3 、S4 および Sn ポケットを含む残基を含む特異性ポケットの他のエレメントを含む。特に、斯かるアプタマーは、f D の特異性ポケット S2 ~ Sn と f B の P2 ~ Pn 残基の相互作用を防止するであろう。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、f D の活性部位クレフトまたは活性部位クレフトを含む領域に特異的に結合する。活性部位クレフトまたは活性部位クレフトを含む領域に結合すると言われるアプタマーは、触媒三連構造 (His 57 、Asp 102 および Ser 195) ; 残基 193 および Ser 195 の骨格アミンを含むオキシアニオンホール ; 残基 16 、194 および Ser 195 を含む塩橋を介して触媒三連構造をオキシアニオンホールに連結する残基 ; 残基 189 ~ 192 、214 ~ 216 および 224 ~ 228 を含む S1 ポケット ; ならびに S2 、S3 、S4 および Sn ポケットを含む残基を含む特異性ポケットの他のエレメントを含む領域のうち 1 種または複数に結合するいずれかのアプタマーを含むことができる。

【0084】

斯かる f D 阻害剤は、赤血球細胞の副補体依存性溶血を阻害することができ、Z-Lys - S - Bz1 等の f D のチオエステル基質に対する f D のエステラーゼ活性を阻害することができ、f D による C3bB 複合体における f B 切断を阻害することができる。エステラーゼアッセイにおいて、斯かる阻害剤は、f D の k_{cat} を低下させ、 K_m を増加させることができ、主な効果は、 k_{cat} の減少および k_{cat} / K_m (Hedstrom) の減少である。完全生化学アッセイにおいて、斯かる阻害剤は、 k_{cat} を減少させ、 K_m を増加させることができ、主な効果は、 k_{cat} の減少および k_{cat} / K_m の減少である。斯かる阻害剤は、Forneris らもしくは Kat schke らに記載されている表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ等の酵素アッセイもしくは酵素 - 基質アセンブリアッセイ、または E LISA もしくは同様のアッセイによって評価される同様の E - S アセンブリアッセイにおいて評価された場合に、酵素 - 基質複合体 (f D - C3bB 複合体) の形成を防止しない場合がある。

【0085】

本明細書に開示されている抗 f D アプタマーは、一部の事例では、f D の自己阻害状態を安定化することができるように、自己阻害ループ (残基 212 ~ 218) および自己阻害ループに隣接する領域を含む f D の領域に結合することができる。成熟 f D は、f D の自己阻害ループと称することができる、残基 212 ~ 218 の立体構造を含む遊離 f D 状態の立体構造のセットにより、自己阻害状態を維持する。これらの残基は、ポリペプチド結合部位の部分、および f D の S1 特異性ポケットを含むことができる。f D の不活性状態において、このループは、上昇した立体構造をとり、触媒三連構造および S1 特異性ポケットの鍵となる構成成分と特異的結合を形成し、f D を不活性にする。一部の事例では、本開示の抗 f D 化合物は、f D の活性化を防止するために、f D の自己阻害ループを標

10

20

30

40

50

的とするように設計される。例えば、抗 f D 化合物は、自己阻害ループの活性部位クレフトからの転置を防止するために、自己阻害ループまたは自己阻害ループの周囲の領域に結合することができる。一部の事例では、抗 f D 化合物は、f D の残基 212 ~ 218 を標的とするように設計することができる。抗 f D アブタマーが、f D のアミノ酸残基 212 ~ 218 のうち 1 個または複数を含む領域に結合する場合、斯かる抗 f D アブタマーは、f D の自己阻害ループまたはその部分に結合すると言ふことができる。

【 0 0 8 6 】

斯かる f D 阻害剤は、赤血球細胞の副補体依存性溶血を阻害することができ、Z - L y s - S - B z 1 等の f D のチオエステル基質に対する f D のエステラーゼ活性を阻害することができ、f D による C 3 b B 複合体における f B 切断を阻害することができる。エステラーゼアッセイにおいて、斯かる阻害剤は、f D の k_{cat} を低下させ、 K_m を増加させることができ、主な効果は、 k_{cat} の減少および k_{cat} / K_m の減少である。完全生化学アッセイにおいて、斯かる阻害剤は、 k_{cat} を減少させ、 K_m を増加させることができ、主な効果は、 k_{cat} の減少および k_{cat} / K_m の減少である。斯かる阻害剤は、Forneris らもしくは Kat schke らに記載されている表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ等の酵素アッセイもしくは酵素 - 基質アセンブリアッセイ、または ELISA もしくは同様のアッセイによって評価される同様の E - S アセンブリアッセイにおいて評価された場合に、酵素 - 基質複合体 (f D - C 3 b B 複合体) の形成を防止しない場合がある。

【 0 0 8 7 】

本明細書に開示されている抗 f D アブタマーは、一部の事例では、E S 複合体の形成を防止することができるよう、f D のエキソサイトに結合することができる。理論に制約されることは望まないが、f B に対する f D の高い特異性は、f D および f B のエキソサイトの間のタンパク質間相互作用によるものである場合がある。f D のエキソサイトは、触媒中心からおよそ 25 であり、残基 145 ~ 149、169 ~ 173、185 ~ 188 および 220 ~ 224 で構成された (comprised by) 4 個のループからなる。一部の事例では、本開示の抗 f D 化合物は、f D のエキソサイトを標的とし、f B と f D との相互作用を防止することができる。この性質の抗 f D 化合物は、f D エキソサイトの 4 個のループのうち 1 個または複数を標的とすることができ、例えば、抗 f D 化合物は、f D のアミノ酸残基 145 ~ 149、169 ~ 173、185 ~ 188 および 220 ~ 224 のうち 1 個または複数を標的とするように設計することができる。抗 f D アブタマーが、アミノ酸残基 145 ~ 149、169 ~ 173、185 ~ 188 および 220 ~ 224 のうち 1 個または複数に結合する場合、斯かるアブタマーは、f D のエキソサイトに結合すると言ふことができる。

【 0 0 8 8 】

f D への C 3 b B 基質の結合を遮断するアブタマー阻害剤は、赤血球細胞の副補体依存性溶血を阻害することができる。斯かる阻害剤は、ヒト f D に結合された場合の抗 f D F ab に観察される通り (Kat schke ら)、Z - L y s - S - B z 1 等の f D のチオエステル基質に対する f D のエステラーゼ活性を増強することができる。あるいは、f D のエキソサイトに結合するアブタマーは、例えば、Kat schke らにおける抗 f D

F ab が、カニクイザル由来の f D に結合する場合のように、f D のエステラーゼ活性に影響を与えないことがあり、これは、f D エステラーゼ活性を阻害も増強もしない。エキソサイト結合アブタマーは、f D による C 3 b B 複合体における f B 切断を阻害するであろう。エステラーゼアッセイにおいて、斯かる阻害剤は、 k_{cat} を増加させ、f D の K_m に影響が全くないまたは最小となることができ、主な効果は、 k_{cat} の増加および k_{cat} / K_m の増加である、あるいは斯かる阻害剤は、 k_{cat} にも K_m にも k_{cat} / K_m にも影響を与えない。完全生化学アッセイにおいて、斯かる阻害剤は、主に、 K_m を増加させ、 k_{cat} / K_m を減少させるであろう。斯かる阻害剤は、Forneris らもしくは Kat schke らに記載されている表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ等の酵素アッセイもしくは酵素 - 基質アセンブリアッセイ、または ELISA もしくは同

10

20

30

40

50

様のアッセイによって評価される同様の E S アセンブリアッセイにおいて評価された場合に、酵素 - 基質複合体 (f D - C 3 b B 複合体) の形成を防止することができる。

【 0 0 8 9 】

f B の f D 活性化の触媒ターンオーバーは、非生産的状態でまたは f B 切断後の E P (f D - C 3 b B b) 複合体において結合された場合、E S 複合体の解離を要求する。本明細書に開示されている抗 f D アプタマーは、一部の事例では、C 3 b B または C 3 b B b からの f D の解離を防止するような仕方で、f D に結合することができる。想定される通り、斯かるアプタマーは、f D のエキソサイト付近に結合し、C 3 b B または C 3 b B b に対する f D の親和性を増加させるような様式で、この相互作用のオフレートを減少させることにより、f D に結合することができる。例えば、Ser 195 が A 1 a 195 に突然変異された突然変異体型 (Fornerisら) 等、触媒的に不活性化された型の f D を使用することにより、斯かるアプタマーを f D - C 3 b B 複合体に対する選択により生成して、選択のための標的としての安定した非反応性 E S 複合体を提供することができる。斯かる作用機序を保有するアプタマーは、赤血球細胞の副補体依存性溶血を阻害するであろう。斯かる阻害剤は、Z - Lys - S - Bz 1 等の f D のチオエステル基質に対する f D のエステラーゼ活性を阻害することができる、または f D のエステラーゼ活性に影響を与えるてもよい。斯かる結合アプタマーは、f D による C 3 b B 複合体における f B 切断のターンオーバーを阻害するであろう。エステラーゼアッセイにおいて、斯かる阻害剤は、 k_{cat} を減少させ、f D の K_m における影響が全くないまたは最小となることができ、主な効果は、 k_{cat} の減少および k_{cat} / K_m の減少である、または斯かる阻害剤は、 k_{cat} にも K_m にも k_{cat} / K_m にも影響を与えないであろう。完全生化学アッセイにおいて、斯かる阻害剤は、主に、 K_{cat} を減少させ、 k_{cat} / K_m を減少させるであろう。斯かる阻害剤は、Fornerisらに記載されている表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ等の酵素アッセイまたは酵素 - 基質アセンブリアッセイにおいて評価された場合、酵素 - 基質複合体 (f D - C 3 b B 複合体) の形成を増強し、C 3 b B または C 3 b B b に対する f D の見かけ上の親和性を増加させることができる。

【 0 0 9 0 】

一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、抗 f D 抗体またはその抗体断片と同じエピトープに結合することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、抗 f D 治療用抗体と同じエピトープに結合することができる。例えば、抗 f D アプタマーは、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F ab ; または配列番号 8 5 もしくは 8 6 のいずれか 1 種に従った重鎖可変領域のアミノ酸配列および配列番号 8 7 ~ 8 9 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F ab ; または M ab 1 6 6 - 3 もしくは L S - C 1 3 5 7 3 5 等、抗 f D 治療用抗体が結合するものと同じまたは同様の f D の領域に結合することができる。例えば、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F ab は、残基 1 2 9 ~ 1 3 2 、残基 1 6 4 ~ 1 7 8 、 Arg 2 2 3 および Lys 2 2 4 に結合することができ、相互作用の大部分は、アミノ酸 1 7 0 を包含するループ (「1 7 0 ループ」) が関与する。一部の事例では、配列番号 7 1 に従った重鎖可変領域および配列番号 7 2 に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗 f D F ab が結合するものと同じまたは同様の f D の領域 (例えば、アミノ酸残基 1 2 9 ~ 1 3 2 、 1 6 4 ~ 1 7 8 、 Arg 2 2 3 および Lys 2 2 4 のうち 1 個または複数を含む領域) に結合するアプタマーは、f D のエキソサイトに結合していると言えることができる。

【 0 0 9 1 】

一部の事例では、f D のモジュレーションのための抗 f D アプタマーが提供される。一部の事例では、f D に関連する機能の阻害のための抗 f D アプタマーが提供される。一部の事例では、抗 f D アプタマーは、f D の触媒活性を阻害する。一部の事例では、乾性 AMD または地図状萎縮の処置のための抗 f D アプタマーが提供される。一部の事例では、湿性 AMD の処置のための抗 f D アプタマーが提供される。一部の事例では、シュタルガ

10

20

30

40

50

ルト病の処置のための抗 f D アプタマーが提供される。

〔 0 0 9 2 〕

解離定数 (K_d) を使用して、標的にに対するアブタマーの親和性を描写することができる（またはどの程度緊密にアブタマーが標的に結合するかを描写することができる）、または標的の特異的エピトープ（例えば、エキソサイト、触媒クレフト等）に対するアブタマーの親和性を描写することができる。解離定数は、標的の結合部位の半分がアブタマーによって占有されるモル濃度として規定される。よって、 K_d が小さいほど、その標的へのアブタマーの結合は、より緊密となる。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、1 mM 未満、100 μM 未満、10 μM 未満、1 μM 未満、100 nM 未満、10 nM 未満、1 nM 未満、500 pM 未満または100 pM 未満の、f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、50 nM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、25 nM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、10 nM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、5 nM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、500 pM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、50 pM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、抗 f D アブタマーは、5 pM 未満の f D タンパク質に対する解離定数 (K_d) を有する。一部の事例では、アブタマーは、約 1 mM、100 μM、10 μM、1 μM、100 nM、50 nM、25 nM、10 nM、5 nM、500 pM、50 pM または 5 pM 未満の K_d で、f D の触媒クレフト、活性部位、エキソサイトおよび / または自己阻害ループに結合する。一部の事例では、 K_d は、本明細書に記載されているフローサイトメトリー・アッセイによって決定される。

【 0 0 9 3 】

本明細書に開示されているアプタマーは、約 50 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 50 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 50 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアプタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の触媒クレフトに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。

【 0 0 9 4 】

本明細書に開示されているアプタマーは、約 50 nM 未満の K_d で、fD の活性部位に結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀

ができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 10 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 50 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 10 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。本明細書に開示されているアブタマーは、約 5 nM 未満の K_d で、fD の自己阻害ループに結合することができ、C3 溶血アッセイによって測定された場合、約 5 nM 未満の IC₅₀ を有することができる。

10

【0097】

一部の態様では、本明細書に開示されているアブタマーは、抗体を含む他の治療薬と比較して、改善された半減期を有する。一部の事例では、アブタマーは、抗体と比較して、生体液または溶液において改善された半減期を有する。一部の事例では、アブタマーは、抗体と比較して、in vivo で改善された半減期を有する。一例では、アブタマーは、抗体と比較して、目に注射された場合に改善された半減期を有する（眼内半減期）。一部の事例では、アブタマーは、ヒトの目に注射された場合に改善された眼内半減期を有することができる。一部の事例では、アブタマーは、生理的条件下で抗体を上回る改善された安定性を実証することができる。

20

【0098】

一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーは、ヒトにおける少なくとも 7 日間の眼内半減期を有する。一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーは、ヒトにおける少なくとも 8 日間、少なくとも 9 日間、少なくとも 10 日間、少なくとも 11 日間、少なくとも 12 日間、少なくとも 13 日間、少なくとも 14 日間、少なくとも 15 日間、少なくとも 20 日間またはそれを超える眼内半減期を有する。

30

【0099】

一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーは、非ヒト動物（例えば、齧歯類／ウサギ／サル）における少なくとも 1 日間の眼内半減期を有する。一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーは、齧歯類、ウサギまたはサル等、非ヒト動物における少なくとも 1 日間、少なくとも 2 日間、少なくとも 3 日間、少なくとも 4 日間、少なくとも 5 日間、少なくとも 6 日間、少なくとも 7 日間、少なくとも 8 日間、少なくとも 9 日間、少なくとも 10 日間またはそれを超える眼内半減期を有する。

【0100】

一部の態様では、本明細書に記載されているアブタマーは、他の治療薬と比較して、より短い半減期を有することができる。例えば、無修飾または非コンジュゲートアブタマーは、修飾またはコンジュゲートアブタマーと比較して、より低い半減期を有することができるが、低分子量の無修飾または非コンジュゲート型は、数桁大きい初期濃度を可能にし、これにより、より大きい持続時間／有効性を達成することができる。一部の例では、アブタマーは、ヒトにおける約 7 日間未満の眼内半減期を有することができる。一部の例では、本明細書に記載されているアブタマーは、ヒトにおける約 6 日間未満、約 5 日間未満またはさらには約 4 日間未満の眼内半減期を有する。

40

【0101】

本明細書に開示されているアブタマーは、他の補体経路構成成分に対し、fD に対する高い特異性を実証することができる。一般に、アブタマーが、fD に対し高い親和性を有するが、他の補体経路構成成分またはセリンプロテアーゼに対する親和性がほとんどない

