

(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2014-533098

(P2014-533098A)

(43) 公表日 平成26年12月11日 (2014. 12. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/605 (2006. 01)	C O 7 K 14/605	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)	A 6 1 K 31/7088	4 C O 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006. 01)	A 6 1 K 47/48	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 151 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-536148 (P2014-536148)	(71) 出願人	509019004
(86) (22) 出願日	平成24年10月22日 (2012. 10. 22)		ノクソン・ファルマ・アクチエンゲゼルシ
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月23日 (2014. 6. 23)		ャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/004421		ドイツ連邦共和国, 1 0 5 8 9 ベルリン
(87) 国際公開番号	W02013/056852		, マックス・ドルン-シュトラッセ 8 -
(87) 国際公開日	平成25年4月25日 (2013. 4. 25)		1 0
(31) 優先権主張番号	11008473.8	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成23年10月21日 (2011. 10. 21)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	11008467.0		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成23年10月21日 (2011. 10. 21)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 松島 鉄男
(31) 優先権主張番号	12000107.8	(74) 代理人	100114591
(32) 優先日	平成24年1月10日 (2012. 1. 10)		弁理士 河村 英文
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グルカゴン結合核酸

(57) 【要約】

本発明は、グルカゴンに結合することが可能な核酸分子に関し、核酸分子はA型の核酸分子、B型の核酸分子およびC型の核酸分子を含む群から選択される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グルカゴンに結合することが可能な核酸分子であって、A型の核酸分子、B型の核酸分子およびC型の核酸分子を含む群から選択される核酸分子。

【請求項 2】

前記核酸分子がA型の核酸分子であり、前記A型の核酸分子が中央のヌクレオチドストレッチを含み、前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' B n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A K G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T R R R 3' [配列番号 173] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはr Gであり、n₂ はGまたはr Gであり、n₃ はGまたはr Gであり、n₄ はGまたはr Gであり、n₅ はYまたはr Tであり、n₆ はAまたはr Aであり、n₇ はAまたはr Aであり、

G、A、T、C、B、K、YおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' B n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A R 3' [配列番号 174] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはr Gであり、n₂ はGまたはr Gであり、n₃ はGまたはr Gであり、n₄ はGまたはr Gであり、n₅ はTまたはr Tであり、n₆ はAまたはr Aであり、n₇ はAまたはr Aであり、

G、A、T、C、BおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 175]、

5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A A 3' [配列番号 176]、

5' C n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 177]、および

5' G n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 178]、

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはr Gであり、n₂ はGまたはr Gであり、n₃ はGまたはr Gであり、n₄ はGまたはr Gであり、n₅ はTまたはr Tであり、n₆ はAまたはr Aであり、n₇ はAまたはr Aであり、

G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項 2 または 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' G n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 178] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはr Gであり、n₂ はGまたはr Gであり、n₃ はGまたはr Gであり、n₄ はGまたはr Gであり、n₅ はTまたはr Tであり、n₆ はAまたはr Aであり、n₇ はAまたはr Aであり、

10

20

30

40

50

G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、
r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項2～4のいずれか1
項に記載の核酸分子。

【請求項6】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' C n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G
A G 3' [配列番号177]のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁はGまたはr Gであり、n₂はGまたはr Gであり、n₃はGまたはr Gであり、n₄
はGまたはr Gであり、n₅はTまたはr Tであり、n₆はAまたはr Aであり、n₇
はAまたはr Aであり、

G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tはリボヌクレオチドである、請求項2～4のいずれか1項に記載の
核酸分子。

【請求項7】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌ
クレオチドからなる、請求項2～6のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項8】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' G r G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号179]、

5' G G A A A T G r G G A G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列
番号180]、

5' G G A A A T G G G A r G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号181]、

5' G G A A A T G G G A G r G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号182]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号183]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A r A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号184]；

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号185]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号186]、

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号187]、

5' G G A A A T G G G A r G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配
列番号188]、

5' G r G A A A T G r G G A r G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G
3' [配列番号189]、

5' G r G A A A T G r G G A r G r G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A
G 3' [配列番号190]および