50

から全くないよう、アプタマーを選択することができる。一部の事例では、アプタマーは、アプタマーが、相対血清濃度における C3、C5、B 因子、H 因子または I 因子のいずれか（またはこれらの関連する二量体、三量体もしくは多量体複合体、単位もしくはサブユニットのいずれか）に結合するよりも少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 20 倍または 20 倍超大きい特異性で、fD に結合する。例えば、一部の事例では、アプタマーは、アプタマーが、相対血清濃度における C3、C5、B 因子、H 因子または I 因子のいずれか（またはこれらの関連する二量体、三量体もしくは多量体複合体、単位もしくはサブユニットのいずれか）に結合するよりも少なくとも 50 倍大きい特異性で、fD に結合する。例えば、一部の事例では、アプタマーは、アプタマーが、相対血清濃度における C3、C5、B 因子、H 因子または I 因子のいずれか（またはこれらの関連する二量体、三量体もしくは多量体複合体、単位もしくはサブユニットのいずれか）に結合するよりも少なくとも 100 倍大きい特異性で、fD に結合する。

10

【0102】

治療剤の活性は、最大半量阻害濃度 (IC₅₀) によって特徴付けることができる。IC₅₀ は、治療剤の最大阻害効果の半分が達成される、nM 単位の治療剤の濃度として計算される。IC₅₀ は、値の計算に利用されるアッセイに依存する。一部の例では、本明細書に記載されているアプタマーの IC₅₀ は、C3 溶血アッセイによって測定された場合、100 nM 未満、50 nM 未満、25 nM 未満、10 nM 未満、5 nM 未満、1 nM 未満、0.5 nM 未満、0.1 nM 未満または 0.01 nM 未満である (Pangburn, 1988 年、Methods in Enzymology; および Katschke, 2009 年、Journal of Biological Chemistry)。

20

【0103】

一部の例では、本明細書に記載されているアプタマーは、fD エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、fD の活性を増加させ、溶血アッセイによって測定された場合、fD の活性を阻害する。他の例では、本明細書に記載されているアプタマーは、対照と比較して、fD の活性を阻害し、溶血アッセイによって測定された場合、fD の活性を阻害する。さらに他の事例では、アプタマーは、D 因子エステラーゼ活性アッセイによって測定された場合、対照と比較して、補体 D 因子の活性を阻害せず、溶血アッセイによって測定された場合、補体 D 因子の活性を阻害する。

30

【0104】

アプタマーは一般に、延長された期間、外界温度で高い安定性を有する。本明細書に記載されているアプタマーは、30 日目またはそれよりも後に、生理的条件下で溶液における 70 % 超、75 % 超、80 % 超、85 % 超、90 % 超、91 % 超、92 % 超、93 % 超、94 % 超、95 % 超、96 % 超、97 % 超、98 % 超、99 % 超、99.5 % 超または 99.9 % 超の活性を実証する。

40

適応症

【0105】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、眼疾患または障害の処置に使用される。眼疾患または障害は、アレルギー性および巨大乳頭結膜炎を含む炎症性結膜炎、黄斑浮腫、ぶどう膜炎、眼内炎、強膜炎、角膜潰瘍、ドライアイ症候群、緑内障、虚血性網膜疾患、角膜移植拒絶、眼内レンズ植え込みおよび白内障外科手術に伴う炎症等の眼内外科手術に関する合併症、ベーチェット病、シュタルガルト病、免疫複合体血管炎、フックス病、フォークト・小柳・原田病、網膜下線維症、角膜炎、網膜硝子体炎症、眼球寄生虫の寄生 / 遊走、網膜色素変性症、サイトメガロ (cytomegla) ウィルス網膜炎ならびに脈絡膜炎症等、いずれかの補体媒介性眼障害を限定することなく含むことができる。

【0106】

本明細書に提供される方法および組成物による処置を受け入れることができる (ame n dable) 眼疾患または障害の他の例は、眼瞼外反、兎眼、眼瞼皮膚弛緩症、眼瞼下

50

垂、眼瞼の黄色板腫、眼瞼の寄生虫の寄生、眼瞼の皮膚炎、涙腺炎、流涙症、甲状腺機能異常性眼球突出症、結膜炎、強膜炎、角膜炎、角膜潰瘍、角膜擦過傷、雪盲、アークアイ（arc eye）、タイゲソン点状表層角膜症、角膜新生血管、フックスジストロフィー、円錐角膜、乾性角結膜炎、虹彩炎、ぶどう膜炎、交感性眼炎、白内障、脈絡網膜炎症、限局性脈絡網膜炎症、限局性脈絡網膜炎、限局性脈絡膜炎、限局性網膜炎、限局性脈絡網膜炎、播種性脈絡網膜炎症、播種性脈絡網膜炎、播種性脈絡膜炎、播種性網膜炎、播種性脈絡網膜炎、滲出性網膜症、後側毛様体炎、毛様体扁平部炎、原田病、脈絡網膜瘢痕、後極の斑状瘢痕、日光網膜症、脈絡膜変性、脈絡膜萎縮、脈絡膜硬化症、網膜色素線条症、遺伝性脈絡膜ジストロフィー、全脈絡膜萎縮、脈絡膜ジストロフィー（中心性輪紋状（areal or））、脳回転状萎縮（脈絡膜）、オルニチン血症、脈絡膜出血および破裂、脈絡膜出血（他に指定なし）、脈絡膜出血（娩出性）、脈絡膜剥離、網膜分離症、網膜動脈閉塞、網膜静脈閉塞、高血圧性網膜症、糖尿病性網膜症、網膜症、未熟児の網膜症、黄斑変性、標的黄斑症、網膜上膜、末梢性網膜変性、遺伝性網膜ジストロフィー、網膜色素変性症、網膜出血、網膜層の分離、中心性漿液性網膜症、網膜剥離、黄斑浮腫、緑内障 - 視神経症、緑内障疑い例 - 高眼圧症、原発開放隅角緑内障、原発閉塞隅角緑内障、飛蚊症、レベル遺伝性視神経症、視神経乳頭ドローゼン、斜視、眼麻痺、進行性外眼筋麻痺、内斜視、外斜視、屈折および遠近調節の障害、遠視、近視、乱視（astigmatism）、不同視、老視、内眼筋麻痺、弱視、レベル先天性黒内障、暗点、視覚消失、色覚異常、色覚障害、マスクン（maskun）、夜盲症、失明、河川盲目症、小眼球症、コロボーマ、赤い目、アーガイル・ロバートソン瞳孔、角膜真菌症、眼球乾燥症、無虹彩症、鎌状赤血球網膜症、眼球新生血管、網膜新生血管、網膜下新生血管；虹彩血管新生（rubeosis iritis）、炎症性疾患、慢性後側および汎ぶどう膜炎、新生物、網膜芽細胞腫、偽神経膠腫、血管新生緑内障；硝子体切除術 - 2 および水晶体切除術の組み合わせの後に生じる新生血管新生、血管疾患、網膜虚血、脈絡膜血行不全、脈絡膜血栓症、視神経の新生血管、糖尿病性黄斑浮腫、囊胞状黄斑浮腫、増殖性硝子体網膜症、ならび目または眼球傷害の浸透による新生血管新生を限定することなく含むことができる。

【0107】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、黄斑変性の処置に適する。一部の事例では、黄斑変性は、加齢性黄斑変性である。一部の事例では、方法および組成物を利用して、血管新生または滲出性（「湿性」）加齢性黄斑変性を処置することができる。他の事例では、方法および組成物を利用して、非滲出性（「乾性」）加齢性黄斑変性を処置することができる。一部の事例では、地図状萎縮を含む、進行型の乾性加齢性黄斑変性を処置することができる。一部の事例では、本明細書における方法および組成物を利用して、加齢性黄斑変性およびその関連疾患を防止することができる。他の事例では、本明細書における方法および組成物を利用して、加齢性黄斑変性およびその関連疾患の進行を遅くするまたは停止することができる。

【0108】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、シュタルガルト病の処置に適する。一部の事例では、本明細書における方法および組成物を利用して、加齢性シュタルガルト病を防止することができる。他の事例では、本明細書における方法および組成物を利用して、シュタルガルト病の進行を遅くするまたは停止することができる。

【0109】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、眼性症状を引き起こす疾患の処置に適する。本明細書に開示されている方法による処置を受け入れることができる症状の例として、次のものを挙げる：ドローゼン体積の増加、読字速度の低下、色覚の低下、網膜肥厚、網膜中心体積および / または斑感受性の増加、網膜細胞の喪失、網膜萎縮の面積の増加、S n e l l e n または E T D R S 尺度によって測定されるもの等の最高矯正視力の低下、低輝度条件下における最高矯正視力、夜間視力不良、光感受性不良、暗順応不良、対比感度、ならびに患者報告アウトカム。

10

20

30

40

50

【0110】

一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物は、疾患の症状を軽減または低下させることができる。一部の事例では、本明細書に提供されるアプタマーによる処置は、本明細書に記載されている症状のいずれかの重症度の低下をもたらすことができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーによる処置は、本明細書に記載されている症状のいずれかの進行を遅くする、停止するまたは反転することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーによる処置は、本明細書に記載されている症状のいずれかの発症を防止することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーによる処置は、経験する症状の数および重症度によって測定される通り、疾患の進行を遅くする、停止するまたは反転することができる。アプタマーが治療効果を有し得る症状および関連するエンドポイントの例として、ドルーゼン体積の増加、読字速度の低下、色覚の低下、網膜肥厚、網膜中心体積および/または斑感受性の増加、網膜細胞の喪失、網膜萎縮の面積の増加、S n e l l e n または E T D R S 尺度によって測定されるもの等の最高矯正視力の低下、低輝度条件下における最高矯正視力、夜間視力不良、光感受性不良、暗順応不良、対比感度、ならびに患者報告アウトカムが挙げられる。一部の実例では、本明細書に記載されているアプタマーによる処置は、ドルーゼン体積、読字速度、光干渉断層撮影または他の技法によって測定される網膜厚さ、網膜中心体積、網膜細胞の数および密度、眼底写真もしくは眼底自家蛍光または他の技法によって測定される網膜萎縮の面積、S n e l l e n または E T D R S 尺度によって測定されるもの等の最高矯正視力、低輝度条件下における最高矯正視力、光感受性、暗順応、対比感度、ならびに National Eye Institute Visual Function Questionnaire and Health Related Quality of Life Questionnaires のようなツールによって測定される患者報告アウトカムを含む臨床エンドポイントによって測定される有益な効果を有し得る。
。

対象

【0111】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、それを必要とする対象の処置に利用される。一部の事例では、対象は、眼疾患または障害を患う。対象は、非ヒト動物、例えば、非ヒト霊長類、家畜動物、飼育されたペットまたは実験動物となることができる。例えば、非ヒト動物は、類人猿（例えば、チンパンジー、ヒヒ、ゴリラまたはオランウータン）、旧世界ザル（例えば、アカゲザル）、新世界ザル、イヌ、ネコ、バイソン、ラクダ、ウシ、シカ、ブタ、ロバ、ウマ、ラバ、ラマ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、トナカイ、ヤク、マウス、ラット、ウサギまたは他のいずれかの非ヒト動物となることができる。一部の事例では、対象は、ヒトである。一部の事例では、ヒトは、病院または診療所における患者である。

【0112】

対象がヒトである場合、対象は、いずれかの年齢のものとなることができる。一部の事例では、対象は、加齢性眼疾患または障害（例えば、加齢性黄斑変性、シュタルガルト病）を有する。一部の事例では、対象は、約 50 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 55 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 60 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 65 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 70 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 75 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 80 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 85 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 90 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 95 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 100 歳またはそれを超える。一部の事例では、対象は、約 50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94

10

20

30

30

40

50

、95、96、97、98、99、100歳または100歳超である。一部の事例では、対象は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20歳または20歳超である。

【0113】

対象がヒトである場合、対象は、いずれかの遺伝的プロファイルを有し得る。一部の事例では、対象は、補体H因子(CFH)、補体成分3(C3)、補体成分2(C2)、補体B因子、補体I因子(CFI)、ABC4A、ELOVL4またはこれらのいずれかの組合せにおいて突然変異を有し得る。

【0114】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、本明細書に記載されている眼性症状を患う対象の処置に利用される。一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物は、本明細書に提供される眼疾患を患う対象の処置に利用される。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物は、湿性AMDを患う対象の処置に利用される。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物は、乾性AMDまたは地図状萎縮を患う対象の処置に利用される。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物は、シュタルガルト病を患う対象の処置に利用される。

10

【0115】

一部の態様では、本明細書に提供される方法および組成物を利用して、高度に活性な免疫系を有する対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物を使用して、自己免疫性疾患有する対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物を使用して、炎症性疾患有する対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に提供される方法および組成物を使用して、感染性疾患等の疾患に対する炎症性反応を起こしている対象を処置することができる。例えば、本明細書に記載されているアブタマーを使用して、発熱を有する対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーを使用して、アレルギーを有する対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーを使用して、アレルギー性応答を患う対象を処置することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアブタマーは、抗体処置に対するアレルギー性反応を経験した、および/または抗体処置に対する中和抗体を発生した対象の処置に特に有用となり得る。

20

医薬組成物

30

【0116】

眼疾患の処置のための医薬組成物が、本明細書に開示されている。一部の事例では、医薬組成物を使用して、AMDを処置することができる。一部の事例では、医薬組成物を使用して、非滲出性(乾性)AMDを処置することができる。一部の事例では、医薬組成物を使用して、地図状萎縮(進行型乾性AMD)を処置することができる。一部の事例では、医薬組成物を使用して、湿性AMDを処置することができる。一部の事例では、医薬組成物を使用して、シュタルガルト病を処置することができる。本明細書に記載されている医薬組成物は、乾性AMDの処置のための1種または複数のアブタマーを含むことができる。本明細書に記載されている医薬組成物は、湿性AMDの処置のための1種または複数のアブタマーを含むことができる。本明細書に記載されている医薬組成物は、シュタルガルト病の処置のための1種または複数のアブタマーを含むことができる。一部の事例では、1種または複数のアブタマーは、副補体経路の構成成分に結合し、これを阻害する。一部の事例では、1種または複数のアブタマーは、本明細書に記載されているfDの1種または複数の標的に結合する。一部の事例では、1種または複数のアブタマーは、本明細書に記載されているfDを阻害する。一部の事例では、組成物は、例えば、有効量のアブタマーを、単独で、または1種もしくは複数の媒体(例えば、薬学的に許容される組成物または例えば、薬学的に許容される担体)と組み合わせて含む。一部の事例では、本明細書に記載されている組成物は、1種または複数の追加的な医薬品処置と共に投与される(例えば、同時投与される、逐次投与される、または同時製剤化される)。一部の例では、本

40

50

明細書に記載されている組成物は、抗血管内皮増殖因子（V E G F）療法、抗P因子療法、抗補体成分5（C5）療法、抗補体成分3（C3）療法、抗血小板由来増殖因子（P D G F）療法、抗低酸素誘導因子1-アルファ（H I F 1_α）療法、抗F A S 療法、抗インテグリン療法または抗アンジオポエチン-2（A n g 2）療法のうち1種または複数と同時に投与される。

製剤

【0117】

本明細書に記載されている組成物は、液体製剤、固体製剤またはこれらの組合せを含むことができる。製剤の非限定的な例として、錠剤、カプセル、ゲル、ペースト、液体の溶液およびクリームを挙げることができる。本開示の組成物は、いずれかの数の賦形剤をさらに含むことができる。賦形剤は、ありとあらゆる溶媒、コーティング、調味料、着色料、潤滑剤、崩壊剤、保存料、甘味料、結合剤、希釈剤および媒体（または担体）を含むことができる。一般に、賦形剤は、本開示の治療用組成物と適合性である。医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、p H 緩衝剤、ならびに例えば、酢酸ナトリウムおよびオレイン酸トリエタノールアミン等の他の物質等、少量の無毒性補助物質を含有することもできる。
10

投薬量および投与経路

【0118】

本開示の製剤の治療用量を、それを必要とする対象に投与することができる。一部の事例では、製剤は、対象の目に投与されて、例えば、乾性A M D、地図状萎縮、湿性A M Dまたはシユタルガルト病を処置する。目への投与は、a) 外用；b) 局所的眼球送達；またはc) 全身性となることができる。外用製剤は、目に直接的に（例えば、製剤をロードした点眼薬、コンタクトレンズ）または眼瞼に（例えば、クリーム、ローション、ゲル）適用することができる。一部の事例では、外用投与は、目から遠隔の部位、例えば、四肢の皮膚に為すことができる。この形態の投与は、目によって直接的に產生されない標的に適することができる。非限定的な一例では、f Dは、脂肪細胞によって主に產生されると考えられることから、抗f Dアブタマーは、身体の非眼球領域に外用投与することができる。一部の事例では、本開示の製剤は、局所的眼球送達によって投与される。局所的眼球送達の非限定的な例として、硝子体内（I V T）、前房内（i n t r a c a m a r e l）、結膜下、テノン下（s u b t e n o n）、眼球後、後側強膜近傍（j u x t a s c l e r a l）および眼球周囲が挙げられる。一部の事例では、本開示の製剤は、硝子体内投与（I V T）によって送達される。局所的眼球送達は、一般に、液体製剤の注射が関与し得る。他の事例では、本開示の製剤は、全身性投与される。全身性投与は、経口投与が関与し得る。一部の事例では、全身性投与は、静脈内投与、皮下投与、注入、植え込みその他となり得る。
20

【0119】

本明細書に記載されている医薬組成物の送達に適した他の製剤は、眼部疾患の処置の際に植え込まれる生分解性マイクロサイズポリマー系、例えば、マイクロデバイス、マイクロ粒子もしくはスポンジまたは他の緩徐放出経強膜デバイスの外科的植え込みによる、または眼球送達デバイス、例えば、ポリマーコンタクトレンズ持続性送達デバイスによる、徐放ゲルまたはポリマー製剤を含むことができる。一部の事例では、製剤は、ポリマーゲル、自己組織化ゲル、耐久性インプラント、溶出インプラント、生分解性マトリックスまたは生分解性ポリマーである。一部の事例では、製剤は、目の表面から後側へと組成物を駆動するための電流を使用したイオントフォレーシスによって投与することができる。一部の事例では、製剤は、硝子体内リザーバ、硝子体外リザーバまたはこれらの組合せを備える外科的に植えられたポートによって投与することができる。植え込み式眼球デバイスの例は、B a u s c h & L o m b によって開発されたD u r a s e r t（商標）技術、O n D e m a n d T h e r a p e u t i c s によって開発されたO D T x デバイス、F o r S i g h t V I S I O N 4 によって開発されたポート送達系、およびR e p l e n i s h , I n c . によって開発されたR e p l e n i s h M i c r o P u m p（商標）系を限定することなく含むことができる。
30
40
50

【0120】

一部の事例では、ナノ球体、ナノ粒子、ナノカプセル、リポソーム、ナノミセルおよびデンドリマーを含む、ナノテクノロジーを使用して、医薬組成物を送達することができる。

【0121】

本開示の組成物は、各日1回または2回以上投与することができる。一部の事例では、組成物は、単一用量（すなわち、単回使用）として投与される。この例では、単一用量は、治療的となり得る。他の事例では、組成物は、連続的に投与することができる（例えば、処置レジメンの持続時間において中断せず毎日服用される）。一部の事例では、処置レジメン（regime）は、1週間未満、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間または1ヶ月間超となり得る。一部の事例では、組成物は、少なくとも12週間の期間にわたって投与される。他の事例では、組成物は、1日間、少なくとも2日間連続、少なくとも3日間連続、少なくとも4日間連続、少なくとも5日間連続、少なくとも6日間連続、少なくとも7日間連続、少なくとも8日間連続、少なくとも9日間連続、少なくとも10日間連続または少なくとも10日間超連続で投与される。一部の事例では、治療有効量は、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回、1週間に7回、1週間に8回、1週間に9回、1週間に10回、1週間に11回、1週間に12回、1週間に13回、1週間に14回、1週間に15回、1週間に16回、1週間に17回、1週間に18回、1週間に19回、1週間に20回、1週間に25回、1週間に30回、1週間に35回、1週間に40回または1週間に40回超投与することができる。一部の事例では、治療有効量は、1日に1回、1日に2回、1日に3回、1日に4回、1日に5回、1日に6回、1日に7回、1日に8回、1日に9回、1日に10回または1日に10回超投与することができる。一部の事例では、組成物は、少なくとも1日2回投与される。さらなる事例では、組成物は、少なくとも1時間毎、少なくとも2時間毎、少なくとも3時間毎、少なくとも4時間毎、少なくとも5時間毎、少なくとも6時間毎、少なくとも7時間毎、少なくとも8時間毎、少なくとも9時間毎、少なくとも10時間毎、少なくとも11時間毎、少なくとも12時間毎、少なくとも13時間毎、少なくとも14時間毎、少なくとも15時間毎、少なくとも16時間毎、少なくとも17時間毎、少なくとも18時間毎、少なくとも19時間毎、少なくとも20時間毎、少なくとも21時間毎、少なくとも22時間毎、少なくとも23時間毎または少なくとも毎日に投与される。

【0122】

本明細書に記載されているアプタマーは、薬物の治療的硝子体内濃度をより長い期間持続し、これにより、より低頻度の投与を要求することができるため、抗体よりも特に有利となることができる。例えば、配列番号71に従った重鎖可変領域および配列番号72に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD F abは、4週間毎(q4w)に投薬された場合に10mgで、地図状萎縮の処置のための臨床有効性を示すことができるが、8週間毎(q8w)では示すことができない。本明細書に記載されているアプタマーは、配列番号71に従った重鎖可変領域および配列番号72に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD F abおよび他の抗体療法よりも、長い眼内半減期を有する、および/または薬物の治療的硝子体内濃度をより長い期間持続するため、より低頻度で投薬することができる。一部の事例では、アプタマーは、少なくとも4週間毎(q4w)、5週間毎(q5w)、6週間毎(q6w)、7週間毎(q7w)、8週間毎(q8w)、9週間毎(q9w)、10週間毎(q10w)、12週間毎(q12w)またはq12w超で投薬される。

【0123】

一部の態様では、治療有効量のアプタマーが投与される。「治療有効量」または「治療有効用量」は、本明細書において互換的に使用されており、対象において治療的または所望の応答を誘発する治療剤（例えば、アプタマー）の量を指す。組成物の治療有効量は、投与経路に依存し得る。全身性投与の場合、治療有効量は、約10mg/kg～約100mg/kgとなり得る。一部の事例では、治療有効量は、全身性投与に関して約10μg

10

20

30

40

50

/ kg ~ 約 1 0 0 0 μ g / kg となり得る。硝子体内投与に関して、治療有効量は、片目当たり約 2 5 μ l ~ 約 1 0 0 μ l 容量における約 0 . 0 1 m g ~ 約 1 5 0 m g となり得る。

方法

【 0 1 2 4 】

眼疾患の処置のための方法が、本明細書に開示されている。一部の事例では、眼疾患は、乾性加齢性黄斑変性または地図状萎縮である。一部の事例では、方法は、治療有効量の組成物を対象に投与して、疾患を処置するステップが関与する。一部の事例では、組成物は、本明細書に記載されている 1 種または複数のアプタマーを含む。アプタマーは、本明細書に記載されている f D に関連する機能を阻害することができる。方法は、病院または診療所で行うことができ、例えば、医薬組成物は、医療従事者によって投与され得る。他の事例では、医薬組成物は、対象によって自己投与され得る。処置は、眼疾患（例えば、A M D ）との対象の診断と同時に開始することができる。さらなる処置が必要とされる場合には、後続用量の組成物の投与、例えば、8 週間毎の投与のための追跡調査の予約が予定されてよい。

アプタマーを生成する方法

S E L E X (商標) 方法

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載されているアプタマーは、アプタマーの生成に適したいずれかの方法によって生成することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、「試験管内進化法 (S y s t e m a t i c E v o l u t i o n o f L i g a n d s b y E x p o n e n t i a l E n r i c h m e n t) 」（「S E L E X (商標) 」）として公知のプロセスによって生成される。S E L E X (商標) プロセスは、例えば、これらのそれぞれを参照により本明細書に組み込む、1 9 9 0 年 6 月 1 1 日に出願され、現在放棄された米国特許出願第 0 7 / 5 3 6 , 4 2 8 号、米国特許第 5 , 4 7 5 , 0 9 6 号、表題「 N u c l e i c A c i d L i g a n d s 」、および米国特許第 5 , 2 7 0 , 1 6 3 号 (W O 9 1 / 1 9 8 1 3 も参照) 、表題「 N u c l e i c A c i d L i g a n d s 」に記載されている。反復性サイクルの選択および増幅を行うことにより、S E L E X (商標) を使用して、いざれか所望のレベルの標的結合親和性を有するアプタマーを得ることができる。

【 0 1 2 6 】

S E L E X (商標) 方法は、出発点として、ランダム化された配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチドの大型ライブラリーまたはプールに頼る。オリゴヌクレオチドは、修飾または無修飾 D N A 、 R N A または D N A / R N A ハイブリッドとなることができる。一部の例では、プールは、1 0 0 % ランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の例では、プールは、ランダム化された配列内に取り込まれた、少なくとも 1 個の固定された配列および / または保存された配列を含有するランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の例では、プールは、オリゴヌクレオチドプールの全分子によって共有される配列を含むことができる、その 5 ' および / または 3 ' 端に少なくとも 1 個の固定された配列および / または保存された配列を含有するランダムまたは部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。固定された配列は、C p G モチーフ、P C R プライマーのためのハイブリダイゼーション部位、R N A ポリメラーゼのためのプロモーター配列（例えば、T 3 、 T 4 、 T 7 および S P 6 ）、規定された末端システム構造内のライブラリーのランダム化された領域を提示するためのステムを形成するための配列、制限部位、またはポリ A もしくはポリ T トラクト等のホモポリマー配列、触媒コア、親和性カラムへの選択的結合のための部位、ならびに目的のオリゴヌクレオチドのクローニングおよび / または配列決定を容易にするための他の配列等、予め選択された目的のために取り込まれた、プールにおけるオリゴヌクレオチドに共通している配列である。保存された配列は、同じ標的に結合するいくつかのアプタマーによって共有される、先に記載された固定された配列以外の配列である。

10

20

30

40

50

【0127】

プールのオリゴヌクレオチドは、ランダム化された配列部分と共に、効率的増幅に必要な固定された配列を含むことができる。典型的には、出発プールのオリゴヌクレオチドは、30～50個のランダムヌクレオチドの内部領域を挟む、固定された5'および3'末端配列を含有する。ランダム化されたヌクレオチドは、化学合成、およびランダムに切断された細胞核酸からのサイズ選択を含むいくつかの仕方で产生することができる。選択／増幅反復の前またはその最中における突然変異誘発によって、被験核酸における配列変種を導入または増加させることもできる。

【0128】

オリゴヌクレオチドのランダム配列部分は、いずれかの長さのものとなることができ、リボヌクレオチドおよび／またはデオキシリボヌクレオチドを含むことができ、修飾または非天然ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含むことができる。自動DNA合成機器において実行される典型的な合成は、大部分のSELLEX（商標）実験に十分な数である、 $10^{14} \sim 10^{16}$ 個の個々の分子を生じる。配列設計におけるランダム配列の十分に大型な領域は、各合成分子が、特有の配列を表す可能性が高いという見込みを増加させる。

10

【0129】

オリゴヌクレオチドの出発ライプラリーは、DNA合成機における自動化学合成によって生成することができる。ランダム化された配列を合成するために、合成プロセスにおける各ヌクレオチド付加ステップにおいて、全4種のヌクレオチドの混合物が加えられ、ランダムなヌクレオチド取り込みを可能にする。上述の通り、一部の事例では、ランダムオリゴヌクレオチドは、完全にランダムな配列を含む；しかし、他の事例では、ランダムオリゴヌクレオチドは、非ランダムまたは部分的にランダムな配列のストレッチを含むことができる。部分的にランダムな配列は、各付加ステップにおいて4種のヌクレオチドを異なるモル比で加えることにより作製することができる。

20

【0130】

オリゴヌクレオチドの出発ライプラリーは、RNA、DNA、置換されたRNAもしくはDNA、またはこれらの組合せとなることができる。出発ライプラリーとしてRNAライプラリーが使用されるべき実例では、これは典型的に、DNAライプラリーを合成し、任意選択でPCR増幅し、次いでT7 RNAポリメラーゼまたは修飾T7 RNAポリメラーゼ（例えば、突然変異Y639LおよびH784Aを有するT7 RNAポリメラーゼ）を使用してin vitroでDNAライプラリーを転写し、転写されたライプラリーを精製することにより生成される。次に、核酸ライプラリーは、結合に有利な条件下で標的と混合され、同じ一般選択スキームを使用した、結合、分割および増幅の段階的反復に付されて、結合親和性および選択性の実質的にいかなる所望の判断基準も達成する。より詳細には、核酸の出発プールを含有する混合物から開始して、SELLEX（商標）方法は、(a)結合に有利な条件下で標的と混合物とを接触させるステップと；(b)標的分子に特異的に結合した核酸から結合していない核酸を分割するステップと；(c)核酸-標的複合体を解離するステップと；(d)核酸-標的複合体から解離された核酸を増幅して、リガンド濃縮された核酸混合物を得るステップと；(e)標的分子に対する高度に特異的で高い親和性の核酸リガンドを得るために望まれるだけの数のサイクルにより、結合、分割、解離および増幅のステップを反復するステップとを含む。RNAアプタマーが選択されている実例では、SELLEX（商標）方法は、(i)ステップ(d)における増幅前に、核酸-標的複合体から解離された核酸を逆転写するステップと；(ii)プロセス再開前に、ステップ(d)由来の増幅された核酸を転写するステップとをさらに含む。

30

【0131】

多数の可能な配列および構造を含有する核酸混合物内には、所与の標的に対する広範囲の結合親和性が存在する。標的に対しより高い親和性（より低い解離定数）を有するものは、標的に結合する可能性が最も高い。分割、解離および増幅後に、第2の核酸混合物が生成され、より高い結合親和性の候補が濃縮される。その結果得られる核酸混合物が、单

40

50

ーまたは数個の配列で主に構成されるようになるまで、追加的なラウンドの選択は、最良のリガンドを次第に支持する。これを次に、クローニングし、配列決定し、1) 標的結合親和性；および2) 標的機能をもたらす能力についてリガンドまたはアプタマーとして個々に検査することができる。

【0132】

選択および増幅のサイクルは、所望の目標が達成されるまで繰り返される。最も一般的な事例では、選択／増幅は、サイクル繰り返しにおいて結合強度における有意な改善が達成されなくなるまで続けられる。方法は典型的に、およそ 10^{14} 個の異なる核酸種のサンプリングに使用されるが、約 10^{18} 個もの異なる核酸種のサンプリングに使用されてもよい。一般に、核酸アプタマー分子は、5～20サイクル手順において選択される。

10

【0133】

一部の事例では、本開示のアプタマーは、上述の通り S E L E X (商標) 方法を使用して生成される。他の事例では、本開示のアプタマーは、S E L E X (商標) 方法のいずれかの修飾またはバリエントを使用して生成される。

【0134】

一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、標的タンパク質の活性または機能に関する特異的部位を選択するための方法論を使用して生成された。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、所望の機能または所望の結合部位を有するアプタマーを選択する確率を改善する方法を使用して選択することができる。一部の事例では、本明細書に記載されているアプタマーは、fDに関連する機能を阻害する抗fD治療用抗体のエピトープとして機能するfDの領域に結合するアプタマーを選択する確率を増加させる方法を使用して生成される。

20

【実施例】

【0135】

次の実施例は、本発明の様々な実施形態を説明する目的のために記されており、いかなる様式であっても本発明を限定することを意図しない。本実施例は、本明細書に記載されている方法と共に、本明細書にて好まれる実施形態を代表し、例示的であり、本発明の範囲における限定として企図されない。当業者であれば、特許請求の範囲によって規定される本発明の精神の内に包含されるその変化および他の使用を想定するであろう。

30

(実施例1)

fDに対する修飾RNAアプタマーの同定

A. 抗D因子アプタマーの選択

【0136】

図3Aに描写される通り、ビルトイインステム領域を含有する定常領域で挟まれた30ヌクレオチドランダム領域で構成されるN30ライブラリー(N30S)を使用して、抗D因子(fD)アプタマーを同定した。イタリック体の配列は、フォワードおよびリバースプライマー結合部位を表す。ビルトイインステム領域を太字で示す。図3Bは、リバースオリゴがハイブリダイズした、N30Sライブラリーの表現を描写する。ヌクレアーゼ安定性のため、ライブラリーは、2'F-Gおよび2'-O-メチルA/C/Uで構成された。図3Cは、標的fDに対する選択のためのN30Sライブラリーの生成に使用される修飾ヌクレオチドの構造を描写する。簡潔にするために、ヌクレオチド三リン酸ではなく、ヌクレオシドを示す。