5' G r G A A A T G r G G A r G r G G C T A G G r T G G r A r A G G A A T C T G
A G 3' [配列番号191]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項2～7のいずれか1
項に記載の核酸分子。

【請求項9】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドからなる、請

10

20

30

40

50

求項 2～6 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記核酸分子が、5'→3' 方向で、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第 2 の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは 1～7 ヌクレオチドを含み、

前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは 1～7 ヌクレオチドを含む、請求項 2～9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記核酸分子が、5'→3' 方向で、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第 1 の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは 1～7 ヌクレオチドを含み、

前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは 1～7 ヌクレオチドを含む、請求項 2～9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

Z₁ は G であるかまたは存在せず、Z₂ は S であるかまたは存在せず、Z₃ は V であるかまたは存在せず、Z₄ は B であるかまたは存在せず、Z₅ は B であるかまたは存在せず、Z₆ は V であるかまたは存在せず、Z₇ は B であるかまたは存在せず、Z₈ は V であるかまたは存在せず、Z₉ は V であるかまたは存在せず、Z₁₀ は B であるかまたは存在せず、Z₁₁ は S であるかまたは存在せず、Z₁₂ は C であるかまたは存在せず、請求項 10 または 11 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁ は G であり、Z₂ は S であり、Z₃ は V であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は S であり、Z₁₂ は C であるか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は S であり、Z₃ は V であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は S であり、Z₁₂ は C であるか、または

c) Z₁ は G であり、Z₂ は S であり、Z₃ は V であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は S であり、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、

a) Z₁ は G であり、Z₂ は C であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は R であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は Y であり、Z₁₁ は G であり、Z₁₂ は C であるか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は C であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は R であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は Y であり、Z₁₁ は G であり、Z₁₂ は C であるか、または

c) Z₁ は G であり、Z₂ は C であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は R であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は Y であり、Z₁₁ は G であり、Z₁₂ は存在しない、

請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

a) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A C T G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A G T G C 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A C T G A 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A G T G C 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A G T G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' T C A C T G C 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A C T G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T A C T G C 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G C T G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C A G T G C 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G C C A G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' T C G G C G C 3'のヌクレオチド配列を含む、

請求項13に記載の核酸分子。

【請求項15】

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はVであり、Z₇はBであり、Z₈はVであり、Z₉はVであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂は存在しないか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はVであり、Z₇はBであり、Z₈はVであり、Z₉はCであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

c) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はVであり、Z₇はBであり、Z₈はVであり、Z₉はCであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂は存在せず、

好ましくは、前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はGであり、Z₅はYであり、Z₆はSであり、Z₇はBであり、Z₈はRであり、Z₉はCであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂は存在しないか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はGであり、Z₅はYであり、Z₆はSであり、Z₇はBであり、Z₈はRであり、Z₉はCであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

c) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃はVであり、Z₄はGであり、Z₅はYであり、Z₆はSであり、Z₇はBであり、Z₈はRであり、Z₉はCであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂は存在しない、

請求項10～12のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項16】

a) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T G C G C 3'のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を含むか、または

b) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C C G C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G G G C C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G G C C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G C C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G G C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G A G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C C G C T C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C C A C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

g) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G T C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G A C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項15に記載の核酸分子。

【請求項17】

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はBであり、Z₅ はBであり、Z₆ はVであり、Z₇ はBであり、Z₈ はVであり、Z₉ はVであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はBであり、Z₅ はBであり、Z₆ はVであり、Z₇ はBであり、Z₈ はVであり、Z₉ はVであり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ はBであり、Z₅ はBであり、Z₆ はVであり、Z₇ はBであり、Z₈ はVであり、Z₉ はVであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しない、

請求項10～12のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項18】

a) 前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G G C G G 3' のヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C G C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C G C G 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は V であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は G であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は G であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は C であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は G であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は G であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は Y であり、Z₆ は G であり、Z₇ は Y であり、Z₈ は R であり、Z₉ は C であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しない、

請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 20】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 19 に記載の核酸分子。