40

【0137】

ライブラリー配列(下線を引いた配列は、ビルトイインステムを表す)およびライブラリーの増幅に使用されるオリゴの配列を、表2に記載する。

【表2】

表2.ライブラリー配列およびライブラリーの増幅に使用されるオリゴの配列

配列番号		配列(5'から3')
配列番号 93	ライブラリー配列 (総ライブラリー長: 89塩基)	GGGAGTGTGTACGAGGCATT <u>AGGCCGCC-</u> N30- <u>GGCGGCTTGATACTGATCGCCCTAGAAGC</u>
配列番号 64	N30S.F	TCTTAATACGACTCACTATAGGGAGTGTGTA CGAGGCATTA
配列番号 65	N30S.R	GCTTCTAGGGCGATCAAGTATCA

10

【0138】

ほぼ 10^{14} 個の二本鎖 DNA (dsDNA) 分子のプールから出発ライブラリーを転写した。クレノウ exo (-) DNA ポリメラーゼ、プールフォワードプライマー (N30S.F)、およびライブラリーをコードする合成一本鎖 DNA (ssDNA) 分子を使用したプライマー伸長によって、dsDNA ライブラリーを生成した。dsDNA をその後、効率的な転写を容易にするように最適化されたバッファーにおいて、2'F-GTP、2'-O-メチル ATP / CTP / UTP の混合物、および突然変異 Y639L および H784A を有する T7 RNA ポリメラーゼのバリエントを使用した転写により、100% 骨格修飾 RNA へと変換した。転写後に、RNA を DNase で処置して、鋳型 dsDNA を除去し、精製した。

20

【0139】

His タグ付き組換えヒト補体 D 因子タンパク質および磁気 His 捕捉ビーズの使用により、fD を標的とする選択を容易にした。手短に説明すると、ビーズ (カップリングした標的タンパク質の量により変動する量) を、固定化バッファー (50 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0、300 mM NaCl、0.01% Tween-20) で 3 回洗浄し、50 μL の固定化バッファーに再懸濁した。次に、固定化バッファーにおける His タグ付き組換え fD をビーズに添加し、室温で 30 分間インキュベートした。標的タンパク質の量は、ラウンドにより変動した (表3)。ビーズを、結合バッファー SB1T (40 mM HEPES、pH 7.5、125 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.05% Tween-20) で 3 回洗浄して、全ての結合していないタンパク質を除去し、次いで、1 μg/μl ssDNA および 0.1% BSA を含有する 50 μL SB1T バッファーに再懸濁した。

30

【0140】

選択の第 1 ラウンドのため、ほぼ 3 ナノモルのラウンド 0 RNA プール、ほぼ 10^{14} 個の配列を使用した。各ラウンドに先立ち、80°で 5 分間加熱することにより、ライブラリーを熱的に平衡化し、1.5 倍モル過剰のリバースプライマー (N30S.R) の存在下において室温で 15 分間冷却して、ライブラリーをリフォールディングさせ、同時に、プールの 3' 端を遮断した。復元後に、反応液の最終容量を、1 μg/ml ssDNA および 0.1% BSA を補充した SB1T において 50 μL に調整した。

40

【0141】

第 1 ラウンドのため、ライブラリーを、ビーズに固定化された fD に添加し、断続的に混合しつつ、37°で 1 時間インキュベートした。1 時間後に、3 × 1 ml SB1T バッファーを使用してビーズを洗浄して、結合していないアブタマーを除去した。ラウンド 0 のため、各洗浄ステップを 5 分間インキュベートした。洗浄後に、200 μL 溶出バッファー (SB1T バッファーにおける 2M ゲアニジン-HCl) を 2 回 (総容量 400 μL) 使用して、fD 結合アブタマーを溶出した。40 μL の 3M NaOAc、pH 5.2、1 ml のエタノールおよび 2 μl のグリコーゲンを添加し、-80°で 15 分間インキュベートすることにより、400 μL の溶出バッファーに溶出されたアブタマーを沈殿

50

させた。Super Script IV 逆転写酵素を使用した逆転写によって、回収されたライブラリーをDNAに変換し、ssDNAをその後、PCRによって増幅した。その結果得られるdsDNAライブラリーをその後、上述の通り転写により修飾RNAへと再び変換した。DNase処理され、精製されたRNAを後続ラウンドに使用した。

【0142】

後続ラウンドのため、選択が進行するにつれて、洗浄時間および洗浄回数を変動させ、インプットRNAは25ピコモルに固定されたままにし、タンパク質インプットを変動させた(表3)。第1ラウンド後に、全後続ラウンドに負の選択ステップを含めた。負の選択のため、先に記載された通りにプールを調製し、先ず、SB1Tバッファーにおいて1時間37で無標識ビーズと共にインキュベートした。次に、ビーズをスピンドウンし、非標識ビーズに結合しなかった分子を含有する上清を、fD標識ビーズと共にさらに1時間37でインキュベートした。

B. 選択の進行の評価

【0143】

フローサイトメトリーを使用して、選択の進行を評価した。このようなアッセイのため、各ラウンド由来のRNAを先ず、Dy light(登録商標)650で標識された2'OMe RNAで構成される逆相補体オリゴヌクレオチド(Dy650-N30S.R.OMe)とハイブリダイズさせた。手短に説明すると、ライブラリーを、1.5倍モル過剰のDy650-N30S.R.OMeと組み合わせ、80で6分間加熱し、室温で15分間冷却させ、その後、これを、0.1%BSAおよび1μg/μl ssDNAを含有するSB1Tバッファーにおいて、fDで標識したビーズと共にインキュベートした。1時間37でのインキュベーション後に、ビーズをSB1Tで3回洗浄し、SB1Tバッファーに再懸濁し、フローサイトメトリーによって解析した。図4に示す通り、ラウンド進行に伴う蛍光シグナルにおける改善が、早くもラウンド3で観察された。ラウンド6後に、ラウンド8まで結合シグナルの変化はほとんどなかった。「ビーズ」は、標識RNAの非存在下でのfD標識ビーズのシグナルを指す。フローサイトメトリーに基づくアッセイを使用して、fDに対するラウンド6、7および8の見かけ上の親和性も測定し、8~45nMの範囲内のK_dを明らかにした(図6A、表5)。

C. クローンの選択、精製および特徴付け

【0144】

選択のラウンド6、7および8から回収された、濃縮されたアプタマー集団を配列決定して、個々の機能的クローンを同定した。配列類似性に基づき配列をファミリーへとグループ分けした。ラウンド6、7および8の解析から、7個の個々のクローンを検査のために選択した。これらのクローンに対応する個々の細菌コロニーを採取し、QIAGEN Mini Prepキットを使用して、プラスミドを単離した。ライブラリーのFおよびRオリゴを使用して、クローン毎の配列をPCR増幅した。先に記載したプロトコールを使用して、PCR産物から各全長クローンを転写した。クローンをゲル精製し、さらなる解析に使用した。

【0145】

検査したクローンの概要を表4に示す。簡潔にするために、配列C1~C3から定常領域を省略した。

D. 結合に関する個々のクローンのアッセイ

【0146】

選択の個々のラウンドのための上述と同様の様式で、フローサイトメトリーによって個々のクローンをアッセイした。クローンC1~C3の場合、上述の通り、Dy650-N30S.R.OMeへのハイブリダイゼーションにより各アプタマーの蛍光標識を達成した。

【0147】

初期アッセイとして、1時間37にて100nMでインキュベートされた場合の、ビーズに固定化されたfDを使用して、fDへの各アプタマーの結合を評価した。図5に示

10

20

30

30

40

50

す通り、全アプタマーが、fDビーズへの有意なレベルの結合を表示した。標的がないまたは非特異的標的、ヒト増殖因子を有するビーズを使用して同様の実験が行われた場合、結合は観察されなかった。

E. ビーズにおける見かけ上のK_dの測定

【0148】

フローサイトメトリーを使用して、fDに対する個々のアプタマーそれぞれの結合親和性を測定した。各アプタマーの系列希釈した溶液を使用した以外は先に記載された通りに、再度アッセイを行った。1時間37でのインキュベーション後に、ビーズを洗浄し、フローサイトメトリーを使用して蛍光を測定し、および中央蛍光強度対アプタマー濃度のプロット(図6B)を使用して、クローン毎の見かけ上の結合定数を決定した。等式Y = B_ma * X / (K_D + X)を使用して、見かけ上のK_d値を得た。クローン毎の見かけ上の結合定数は、表5にも報告されている。fDに対するアプタマーの見かけ上の親和性は、およそ3~20nMに及んだ。

F. ラウンドまたは個々のクローンによる競合アッセイ

【0149】

配列番号71に従った重鎖可変領域および配列番号72に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD Fabのクローン(以降「AFD」)を使用して、競合結合アッセイを行って、結合をさらに評価した。競合アッセイのため、fDで標識されたビーズを先ず、50μlのSB1T(ssDNAおよびBSA含有)において、50nMのラウンドまたは個々のアプタマーと共に30分間37でインキュベートした。次に、ビーズをSB1Tで洗浄して、結合していないアプタマーを除去し、100nM AFDありまたはなしで、30分間37でインキュベートした。インキュベーション後に、ビーズをSB1Tで3回洗浄し、フローサイトメトリーによってアッセイした(図7)。これらのアッセイは、ラウンド7および8集団の両方ならびに選択された全アプタマーに対して、AFDの結合が、アプタマーシグナルをほぼ75%~ほぼ90%低下させたことを明らかにした。上述の通りアプタマーがAFDによって十分に打ち負かされた場合、斯かるアプタマーは、fDのエキソサイトまたは自己阻害ループに結合していると推定された。

【表3】

表3.選択の詳細

ラウンド	インプット ライブラリー ピコモル/濃度	標的タンパク質 ピコモル/濃度	結合 バッファー	洗浄 バッファー	洗浄	サイクル 数	NGS
0	1000pm/40μM	40pm/0.4μM	SB1T	SB1T	3X5分間	22	あり
1	25pm/1μM	40pm/0.4μM	SB1T	SB1T	3X5分間	22	あり
2	25pm/1μM	40pm/0.4μM	SB1T	SB1T	3X5分間	20	あり
3	25pm/1μM	4pm/0.04μM	SB1T	SB1T	3X5分間	18	あり
4	25pm/1μM	8pm/0.08μM	SB1T	SB1T	3X10分間	18	あり
5	25pm/1μM	8pm/0.08μM	SB1T	SB1T	3X10分間	16	あり
6	25pm/1μM	4pm/0.04μM	HBSS	SB1T	4X15分間	14	あり
7	25pm/1μM	4pm/0.04μM	HBSS	HBSS+SB1T	4X15分間	14	あり
8	25pm/1μM	4pm/0.04μM	SB1T	SB1T	4X15分間	12	あり

10

20

30

40

【表4-1】

表4.選択fDアプタマーのランダム領域由来配列の配列

配列番号	化合物名	配列(5'から3')
配列番号 1 修飾あり	C1	GGGAGUGUGUACGAGGCAUUAGGCCGCCA CCCAAACUGCAGGUCCUCGUAGUCUGCCUG GCGGCUUUGAUACUUGAUUCGCCCCUAGAAC 式中、Gは、2' Fであり、A、CおよびUは、2' OMe修飾RNAである
配列番号 2 修飾あり	C2	GGGAGUGUGUACGAGGCAUUAGUCCGCCG AAGUCUUUUGGCUCGGUUUUUCAAGGUC GGCGGCUUUGAUACUUGAUUCGCCCCUAGAAC

10

【表4-2】

配列番号 3 修飾あり	C3	式中、Gは、2' Fであり、A、CおよびUは、2' OMe修飾RNAである GGGAGUGUGUACGAGGCAUUAGGCCGCCA CCUCGUUUGAUUGCAGGUUGUUCGGCCGCG GGCGGCUUUGAUACUUGAUUCGCCCCUAGAAC 式中、Gは、2' Fであり、A、CおよびUは、2' OMe修飾RNAである
----------------	----	---

20

【表5】

表5.選択されたラウンドの親和性定数およびfDに対する選択において生成されたアプタマー

ラウンド/クローン	K _d (nM)
Rd 6	34.4
Rd 7	45.1
Rd 8	8.8
C1	12.2
C2	20.6
C3	8.5

30

(実施例2)

ヒト補体D因子に対するDNAアプタマーの選択

【0150】

規定された固定された配列で挟まれた40ヌクレオチドランダム領域で構成されるアプタマーライブライマーを使用した選択によって、ヒト補体D因子(fD)に対するアプタマーを単離した(表6を参照)。ライブライマーは、無修飾DNAで構成された。固相DNA合成によって選択ライブライマーを产生し、使用に先立ちゲル精製した。

【表6】

表6.アプタマーライブラーの構築および複製に使用されたオリゴヌクレオチド

配列番号	化合物	配列(5'から3')
配列番号 67	選択ライブラー*	GTGACGACTGACATATCTGC- NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNN- CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 68	フォワードプライマー	GTGACGACTGACATATCTGC
配列番号 69	リバースプライマー1	AGCACTCAGACTCAACTACG
配列番号 70 および91	リバースプライマー2**	AAAAAAAAAAAAAA-S9- AGCACTCAGACT CAACTACG
		*「N」は、この位置におけるヌクレオチドが、ランダム化されており、各ランダム化位置において各塩基がほぼ25%の確率で、出発ライブラーにおいてA、G、CまたはTとなり得ることを示す。 **「S9」は、ヘキサエチレングリコールスペーサーを表す。

【0151】

選択の各ラウンドに先立ち、リン酸緩衝食塩水および0.01%Tween-20からなるバッファーにおいて、200 μlの反応容量で10 μlのビーズに3 μgのタンパク質を添加し、1時間4℃で回転しつつインキュベートすることにより、組換え6×Histag付き（配列番号92）ヒトD因子を、Ni-NTA磁気ビーズに固定化した。このインキュベーションに続いて、磁気スタンドを使用してビーズを捕捉し、50 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl、6 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、2.5 mM CaCl₂、0.01%Tween-20および10 mMイミダゾールからなる選択バッファーで3回洗浄し、次いで選択バッファーを除去した。表7に概要を述べる通りに、補体fDに対するDNAアプタマーの選択を実行した。選択の各ラウンドのため、ライブラーの5'末端においてDNAライブラーを³²Pで放射標識して、選択サイクルにおけるライブラーの追跡を容易にした。典型的には、各ラウンドにおいて>20,000 CPMのライブラーをトレーサーとして使用し、残っているインプットDNAを非標識とした。選択の各ラウンドのため、DNAライブラーを90℃まで5分間加熱し、次いで氷上で5分間冷却し、室温でさらに20分間置いた。このライブラー復元ステップの後に、ビーズに固定化されたfDをライブラー混合物に再懸濁することにより、選択ラウンドを開始した。次に、ライブラーおよびfDを30分間37℃で回転しつつインキュベートした。この結合反応の後に、表7に記載されている通り、固定化されたfDを含有するビーズを洗浄し、次いでfD結合アプタマーを溶出させた。選択の第1ラウンドにおいて、ライブラーは、およそ1~2×10¹⁵個の特有の配列で構成された。

10

20

30

【表7-1】

表7.選択条件

ラウンド	選択ライブラリー インプット		標的タンパク質		洗浄条件	溶出条件
	ピコモル	濃度 (μM)	ピコモル	濃度 (μM)		
1	3000	15	1000	5	200 μl, 37° C, 1分 間ずつ3x	E1: 200 μl, 90°C, 10 分間; E2: 200 μl, 90°C, 10 分間
2	600	15	200	5	40 μl, 37° C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 μl, 90°C, 10分間; E2: 40 μl, 90°C, 10分間; E3: 40 μl, 90°C, 10分間
3	600	15	200	5	40 μl, 37° C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 μl, 室温 , 10分間; E2: 40 μl, 90°C, 10分間; E3: 40 μl, 90°C, 10分間

10

20

【表7-2】

4	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	
4- 反復	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	10
5	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	
6	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	20
7	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	
8	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	30
9	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	
10	600	15	200	5	40 µl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 µl, 室温 , 10分間; E2: 40 µl, 90°C, 10分間; E3: 40 µl, 90°C, 10分間	40
11	600	15	200	5	40 µl,	E1: 40 µl, 室温	

【表7-3】

					37°C, 1分 間ずつ3x	, 10分間; E2: 40 μl, 90°C, 10分間; E3: 40 μl, 90°C, 10分間
12	600	15	200	5	40 μl, 37°C, 1分 間ずつ3x	E1: 40 μl, 室温 , 10分間; E2: 40 μl, 90°C, 10分間; E3: 40 μl, 90°C, 10分間

10

20

30

40

【0152】

溶出1において回収されたDNAをPCR1のための鋳型として使用して、選択ラウンド毎のアーカイブプールを生成した。PCR1由来の産物をその後、バルクPCR2増幅のための鋳型材料として使用して、選択のさらなるラウンド、結合アッセイおよび配列決定プールのためにライプラリーを再生した。5 μL溶出1溶離液、500 nMフォワードプライマー、500 nMリバースプライマー1、200 μM dNTP、1×PCRバッファーおよび2.5 uTaq DNAポリメラーゼを含有する50 μL容量においてPCR反応をセットアップした。95 1分間、続いて繰り返しサイクルの95 30秒間、55 45秒間および72 55秒間ににおいて、反応をサイクリングした。さらにはPCRサイクル由来のアリコードを解析して、適切な産物サイズおよび収量をチェックすることにより、ラウンド毎の増幅サイクルの最適数を決定した。初期選択ラウンド(1~4)において、複数反応に続いてプールを行うことにより、溶出1溶離液容量全体をPCR1増幅に使用した。後のラウンドにおいて、溶出1溶離液のほぼ10%をPCR1に使用した。最適であるとアガロースゲルによって決定された、増幅サイクルからプールされた反応液を水に1:50希釈し、-20でアーカイブとした。

【0153】

選択の次のラウンドのためのライプラリーを生成するために、希釈されたPCR1産物を、選択溶離液の代わりに鋳型として使用し、フォワードプライマーと遮断されたリバースプライマー2を使用して、PCR1と同様のサイクル条件下でPCRを実行した。サイクリング後に、PCR反応液をプールし、エタノール沈殿によって濃縮した。次に、使用に先立ち、濃縮されたPCR反応液をゲル精製し、センス鎖(80ヌクレオチド産物)が溶出されて、選択の次のラウンドに繰り越した。

【0154】

100 nMインプットDNAおよび5 μMヒトfDと結合したライプラリーの分率を測定することにより、二重フィルターニトロセルロースフィルター結合により選択の進行をモニターした。表8に示す通り、結合したライプラリーの分率は、選択の経過にわたり増加し、選択がラウンド0から9に進行するにつれて、ライプラリーにおけるfDアプタマーの濃縮を示した。

【表8】

表8.ヒトfDのDNA選択の進行

ラウンド	結合したライブラリーの%
0	0.88
1	1.13
2	1.22
3	1.68
4	2.55
5	3.03
6	11.26
7	9.56
8	10.99
9	14.64

10

20

【0155】

ディープシークエンシングによって、ラウンド2～8由来の選択されたDNAプールを解析した。ラウンド8において、溶出1および溶出2の両方をそれぞれ別々のプールR8E1およびR8E2として配列決定した。アーカイブとされた一次PCR産物を鋳型として使用して、個々の選択ラウンドのための配列決定ライブラリーを調製し、マルチプレックスIllumina DNA配列決定のための結合およびバーコード化配列を含むよう修飾されたフォワードおよびリバースライブラリープライマーを使用したPCR反応において増幅した。150bpペアードエンド読み取りデータキットを使用したIllumina MiSeqシークエンサーにおいて、配列決定反応を実行した。未加工の配列決定データは、1個が各DNA鎖に対応する、2個のFASTQフォーマットファイルにおけるペアードエンド配列および読み取りデータ品質データからなる。

30

【0156】

Cutadaptソフトウェアパッケージを使用して、それぞれフォワードおよびリバース読み取りデータから、フォワードおよびリバースライブラリープライマー配列をトリミングした。次に、USEARCHソフトウェアパッケージを使用して、トリミングされたフォワードおよびリバース読み取りデータをコンセンサスセンス重複配列に統合した。重複領域において完全相補性を保有した配列のみを順送りにして、ランダムライブラリードメインのみのセンス読み取りデータを含有するFASTAファイルを得た。次に、USEARCHを使用して、このランダムドメイン配列ファイルを脱複製(de-rePLICATE)して、各特有の配列のコピー数を注記する配列識別子を有する特有の配列のみを含有するFASTAファイルを產生した。読み取りデータ統合後の配列の総数を、脱複製後の特有の配列の数と比較することにより、選択の各ラウンドの配列多様性を決定した。このデータを表9に要約する。

40

【0157】

特有の配列読み取りデータをExcelにインポートし、カスタムVBAスクリプトを使用して、コピー>1を有する各配列の塩基組成を決定することにより、塩基頻度の解析を計算した。次に、濃縮されたラウンドの全体的塩基組成を、目的のラウンドにおける特有の配列塩基組成の平均および標準偏差として表した。

【0158】

目的の全ラウンドについて特有の配列読み取りデータをExcelにインポートするこ

50

とにより、交差ラウンド配列解析を行った。配列データランク付けのための参照として使用されるように、典型的には最新の選択ラウンドである、1種の配列ラウンドを問い合わせラウンドとして選択した。ビルトイン `Excel` 関数を使用して、他の配列決定ラウンドにわたって問い合わせ配列を交差参照して、ラウンドにわたる所与の配列の分率的表現を示す表を構築した。

【0159】

MUSCLE ソフトウェアパッケージにより処理される 50 個の最も豊富な特有の配列を使用して、複数配列アライメント (MSA) を実行した。その結果得られる FASTA フォーマットのアライメントファイルを、WebLogo ソフトウェアパッケージを使用して配列ロゴに変換した。

10

【表 9】

表9.ラウンド2~8由来の配列データの概要

	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8E1	R8E2
読み取り データ	463925	439335	478898	427651	344841	391016	369265	411913
特有	456717	432321	471277	421294	297829	283716	230414	324189
%	98%	98%	98%	99%	86%	73%	62%	79%
特有								

20

【0160】

配列多様性は、ラウンド 5 の後に、ラウンド 8 まで急速に減少し、ラウンド当たりおよそ 12 % 減少した (図 8)。R8E2 溶出条件が粗いほど、R8E1 における相対的に穏和な溶出条件と比較してより大きい多様性を有する集団を生じた。

【0161】

図 8 における多様性傾向と一致して、塩基組成の分布は、ラウンド 5 および 6 の間で劇的に変化し (図 9)、グアニンリッチ配列が、ラウンド 6 から 8 において優勢であった。

【表 10-1】

表10.fDに対するDNAアプタマーの配列

配列番号	配列ランク	配列 (5'から3')
配列番号 4	1	GTGACGACTGACATATCTGCTCCGAGGTT ATTGGGGTTGGGGCCTGGCGATTGGGC CTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 5	2	GTGACGACTGACATATCTGCCTTGGGT TGGGGCCTGGAGTTGGGAGCAGAAA

30

【表 10 - 2】

		GGACGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 6	3	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTG TTGTGGGGGTGGGTGGGTGGGCCCTCGC CATCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 7	4	GTGACGACTGACATATCTGCGGCGGTTG GGGTCGAAGGGCGAGGGGTGGGAGGTC GCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 8	5	GTGACGACTGACATATCTGCTATTTGG GGCCTGGGTGTTGGGATTGGGACTAT GTGCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 9	6	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGATG GTGGGGGGTGGTGTGGGAGGGCTGGTCG GTCGCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 10	7	GTGACGACTGACATATCTGCCCTATAGG GGTGTGGCGAGGGGTGGGTGGTAGGGC GGCTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 11	8	GTGACGACTGACATATCTCGGAGGTGG GTGGGTGGGTGCGTGCAGAGGGCGGTGTA GGTCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 12	9	GTGACGACTGACATATCTGCAAAAGTTA GATTGACATGGTATGCACCGTCTGAGGT TGGTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 13	10	GTGACGACTGACATATCTGCAACCACGCT AGGGGTGAGGGCGAGGGTGGTAGCG CGTGGCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 14	11	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTG TTGTGGGGCGGGTGGTGGGTGCGTCGG TGGTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 15	12	GTGACGACTGACATATCTGCTGCTTCCA GCGGTATGATATGCACTGTCTGAAGCT CGGTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 16	13	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGTTAT GATATGCACCGTCTGAGGGTAGTCGC GGTGCCTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 17	14	GTGACGACTGACATATCTGCTGCTTGT AGTGGGTGGGTGGGTGGTGTGGTGGTA TGCCTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 18	15	GTGACGACTGACATATCTGCCCTGGGGTT GGGCCTGGGTGTTGGGTGGCCTAGAA GTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 19	16	GTGACGACTGACATATCTCGCCTAGGGT GGGTTGGGGTTGGTGTGCGTGTGGGT TGCCTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 20	17	GTGACGACTGACATATCTGCTGTTGAGGT TGGTGGGGGGTGGCGGTGGATGGTGT GCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 21	18	GTGACGACTGACATATCTGCTGACAGT CTGCTTGCAAGGGCCGAGAGCGCCATT GCGTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT

10

20

30

40

【表 10 - 3】

配列番号 22	19	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTTG GTGGGGGGTGGAGGGTGGGAGGCCGTG TGTCCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 23	20	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTGG TGGGGGAGGGTGGTGGGGTGGCCGGCGC TCGTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 24	21	GTGACGACTGACATATCTGCTGGGTACG TGGTTCGGGGCTAGGGGGTGGGGTGTGT TTCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 25	22	GTGACGACTGACATATCTGCTGGTGGTGT GCGGTGGGTTCTTGGGTGGGATGGGTGGT ACCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 26	23	GTGACGACTGACATATCTGCTATTAGATC CTCGGTGGGTGGGTGGGTGTGTGGTGGT TGCAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 27	24	GTGACGACTGACATATCTGCGGGCGTCTG AGCGCATGGATGACCCACCGACAGATTGC GGCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 28	25	GTGACGACTGACATATCTGCGCTTGGGTG GGCTCGGTGTGCGGTGTGCGGGTGGGTTTG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 29	26	GTGACGACTGACATATCTGCGTTGGGTT GGGGCCTGGAGTTGGGAGCAGAAAGG GCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 30	27	GTGACGACTGACATATCTGCGGGTGGGTG GGTTGGGTTGGTGGTGGTGCCTGTTAGTT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 31	28	GTGACGACTGACATATCTGCAGGTGGGTGG GTGGGTGTGTGCGGTGGTGTGATTGGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 32	29	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGTTGGT GGGGGGCGCGGGTGGGGAGCCTGGTGTTC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 33	30	GTGACGACTGACATATCTGCTCCCCTTGA GGGCTTGTGGACAGATTGCTGGCACGTCA CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 34	31	GTGACGACTGACATATCTGCTCTGGTGGT GGTGGTGGGTTGGGATGGGTCTGGGCTGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 35	32	GTGACGACTGACATATCTGCCTGTGAGGGG AGGGAGGGTGGGTTGGCGGTGGCGCAGGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 36	33	GTGACGACTGACATATCTGCGTGGTGGTGG CGTGGGTGGTGGGGGGGAGCTGGGTGC CCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 37	34	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTT GTGGGGGTGGGTGGTGGGCCCTCGCCGTG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 38	35	GTGACGACTGACATATCTGCTCCGGTATGT

10

20

30

40

【表 10 - 4】

		GTGGGTGGGTGGGTGGTGTGGTGTTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 39	36	GTGACGACTGACATATCTGCTCTCTGTT GTGGGTGGGTGGGTGGTGTGGTGCGTGTGC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 40	37	GTGACGACTGACATATCTCGGGCTGGGTGGG TTGGGTTAGGGTGGTGTGCCGTGGGTTGCCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 41	38	GTGACGACTGACATATCTCGCTTAGGTGGG CGGGTGGGTGTGCCGTGGCGGTGTTGAACG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 42	39	GTGACGACTGACATATCTCGGTGATTGGGG TTGGGCCTGGCGTTGGGGACCGCATGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 43	40	GTGACGACTGACATATCTCGCTTTGGGTTG GGCCTGGGAGTTGGGAGCAGAGAGGAC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 44	41	GTGACGACTGACATATCTGCTAACTGTTGG GGTTGGGGCCTGGGTGTTGGGTTGTTTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 45	42	GTGACGACTGACATATCTGCTGGGGTTGGT GGGGGAGGTGGGTGGGTTATGTGCGCTGGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 46	43	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGTTG TGGGGTGGGTGGTGGCATTGCGTGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 47	44	GTGACGACTGACATATCTGCGAGTGGGTTCG GTGGTGGTGTGGAGGGTTGGGTACGTCGT AGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 48	45	GTGACGACTGACATATCTGCTGGACATGATT GCACCGTATGAGGTTAGTCGTTAATGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 49	46	GTGACGACTGACATATCTGCAGTGGGGCCTG GGCGTTGGGTTGGGTGCCCTCGTCAGTCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 50	47	GTGACGACTGACATATCTGCATGGATTTCG GTGGGTGGGTGGTGTGGTGTTGGTGCG TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 51	48	GTGACGACTGACATATCTGCTGTGGGTGG TGGGGGTGGTGGTGGGAAGGTTCCGGT GCCGTAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 52	49	GTGACGACTGACATATCTCGGGTTGGGTT GGGGCCTGGGTGTTGGGAGCAGGTAGCACC TAGTTGAGTCTGAGTGCT
配列番号 53	50	GTGACGACTGACATATCTCGGGCCTGGGAG GGTCGGTGGTGGTGCAGGGTGGCAAGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT

10

20

30

40

50

【0162】

ラウンド 8までの個々の配列結果を表10に示し、これは、R 8 E 1 配列決定結果から得られる50個の最も豊富な配列に基づき提示されている。これらの結果は、ヒトfDに対する優勢なDNAアプタマーファミリーが、G-四重鎖構造を形成する潜在力を有するアプタマーで構成されることを示した。上位50配列のうち6個のみが、40%未満のグ

アミニを含有する組成を有する。R 8 E 1 および R 8 E 2 プールの間の濃縮を比較すると、コピー数 10 を有し、40% G を保有する R 8 E 1 配列の 18% は、< 40% G 組成を有する配列の 57% と比較して、第 2 の溶出における濃縮を示した。> 10 コピーで存在する、10 コピーおよび 40% G を有する配列を除去するための配列データベースのフィルタリングは、図 10 に示される配列ロゴを生じた。この解析は、この選択においていくつかの（3～5 個の）マイナー非 G - 四重鎖アブタマーファミリーも同定されたことを示した。

【0163】

D 因子に対する親和性の解析のため、潜在的 G - 四重鎖および非 G - 四重鎖配列を選択した。具体的には、表 11 において 1、2、4、5 および 7 にランク付けされた潜在的 G - 四重鎖配列、ならびに 9、12 および 24 にランク付けされた非 G - 四重鎖配列を固相 DNA 合成によって合成し、ゲル精製し、末端標識して、二重フィルターニトロセルロースフィルター結合アッセイにおいて fD への結合を評価した。カゼインへの結合を測定することにより、結合の特異性を評価した。全結合反応において、オリゴヌクレオチド濃度は 100 nM であり、fD 濃度は 5 μM であり、カゼイン濃度は 20 μM であった。表 11 に示す通り、いくつかの選択された配列は、fD への特異的結合を示し、選択が、ヒト補体 fD に対する DNA アブタマーの生成に成功したことを示し、G - 四重鎖ファミリーのメンバーは、ヒト補体 fD に対し最高の親和性および特異性を示した。

【表 11-1】

表11.fDに対する選択されたオリゴヌクレオチドの結合の解析

10

20

30

配列番号	配列ランク	配列 (5' から 3')	% 結合した fD	% 結合した カゼイン
配列番号 67	ナイーブ ライブラリー	GTGACGACTGACATATCTGC- NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	3.6	0.5
配列番号 4	1	GTGACGACTGACATATCTGC TCCGAGGTTATTGGGGTTGG GGCCTGGCGATTGGGGCCT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	58.3	0.5
配列番号 5	2	GTGACGACTGACATATCTGC GTTTGGGGTTGGGGCCTGGG AGTTTGGGGAGCAGAAAGGA CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	63.0	0.5
配列番号 7	4	GTGACGACTGACATATCTGC GGCGGTTGGGTCAAGGGC	3.2	0.1

【表 11 - 2】

		GAGGGGTGGGAGGTCGC CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT		
配列番号 8	5	GTGACGACTGACATATCTGC TATTTGGGGCCTGGGTGTT GGGGATTGGGGACTATGTGT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	60.3	0.3
配列番号 10	7	GTGACGACTGACATATCTGC CCTATAGGGGTGTGGCGAG GGGTGGGTGGTAGGGCGGCT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	1.9	0.2
配列番号 12	9	GTGACGACTGACATATCTGC AAAAGTTAGATTGACATGG TATGCACCGTCTGAGGTTGGT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	1.6	0.6
配列番号 15	12	GTGACGACTGACATATCTGC TGCTTCCAGCGGTCTGATA TGCACGTCTGAAGCTCGGT CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	0.4	0.2
配列番号 27	24	GTGACGACTGACATATCTGC GGCGTCTGAGCGCATGGA TGACCCACCGACAGATTGCGG CGTAGTTGAGTCTGAGTGCT	0.7	0.6

(実施例 3)

f Dに対する塩基修飾アプタマーの選択

A. ビーズに固定化された塩基修飾アプタマーライブライマーの調製

【0164】

f Dに対するアプタマーの選択のためのビーズに固定化された塩基修飾ライブライマーを次の通りに構築した。手短に説明すると、ポリスチレンビーズを使用して、ビーズに基づくライブライマー設計を合成した。代表的ランダム領域を表12に示す。ライブライマー毎に、2塩基毎の後のプールおよびスプリットステップにより、4個の別々のカラムにおいて合成を行って、ソフトウェア作成された設計に基づく15個の2塩基ブロックのランダム領域を作製した。2塩基ブロックライブライマー設計は、結果としてのアプタマー配列データの解析において、塩基修飾残基の取り込みの部位を同定する手段を可能にする。5位修飾デオキシリジン残基(太字表記)は、ランダム領域においてランダムに散在した。これは、0~12個の修飾を有するライブライマー配列を可能にする。本実施例で使用される3種の修飾(インドール、フェノールおよび一級アミン)を、ライブライマー合成において修飾スクレオシドホスホラミダイトにより導入した。

【表 12 - 1】

表12.アプタマー選択のための塩基修飾された、ビーズに固定化されたライブライマーの設計

配列番号	カラム位置	ランダム領域 (5'から3', 30 nt)

【表12-2】

配列番号 81	1	WC*AT*GC*CA*TT*AC*TC*WC*GA*CT*GY*GC*CW *GA*AT
配列番号 82	2	CC*TG*WG*AG*CC*TG*AT*CG*AG*AC*AT*GT*CG* GA*AG
配列番号 83	3	GT*CT*AC*CT*TC*TA*XA*AA*GG*GT*CC*TC*TT*T A*CW
配列番号 84	4	CA*GG*TT*TG*GY*CT*YG*TA*TT*GC*CG*AW*YG* CC*CA

式中、W=5-(インドール-3-アセトアミド-1-プロペニル)-2'-デオキシウリジン; X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2'-デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2'-デオキシウリジン

10

20

30

40

50

A. ビーズに固定化されたヒト補体 f D の調製

【0165】

PBS、pH 7.2において5 μM 最終濃度でヒト補体 f D を再懸濁し、100 μL の f D を、1 μL の 20 mM EZ-Link (商標) NHS - PEG4 ビオチンと組み合わせ、2時間氷上でインキュベートした。このインキュベーションに続いて、選択バッファー-B (PBS pH 7.4 (10 mM リン酸緩衝液、137.5 mM NaCl)、5.7 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂ および 0.05% Tween)への透析によって、未反応のビオチンを除去し、ビオチン取り込みを決定し、次いでビオチン化 f D を 500 nM となるよう選択バッファー-Bにおいて希釈した。

【0166】

X-アブタマー(XA)の選択に先立ち、ビオチン化 f D を、Dynabeads (登録商標) M-280ストレプトアビジンビーズにカップリングした。M-280ビーズを 250 μL のバッファー-Bにおいて3回洗浄し、100 μL のバッファー-Bに再懸濁し、次いで 100 μL の 500 nM ビオチン化 f D を添加し、この溶液を室温で回転しつつ30分間インキュベートした。次に、磁気スタンドを使用して f D カップリングビーズを捕捉し、穏やかな反転により 200 μl のバッファー-B で 3 回洗浄し、100 μl の選択バッファー-A (PBS pH 7.4 (10 mM リン酸緩衝液、137.5 mM NaCl)、5.7 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.2% BSA および 0.05% Tween) に再懸濁した。

B. XAライブラリー調製およびM-280ビーズに対する負の選択

【0167】

ビーズカップリングしたXAライブラリーを、10 mL のバッファー-B に再懸濁し、3,000 rcf で 10 分間の遠心分離によって洗浄し、上清を除去した。次に、XAライブラリーを 3 mL のバッファー-B に再懸濁し、95 °C で 5 分間加熱し、次いで 30 分間室温で冷却して、ビーズに固定化されたXAライブラリーを復元した。次に、7 mL のバッファー-B を添加し、続いて先の通りに遠心分離することにより、復元されたXAライブラリーを洗浄し、1.8 mL のバッファー-A に再懸濁した。250 μL アリコートの非 f D カップリング M-280 ビーズを 500 μL のバッファー-A で 3 回洗浄し、最終容量 50 μL のバッファー-A に再懸濁し、XAライブラリーを含有するチューブに移した。XAライブラリーおよび非 f D カップリングビーズを 1 時間 37 °C で回転しつつインキュベートして、M-280 ビーズに対し親和性を有する全てのXAアブタマーを、M-280 ビーズに結合させた。このインキュベーションに続いて、M-280 ビーズおよび全ての会合したビーズに固定化されたXAライブラリーを磁気スタンドにおいて収集し、結合していないXAライブラリーを含有する上清を除去し、新鮮チューブに移した。M-280 ビー

ズを 500 μL のバッファー A で穏やかに 4 回洗浄し、各洗浄由来の上清を、前の上清と組み合わせて、M - 280 ストレプトアビジンビーズに対し親和性を有するものがブレクリアされた、XA ライブラリービーズのプールを生成した。ブレクリアされた XA ライブライリーをその後、10 mL のバッファー A で 3 回洗浄し、fD に対するアプタマーの選択における使用に先立ち、1.8 mL のバッファー A に再懸濁した。

C. fD に対する X - アプタマーの単離

【0168】

fD に対する X - アプタマーを同定するために、100 μL の M - 280 固定化 fD をブレクリアされた XA ライブライリーに添加し、90 分間 37°で回転しつインキュベートして、fD に対し親和性を有する X - アプタマーの、M - 280 ビーズカップリングされた fD への結合を可能にした。インキュベーションに続いて、磁気スタンドを使用した X - アプタマー / fD カップリング M - 280 ビーズ複合体の収集により、fD に結合された X - アプタマーを単離し、上清を廃棄した。次に、X - アプタマー / fD カップリング M - 280 ビーズを 1 mL のバッファー A で 8 回洗浄し、続いて、1 mL のバッファー B で 2 回洗浄し、全洗浄バッファーは、37°に予熱した。その結果 fD に対するアプタマーが濃縮された、X - アプタマー / fD カップリング M - 280 ビーズを次に、50 μL のバッファー B に再懸濁した。

【0169】

次に、等容量の 1 N NaOH の添加および 65°で 30 分間のインキュベーションと、続く切断反応の 80% に均等な容量の 2 M Tris - C1 による溶液の中和により、fD に対する濃縮されたアプタマーをビーズから切断した。次に、XA ライブラリービーズから切断された fD に対するアプタマーを選択バッファー B において脱塩した。

【0170】

fD に対し親和性を有するものに関して単離された X - アプタマーをさらに濃縮するために、15 μL の切断された XA プールを、150 μL の総容量の選択バッファー B において 100 nM ビオチン化 fD と共にインキュベートし、37°で 1 時間、回転しつインキュベートした。5 μL の M - 280 ビーズの添加に続く、30 分間で 37°のインキュベーションにより、X - アプタマーを単離し、その後、磁気スタンドで捕捉し、37°に予熱した 150 μL のバッファー B で 3 回洗浄し、100 μL のバッファー B に再懸濁して、fD に対するアプタマーが濃縮された X - アプタマープールを生成した。配列比較のための対照を生成するために、最終容量 150 μL の選択 B に 15 μL の切断されたプールを含有する別々の反応液を調製し、5 μL の M - 280 ビーズなし（開始対照）またはあり（陰性対照）でインキュベートし、fD と共にインキュベートされた切断されたプール毎にプロセシングした。

D. 配列決定のための単離された X - アプタマープールの調製

【0171】

1 × PCR バッファー、2.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、0.4 μM フォワードプライマーおよび 0.4 μM のリバースプライマーを含有する、5 × 20 μL の PCR 反応液のそれぞれに対する鋳型としての 5 μL の単離された X - アプタマーまたは対照プールを組み合わせることにより、fD 濃縮 X - アプタマープールのための PCR 反応液ならびに開始および陰性対照反応液を調製し、PCR 反応液の各セットは、次世代配列決定のための 6 ヌクレオチド指標を含有する特有のリバースプライマーおよび 1 ユニット Taq ポリメラーゼを含有する。初期変性 94° 1 分間、続いて 94° 30 秒間；50° 30 秒間；72° 1 分間のサイクルと、72° 3 分間の最終伸長を使用して、PCR 反応サイクルを実行した。初期パイロット PCR 反応において、条件毎に適切な数の PCR サイクルを決定した。PCR 産物をその後、Qiaagen MiniElute PCR 精製キットを使用して精製し、次世代配列決定に付した。

【0172】

選択戦略から得られる配列を次の通りに解析した。手短に説明すると、2 塩基ブロック合成コードおよびライブラリーの設計に基づき、塩基修飾の部位を個々の配列に復旧した

10

20

30

40

50

。条件毎の配列毎の頻度を決定し、各条件にわたり正規化し、対照画分のおよそ $2\times$ またはそれを超える濃縮を有する配列を潜在的fDアプタマーとして同定した。

【0173】

表13に示す通り、このアプローチは、ヒト補体fDに対して濃縮された、いくつかの塩基修飾X-アプタマーの同定をもたらした。

【表13-1】

表13.fDに対する塩基修飾されたDNAアプタマーの配列

配列番号	配列(5'から3')*	fDプールにおける発生率	出発プールにおける発生率	陰性対照プールにおける発生率
配列番号 54 修飾あり	ACCTAGTTGGCTTGCAX AAGTAACYAGCACGTGG GCTAG 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル) -2'-デオキシウリジン; Y= 5-(4- ピバロイルベンズアミド-1-プロペ ニル)-2'-デオキシウリジン	8632	2703	1695
配列番号 55 修飾あり	ACGATCGCCCCYGTCTW TAAGAXCGAATACTATG GGCTAG 式中、W=5-(インドール-3-アセト	6029	3131	1669

【表 13 - 2】

	アミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン			
配列番号 56 修飾あり	ACCTAGAAAGGCTTAGT GAAGTAAWGATCAGGG CGGGATC 式中、W=5-(インドール-3-アセトアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	5966	4311	2961
配列番号 57 修飾あり	ACCTAGTTCCYGTCTAX YAGAXCCGAGXGTATGC CGATC 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	4379	2487	2114
配列番号 58 修飾あり	ACCTAGGCAGTCTGCC GAATTACGAGXGGGA GGGATC 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	4062	269	55
配列番号 59 修飾あり	ACGATCACTGCYCAGCW TYATTAACYAGCYTCGA CCCTAG 式中、W=5-(インドール-3-アセトアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	3300	1793	1554
配列番号 60 修飾あり	ACGATCTTCCGCCAGCT GYATTXCGAAGXGCGTG AGGATC 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	3110	1589	1592
配列番号 61 修飾あり	ACCTAGGCGGTCTTXCC GTCGTTACGTCCYCGGC CCCTAG 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2' -デオキシウリジン	2539	1273	1116
配列番号 62 修飾あり	ACCTAGTTGGCGTAGC GYATTAAWGGGXCGGG CAGCTAG 式中、W=5-(インドール-3-アセトアミド-1-プロペニル)-2' -デオキ	1650	715	487

10

20

30

40

【表13-3】

	シウリジン; X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2'-デオキシリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2'-デオキシリジン			
配列番号 63 修飾あり	ACGATCGCTGACGTXCA XYAGTATGAGGCACGTG GGCTAG 式中、X=5-(アミノ-1-プロペニル)-2'-デオキシリジン; Y=5-(4-ピバロイルベンズアミド-1-プロペニル)-2'-デオキシリジン	1650	594	426

収載されている配列は、X-アプタマーライブラーのランダム領域に由来するX-アプタマーの当該部分のみを表す。

(実施例4)

高い親和性でfDのエキソサイトに結合するアプタマーの同定

【0174】

一部の事例では、本開示は、fDに関連する機能を阻害するアプタマーの同定を提供する。一部の事例では、fDに関連する機能を阻害するアプタマーの同定は、副補体依存性溶血アッセイの実行が関与し得る。C1q枯渴により古典的補体経路が欠損させられたヒト血清は、fDに依存し得る活性である、ウサギ赤血球細胞を溶解するために副補体活性に依存し得る(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。

10

20

20

30

40

50

【0175】

手短に説明すると、クエン酸処理ウサギ血液を500×gで5分間、室温にて遠心分離した。上部血漿画分を除去し、0.1%ゼラチンを含有する1×Veronalバッファー(5×Veronalバッファー、Lonza #12-624Eおよび2%ゼラチン溶液、Sigma-Aldrich、G1393から調製)により容量を置き換えた。赤血球細胞をさらに2回洗浄した。洗浄されたウサギ赤血球細胞を、2×10⁹細胞/mL(RBC)の濃度となるよう1×Veronalバッファーに希釈した。

【0176】

V字底96ウェルプレートにおいて、最終容量250μLとなるよう次の試薬を添加した：適切な容量の1×Veronalバッファーと0.1%ゼラチン、100μLアプタマー、30μLのC1q枯渴ヒト血清および20μLRBC。この混合物を25分間、室温でインキュベートし、次いで5μLの500mM EDTAの添加により反応を停止した。プレートを5分間500×g、室温で遠心分離し、次いで100μLの上清を除去し、405nmの吸光度を測定することにより、RBC溶解の程度を決定した。C1q枯渴血清の非存在下での水による完全RBC溶解により、また、100μM小分子fD阻害剤3,4-ジクロロイソクマリンによるC1q枯渴血清に起因する溶解の阻害により、アッセイの対照を提供した。

【0177】

実施例1において同定されたC1~C3、非特異的対照オリゴ(C8)、および実施例1に記載されている1種の抗fD Fab抗体断片(AFD)を、C1q枯渴ヒト血清と共にインキュベートして、血清中に存在するfDへの結合を可能にし、次いでウサギ赤血球細胞のfD依存性溶解を阻害する能力をアッセイした(図11)。fDの内在性濃度は、10%C1q枯渴ヒト血清において約9.6nMであると予想されたため(Loyet、Good、Davanczéら(2014年)Complement inhibition in cynomolgus monkeys by anti-facto

r D antigen-binding fragment for the treatment of an advanced form of dry age-related macular degeneration.、J. Pharm. Expt. Ther. 351巻、527～537頁)、1nM未満等、有意により優れた親和性でfDを結合した化合物は、アッセイに存在するfDにほとんど化学量論的に結合すると予想された。このことは、fDに対し低pM親和性を有すると報告された(20nM、Loyetら、2014年)、AFDの事例であると思われた(図11;表14)。C1～C3、C8およびAFDのIC₅₀値を表14に描写する。

【表14】

表14.ヒト血清における副補体を阻害する、C1～C3、C8およびAFDのIC₅₀値

10

アブタマー	AFD	C1	C2	C3	C8
IC ₅₀ (nM)	3.3	5.1	3.3	7.0	>160

(実施例5)

D因子エステラーゼ活性アッセイ

【0178】

一部の事例では、fDエステラーゼ活性アッセイを使用して、推定抗fDアブタマーの活性を検査することができる。一部の事例では、エステラーゼ活性の阻害は、抗fDアブタマーが、触媒クレフトおよび関連する基質結合特異性ポケットに結合していることを示唆し得る。一部の事例では、エステラーゼ活性の増強は、配列番号71に従った重鎖可変領域および配列番号72に従った軽鎖可変領域のアミノ酸配列を有する抗fD Fabに観察されるもの等、抗fDアブタマーが、アロステリック活性化を引き起こす様式でエキソサイトに結合していることを示唆し得る。さらに他の事例では、溶血の阻害と組み合わせてエステラーゼ活性における効果なしは、抗fDアブタマーが、アロステリック活性化を引き起こさない様式でエキソサイトに結合していること、またはエキソサイトにも触媒クレフトにも結合していないことを示唆し得る。Z-lys-S-Bz1等、fDの修飾ペプチド基質の切断は、還元5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)の量を測定することによりモニターすることができる。ペプチドチオエステル基質を使用する場合、FDは、他の補体プロテアーゼよりも低い触媒反応速度を有することができ、斯かる一基質Z-lys-SBz1は、fDによって切断され、合成基質として有用であることが判明した(fDは、Kam、McRaeら(1987年)Human complement proteins D, C2, and B.、J. Biol. Chem. 262巻、3444～3451頁においてタンパク質Dと呼ばれる)。

20

30

【0179】

一態様では、fDに結合する分子は、触媒クレフトにおいて結合して、fDの触媒残基へのペプチド基質のアクセスを立体的に防止することにより触媒活性を遮断することができる(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886～12892頁)。別の態様では、fDに結合する分子は、酵素における構造変化を誘導するアロステリック機序によって触媒活性を遮断することができる。さらなる態様では、fDに結合する分子は、fDエキソサイト領域に結合して、生理的基質タンパク質FBの結合を立体的に阻害することができるが、合成修飾ペプチド基質Z-Lys-SBz1の結合は阻害しない(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886～12892頁)。

40

50

287巻、12886~12892頁)。

【0180】

分子が、fD結合およびFBのタンパク質分解性切断を阻害するが、Z-Lys-SBz1は阻害しないさらなる様では、結合は、抗D因子FAb抗体断片が、エキソサイトに結合し、fD切断Z-Lys-S-Bz1を増加させる僅かな立体構造変化を誘導する仕方と同様のものとなり得る(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。

10

【0181】

手短に説明すると、平底96ウェルプレートにおいて、最終容量200μLとなるように次の試薬を添加した：1×Veronalバッファーと0.1%ゼラチンおよび10mM MgCl₂；抗fD抗体(AFD)、アプタマー(C1~C3、実施例1を参照)または非特異的オリゴ対照(C8)；ならびに10nM、20nM、40nM、80nMもしくは160nMにおけるまたはその5%以内の最終濃度のfD。10分間、室温のインキュベート後に、94μM、188μM、375μMもしくは750μMでまたはその5%以内でZ-Lys-SBz1を、5μM、20μMもしくは40μMでまたはその5%以内でDTNBを添加した。一部の事例では、41.7nMでfDを、375uMでZ-Lys-SBz1を、20.0uMでDTNBを添加した。1.5時間、405nmのプレートリーダーにおいて吸光度を直ちに読み取り、30秒間毎に読み取り、各読み取り前に3秒間のプレート振盪を行った。

20

【0182】

表15および図12にアッセイの結果を描写する。手短に説明すると、C3は、fDの公知活性部位阻害剤であるジクロロイソクマリン(DIC)に匹敵する阻害活性を有することに基づき、活性部位阻害剤であると決定された。これらの条件下でこのアッセイにおける陽性対照としてDICが使用される場合、fD活性は、29±15.8%(平均±SD)に低下され、この結果は、C3が、触媒または活性部位クレフトを介して操作する、強力なfD阻害剤であることを確立した。データは、C2が、AFDと同様の様式でエキソサイトに結合したことをさらに確立した。データは、C1が、C2およびC3とは異なる作用機序によって作用したか、またはエキソサイトを介してC2のように機能したが、fDのアロステリック活性化を引き起こす正確に同じ仕方でfDに影響を与えたかったことを確立した。

30

【表15】

表15.fDエステラーゼ活性におけるC1、C2、C3、C8およびAFDの影響

アプタマー	AFD	C1	C2	C3	C8
活性(%)	195	83	147	26	105

(実施例6)

再構成された酵素fDアッセイにおけるfD阻害剤の同定

40

【0183】

一部の事例では、本開示は、精製タンパク質のfD、FBおよびC3bで構成される、再構成された生化学的fD活性アッセイにおけるfD阻害剤の同定を提供する。fDが、FBおよびC3bの複合体(C3bB)に結合すると、FBは、fDによって断片BaおよびBbへと切断される(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。fDの活性は、Baに特異的に結合する抗体(Quidel、A033)を使用するELISAを使用して、FB切断およびBa断片産生の速度によりモニターすることができる

50

。

【0184】

F B コンバターゼアッセイ混合物は、0.1%ゼラチンVerona1バッファーおよび10mM MgCl₂と、7.5nM、15nM、30nM、60nM、120nM、240nM(0.125μM)におけるまたはその5%以内の補体タンパク質f D、125nM、250nM、500nMまたは1μMにおけるB因子(F B)および125nM、250nM、500nMまたは1μMにおけるC3b、ならびに抗体またはアプタマーである。

【0185】

一例では、F B および C3b の濃度は等しいため、1:1複合体を形成し、これは続いて、f D に結合することができ、酵素活性を有する f D が、F B を断片 B a および B b に切断することを可能にする。別の例では、F B : C3b 複合体は、f D の4倍過剰で存在する。例えば、125nMのf D および 0.5μMアプタマーの最終反応濃度(または濃度範囲)は、15分間混合され、次いで 0.5μM の F B および 0.5μM の C3b が、F D / 阻害剤混合物に添加され、30分間 37℃でインキュベートされ、次いで 0.1% ゼラチンVerona1バッファーにおける 10mM EDTA が添加されて、反応を停止する。

(実施例7)

C3b Bへのf D 結合の阻害剤の同定

【0186】

一部の態様では、本開示は、C3bとの複合体におけるF Bへのf D結合の阻害剤の同定を提供する。F Dは、副補体経路における律速酵素であり、プロコンバターゼC3b B および C3b₂B を変換して、活性C3コンバターゼC3b B b または活性C5コンバターゼC3b₂B b を形成する(Katschkeら、2012年)。F Bとの安定した複合体におけるf Dを検出するための表面プラズモン共鳴(SPR)のため、F B : C3b 複合体への結合後にF Bを切断しないように、触媒的に不活性なf D(S195A)が使用される(Katschke、Wu、Ganesanら(2012年)Inhibition alternative pathway complement activation by targeting the Factor D exosite.、J. Biol. Chem. 287巻、12886~12892頁)。

【0187】

C3bが、CM5チップにアミンカップリングされると、SPRは、F Bの結合を質量增加として検出し、C3b : F B 複合体へのf Dの結合をさらなる質量増加として検出す。アッセイバッファー(Verona1バッファー、1mM NiCl₂ および 0.05%サーファクタントP-20)におけるF B、触媒的に不活性なS195A f D および f D結合化合物は、流速10、20、30、40、50または60μL/分、90μLでSPRチップ上を流動される。F Bは、0.25、0.5、1、2または4μMで固定化されたC3bの上を流動され、次いで 7.8nM~8μMの2倍希釈濃度範囲において、F B および f D が 0.25、0.5、1、2 または 4 μM F B および f D (S195A)で同時注射される。一部の事例では、流速は 30 μL/分であり、F B 濃度は 1 μM であり、形成された複合体は、アッセイバッファーにおいて 5 分間解離させられる。

【0188】

一例では、f D結合化合物は、F B および f D の混合物と同時注射される。例えば、1μM F B および 1μM f D (S195A)は、1μM~128μMの2倍希釈範囲でアプタマーと同時注射される。一態様では、SPRによって検出される質量低下によって決定される通り、f D結合化合物は、f Dに結合し、F B : C3bへのf D結合を防止するアプタマーである。

(実施例8)

シュタルガルト病における細胞に基づくモデル補体病理におけるf Dの阻害

【0189】

10

20

30

40

50

網膜色素上皮（RPE）細胞は、シュタルガルト病の進行初期に細胞死を起こし、証拠は、RPE細胞死における副補体経路（AP）の関与を指し示す（Berchuck、Yangら（2013年）All-trans-retinal（atRAL）sensitizes human RPE cells to alternative complement pathway-induced cell death.、Invest Ophthalmol Vis Sci 54巻、2669～2677頁）。ARPE-19細胞は、19歳男性の正常な目に由来する自発的に生じるRPE細胞株である。特異的培養培地において培養された立方状基底細胞層を使用して確立されたARPE-19細胞株は、RPE特異的マーカーの細胞性レチナルデヒド結合タンパク質およびRPE-65を発現する。

10

【0190】

シュタルガルト病は、オールトランスレチナールをプロセシングするタンパク質をコードする、ABC A 4遺伝子にホモ接合型突然変異を有する患者において起こる遺伝性若年性黄斑変性である（Molday（2007年）ATP-binding cassette transporter ABCA4：molecular properties and role in vision and macular degeneration.、J. Bioenerg Biomembr 39巻、507～517頁）。シュタルガルト病のABC A 4およびRDH8マウスマルクモデルは、蓄積されたatRALに起因する網膜病理を呈し、ABC A 4突然変異は、AMD患者の16%に存在し、上昇したatRALが、シュタルガルト病およびAMD疾患進行に寄与し得ることを示唆する（Berchuckら、2013年）。

20

【0191】

機構的には、atRALは、in vitroでRPE細胞におけるCD46およびCD59の発現を減少させ、これは、RPE細胞膜への抗RPE抗体結合に応答した副補体によって媒介される細胞溶解に対する感受性を増加させた（Berchuckら、2013年）。

【0192】

一部の事例では、本開示は、ヒト網膜色素性上皮細胞の副補体媒介性溶解を阻害するfD阻害剤の同定を提供する。手短に説明すると、ヒトRPE細胞（ARPE-19細胞、ATCC、Manassas、Virginia、USA）は、ダルベッコ変法イーグル培地およびHam栄養素混合物F-12の1：1混合物（vol/vol）；（In vitro Gibco、Carlsbad、California、USA）、非必須アミノ酸10mM、0.37%炭酸水素ナトリウム、0.058%L-グルタミン、10%ウシ胎仔血清ならびに抗生物質（ペニシリンG 100U/mL、ストレプトマイシン硫酸塩0.1mg/mL、ゲンタマイシン10μg/mL、アンホテリシン-B 2.5μg/mL）において育成される。細胞は、37、5%CO₂、95%相対湿度でインキュベートされる。

30

【0193】

シュタルガルト病のin vitroモデルにおける細胞生存率を決定するために、ARPE-19細胞を6ウェルプレートに蒔く。ウェル当たり2mLの培養培地における5×10⁵個の細胞を蒔き、標準条件で24時間インキュベートする。atRALによる補体媒介性溶解に対し細胞を感作するために、ARPE-19細胞をatRALで90分間または24時間処置する。fD依存性副補体経路を活性化するために、細胞を24%ヒツジ抗RPE抗体と共に30分間インキュベートし、次いで6%C1q枯渇ヒト血清で処置する。90分間37の後に、96ウェルプレートにおいて上清を収集し、新鮮培地に置き換える。細胞毒性検出キットを使用して、上清におけるLDH放出を測定する。fD中和アブリマーの効果は、規定用量（対照 - 薬物なし、1/2×、1×、2×および10×）の全薬物を使用して、AP誘導性細胞毒性アッセイにおいて決定される。

40

（実施例9）

抗fDアブリマーによる地図状萎縮の処置

50

〔 0 1 9 4 〕

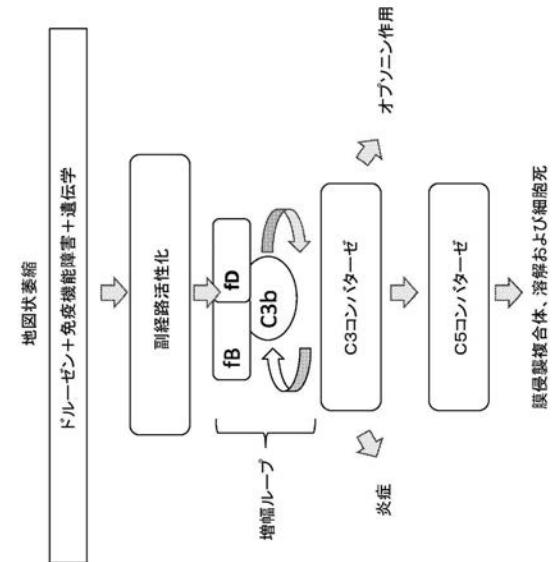
本実施例では、患者は、AMDに続発する地図状萎縮と診断される。患者は、硝子体内投与により治療有効用量のペグ化抗fDアプタマーで処置される。アプタマーは、fDのエキソサイトを標的とし、C3bB複合体の結合および切断を防止する。患者は、4週間に1回または8週間に1回処置される。6ヶ月間の処置後に、1年間の処置後に、およびその後6ヶ月毎に、患者は、地図状萎縮の安定化に関して評価される。患者は、無処置患者と比較した場合に、有意により優れた安定化を示し、抗fD抗体断片療法で4週間に1回処置した患者と比較した場合に、匹敵するまたはより優れた安定化を示す。

【 0 1 9 5 】

本発明の好まれる実施形態について本明細書に示し記載してきたが、当業者には、斯かる実施形態がほんの一例として提供されていることが明らかであろう。そこで、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変種、変化および置換を想定するであろう。本発明の実施において、本明細書に記載されている本発明の実施形態の様々な代替を用いることができるることを理解されたい。次の特許請求の範囲が、本発明の範囲を規定しており、このような特許請求の範囲内 の方法および構造ならびにこれらの均等物が、これに網羅されることが企図される。

10

〔 図 1 〕



〔 図 2 A 〕

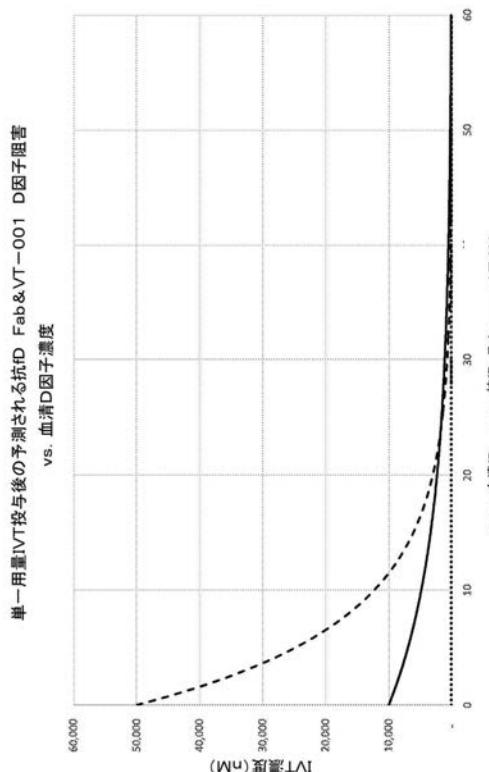


FIG. 2A

【図 2 B】

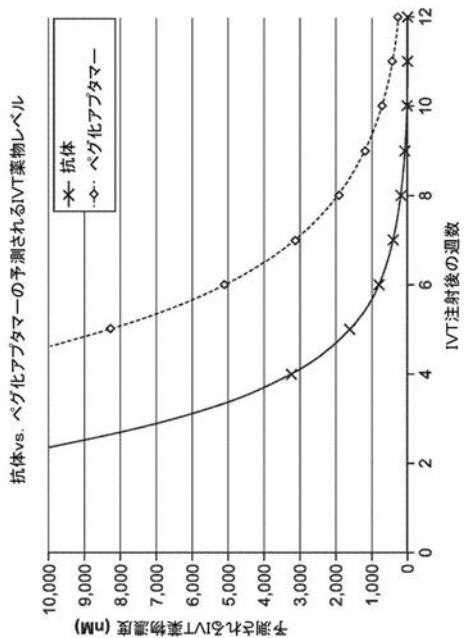
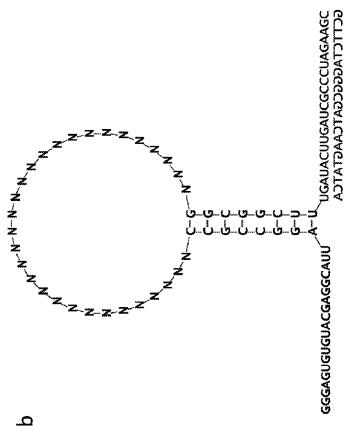


FIG. 2B

【図 3 a】

a GGGAGUGUACGUCCGGCAUU-AGGCCGCC-N30-GCCGGCUU-UUGAUACUUAUCGUCCCCUAGAAGC

【図 3 b】



【図 3 C】

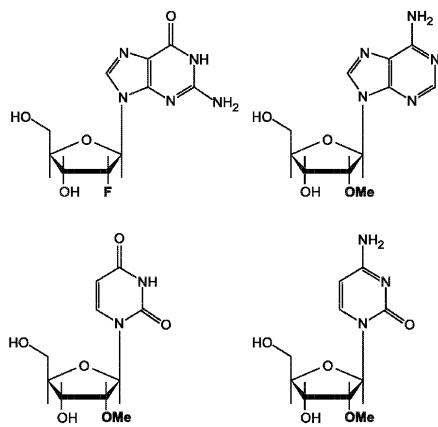
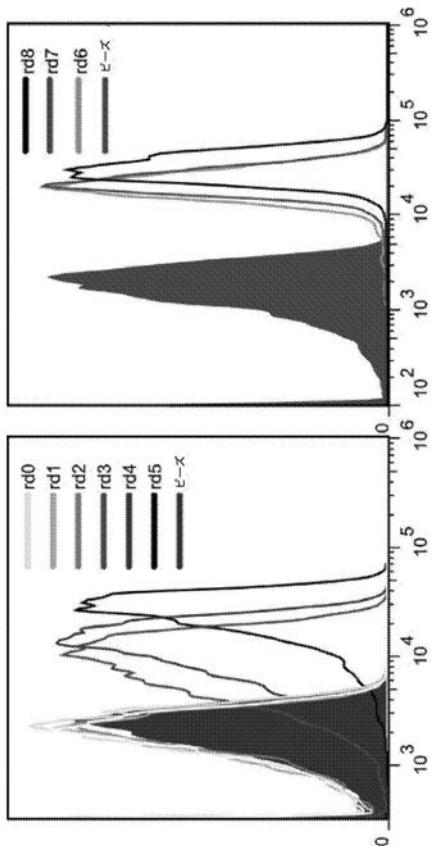


FIG. 3C

【図4】



【図5】

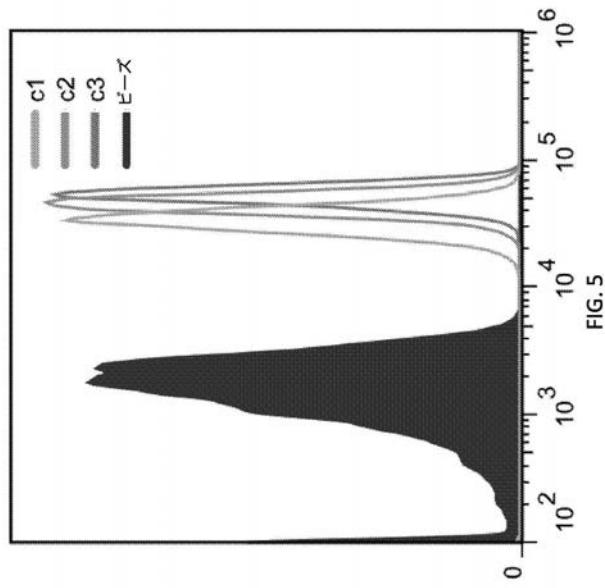


FIG.4

FIG.5

【図6】

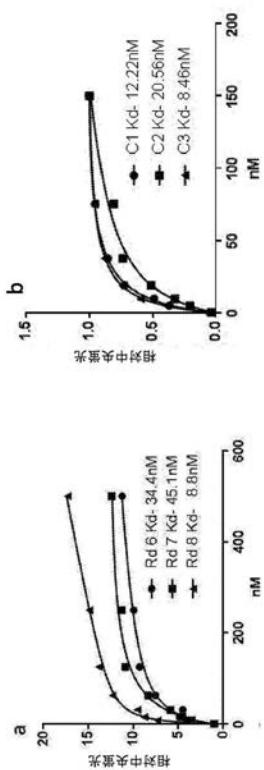


FIG.6

【図7】

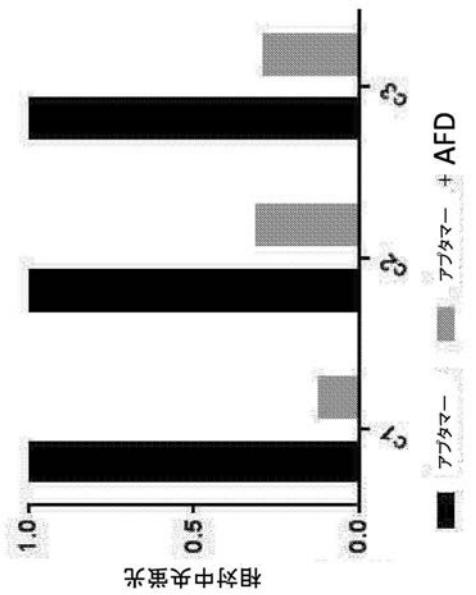
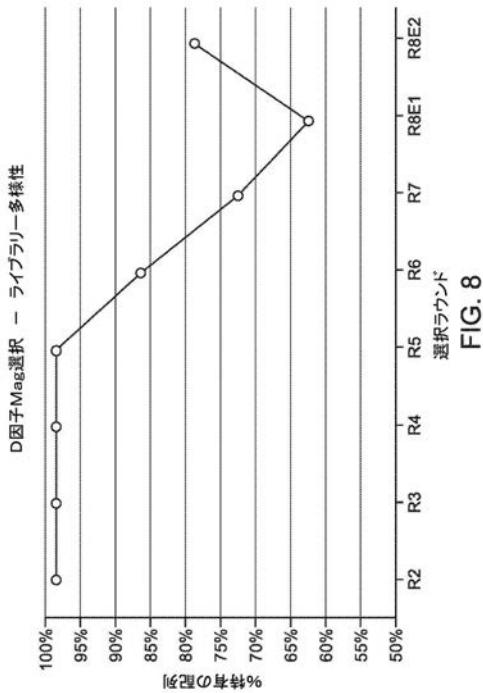
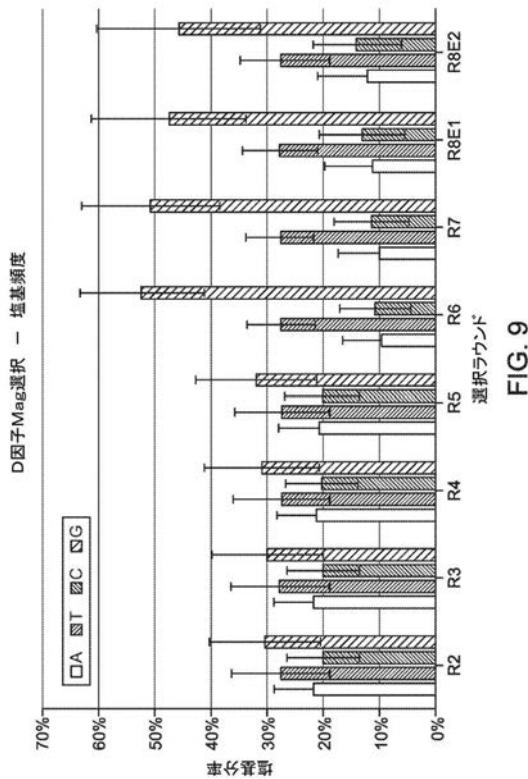


FIG.7

【図 8】



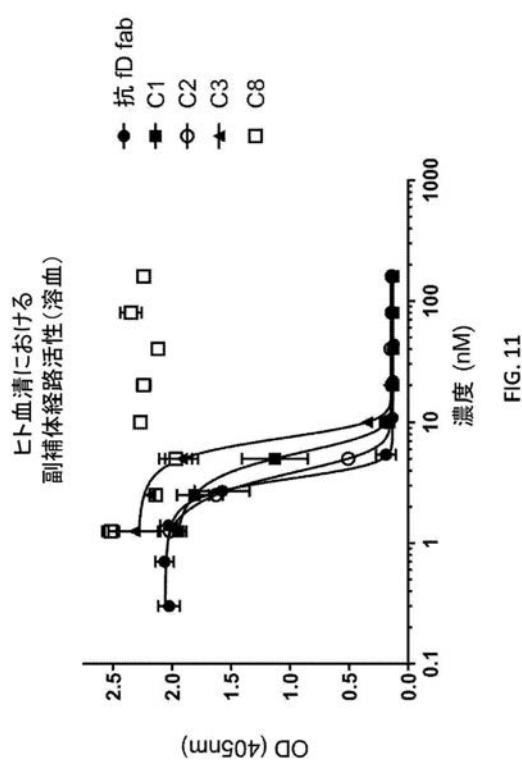
【図 9】



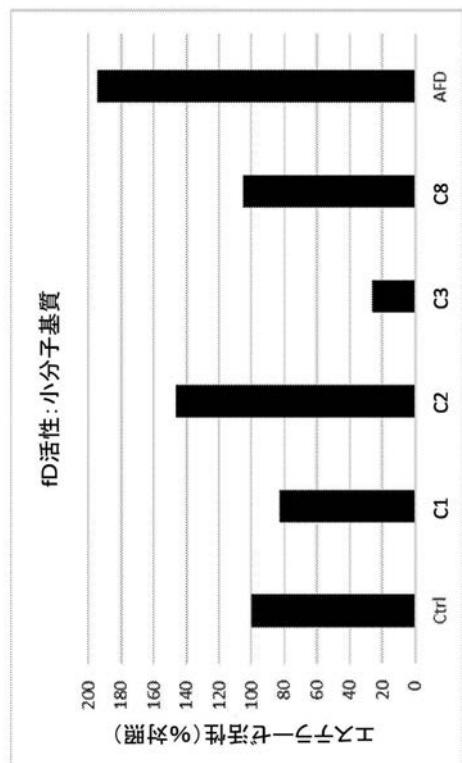
【図 10】



【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3 A】

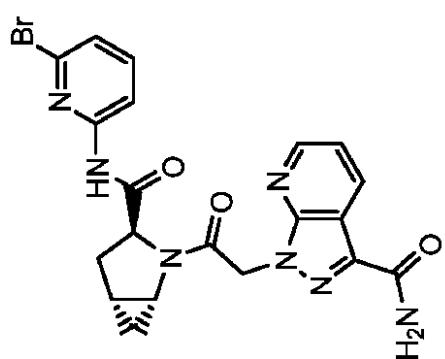
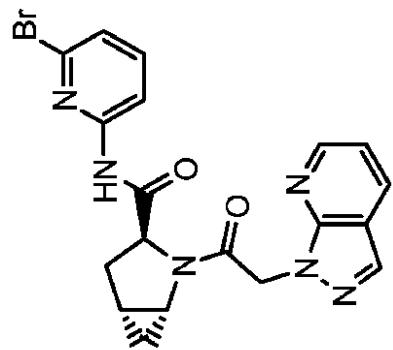
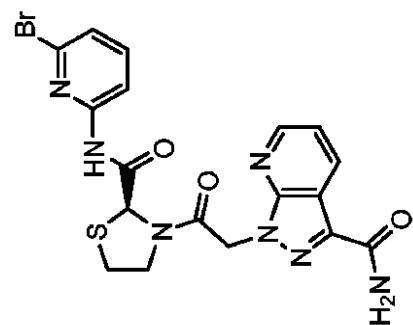
**A**

FIG. 12

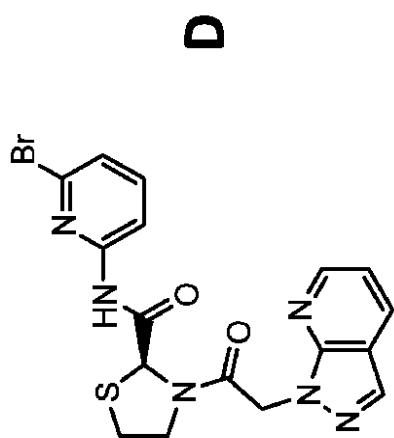
【図 1 3 B】

B

【図 1 3 C】

**C**

【図 13 D】



【図 14】

1¹⁶ ILGGREAAEHARPYMASVQLN²⁶ -- GAHLCGGVILVAE⁴⁶ QWVLSSAAHCLEDA⁵⁶
 10²⁰ 30⁴⁰

50⁶⁶ ADGKVVQVLLGAHSISQ⁷⁶ -PEPSKRLYDVLRAVPHPDQSQPDITI⁹⁶ -- DHDDLLL¹⁰⁶
 60⁷⁰ 80⁹⁰

110¹¹⁶ QLSEKATLGG¹²⁶ -- PAVRPLPQMQRVDRDVA¹³⁶ PGTLLCDVAGMGTVNHA-GRRPDS¹⁴⁶
 120¹³⁰ 130¹⁴⁰

150¹⁶⁶ LQHVILLPVILDATIONRTHHDGAIITERLIMCAES¹⁷⁶ - NRRD8CKGDSGGPI¹⁸⁶
 160¹⁷⁰ 170¹⁸⁰

190²⁰⁶ VCG²¹⁶ -- GVLEGVTISGSRV²²⁶ - CGNRKKPGLIYTRVASYAAWIDSVLA²³⁶--
 200²¹⁰ 220²³⁰

配列番号 94

FIG. 14

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/014458																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/115 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)																						
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPIAP, TXTE, CAPlus, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE - Search Terms: Complement Factor D, aptamer, catalytic cleft, exosite, self-inhibitory loop or like terms																						
IPC/CPC symbols searched: C12N15/115, C12N2310/16 Esp@cenet, Google Patents, Google Scholar, Pubmed Applicant/Inventor search Genome Quest: SEQ ID NOs 73-80 motif search at 100% sequence identity																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
	Documents are listed in the continuation of Box C																					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex																				
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 19 April 2017	Date of mailing of the international search report 19 April 2017																					
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	Authorised officer Jacky Wong AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832540																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2017/014458
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OUELLET, E. et al., 'Hi-Fi SELEX: A High-Fidelity Digital-PCR Based Therapeutic Aptamer Discovery Platform', Biotechnology and Bioengineering. 2015, Vol. 112, No. 8, Pages 1506-1522 Figure 5, Tables III and S-II (supplementary data), Pages 1519 and 1520,	1-66
X	LAO, Y.H. et al., 'Selection of Aptamers Targeting the Sialic Acid Receptor of Hemagglutinin by Epitope-Specific SELEX', Chemical Communications, 2014. Vol. 50, No. 63, Pages 8719-8722 Scheme 1, Page 8720 column 1	1-66
A	WO 2015/168468 A1 (GENENTECH INC.) 05 November 2015	
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/014458

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 on paper
 in electronic form
 - b. (time)
 in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
Sequence listing used for searching purposes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/014458

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including

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

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

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

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

See Supplemental Box for Details

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2017/014458
Supplemental Box	

Continuation of: Box III

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

Invention 1: Claims 1-66 (in part), insofar as the claims relate to an aptamer that binds to the catalytic cleft of complement Factor D.

Invention 2: Claims 1-66 (in part), insofar as the claims relate to an aptamer that binds to the exosite of complement Factor D.

Invention 3: Claims 1-66 (in part), insofar as the claims relate to an aptamer that binds to the self-inhibitory loop of complement Factor D.

Invention 4: Claim 37 (in part), insofar as the claim relates to an aptamer that inhibits a function of complement Factor D as measured by a C3 hemolysis assay, whereby the aptamer does not bind to the catalytic cleft, exosite, and self-inhibitory loop.

Invention 5: Claim 47 (in part), insofar as the claim relates to an aptamer that modulates the activity of complement Factor D as measured by a Factor D esterase assay, whereby the aptamer does not bind to the catalytic cleft, exosite, and self-inhibitory loop.

Invention 6: Claim 56 (in part), insofar as the claim relates to an aptamer that selectively binds to complement Factor D with a Kd of less than about 50nM, whereby the aptamer does not bind to the catalytic cleft, exosite, and self-inhibitory loop.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is an aptamer to complement Factor D. However, this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in:

OUELLET, E. et al., 'Hi-Fi SELEX: A High-Fidelity Digital-PCR Based Therapeutic Aptamer Discovery Platform', Biotechnology and Bioengineering, 2015, vol. 112, No. 8, pages 1506-1522

OUELLET, E. et al. discloses specific aptamers to complement Factor D (see Figure 5).

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all of the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2017/014458	
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2015/168468 A1	05 November 2015	WO 2015168468 A1	05 Nov 2015
		AU 2015253042 A1	20 Oct 2016
		AU 2015253042 A2	27 Oct 2016
		CA 2944712 A1	05 Nov 2015
		CN 106536561 A	22 Mar 2017
		EA 201692109 A1	31 Mar 2017
		EP 3137503 A1	08 Mar 2017
		KR 20160147855 A	23 Dec 2016
		PH 12016502015 A1	16 Jan 2017
		SG 11201608868P A	29 Nov 2016
		TW 201623337 A	01 Jul 2016
		US 2016017052 A1	21 Jan 2016

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許序注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 エリクソン, カール

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94925, コルテ マデラ, パークビュー サークル
55

(72) 発明者 ルスコーニ, クリストファー ピー.

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27705, ダラム, ペンシルベニア アベニュー 1
429

(72) 発明者 マクルール, ケビン ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94618, オークランド, シエリダン ロード 205

F ターム(参考) 4C084 AA13 MA16 MA27 MA28 MA34 MA35 MA37 MA52 MA58 MA63

MA65 MA66 MA67 ZA331 ZC411

4C086 AA01 AA02 AA03 EA18 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZC41

4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 FA74