【請求項 21】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は V であり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は B であり、Z₆ は V であり、Z₇ は B であり、Z₈ は存在せず、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

10

20

30

40

50

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、
好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は S であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は S であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、
請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 22】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、
請求項 21 に記載の核酸分子。

【請求項 23】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は G であり、 Z_7 は C であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 24】

配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、または配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、同一性は少なくとも 85% である、請求項 2～6 および 9～23 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 25】

配列番号 23、配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

配列番号 23、配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、または

配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、同一性は少なくとも 85% である、請求項 2～8 および 10～23 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 26】

前記核酸分子が B 型の核酸分子であり、前記 B 型の核酸分子が中央の 29～32 ヌクレオチドのストレッチを含み、前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' - A K G A R n₁ K G T T G S Y A W A n₂ R T T C G n₃ T T G G A n₄ T C n₅ - ' 3 [配列番号 197]、

5' - A G A A G G T T G G T A A G T T T C G G T T G G A T C T G - ' 3 [配列番号 198]、

5' - A G A A G G T C G G T A A G T T T C G G T A G G A T C T G - ' 3 [配列番号 199]、

5' - A G G A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 200]、

5' - A G G A A A G G T T G G T A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 201] および

5' - A G G A A G G T T G G T A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 202]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、n₁ は A または r A であり、n₂ は G または r G であり、n₃ は G または r G であり、n₄ は T または r U であり、n₅ は A または r A であり、

G、A、T、C、K、Y、S、W および R のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r U のいずれかは リボヌクレオチドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 27】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' A G G A A n₁ G G T T G G T A A A n₂ G T T C G n₃ T T G G A n₄ T C n₅ 3' [配列番号 203] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ は A または r A であり、n₂ は G または r G であり、n₃ は G または r G であり、n₄ は T または r U であり、n₅ は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r U のいずれかは リボヌクレオチドである、請求項 26 に記載の核酸分子。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドからなる、請求項26または27に記載の核酸分子。

【請求項29】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5'-AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号204]、

5'-AGGAAGAAGTTCGGTAAArGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号205]、

5'-AGGAAGAAGTTCGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTC A3' [配列番号206]、

5'-AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号207]、

5'-AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTC G3' [配列番号208]、

5'-AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTC A3' [配列番号209]、

5'-AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGGTTGGArUTC A3' [配列番号210] および

5'-AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGrGTTGGArUTC r A3' [配列番号211]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Uのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項26～28のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項30】

前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項26または27に記載の核酸分子。

【請求項31】

前記核酸分子が、5'→3'方向で、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む、請求項26～30のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項32】

前記核酸分子が、5'→3'方向で、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第1の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む、請求項26～30のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項33】

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5'-Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5'-CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

Z₁はCであるかまたは存在せず、Z₂はGであるかまたは存在せず、Z₃はRであるかまたは存在せず、Z₄はBであるかまたは存在せず、Z₅はBであるかまたは存在せず、Z₆はSであるかまたは存在せず、Z₇はSであるかまたは存在せず、Z₈はVであるかまたは存在せず、Z₉はVであるかまたは存在せず、Z₁₀はKであるかまたは存在せず、Z₁₁はMであるかまたは存在せず、Z₁₂はSであるかまたは存在しない、請求項31または32に記載の核酸分子。

【請求項 3 4】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は C であり、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は M であり、Z₁₂ は S であるか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は M であり、Z₁₂ は S であるか、または

c) Z₁ は C であり、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は M であり、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は C であり、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は C であり、Z₁₂ は G であるか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は C であり、Z₁₂ は G であるか、または

c) Z₁ は C であり、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は C であり、Z₁₂ は存在しない、

請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 3 5】

a) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G A C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G T C G 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G G C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G T C G 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 3 4 に記載の核酸分子。

【請求項 3 6】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は M であり、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は G であり、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は M であり、Z₁₂ は存在しない、

請求項 3 1～3 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 3 7】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は R であり、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は K であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は A であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は A であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は A であり、Z₄ は C であり、Z₅ は T であり、Z₆ は C であり、Z₇ は G であり、Z₈ は A であり、Z₉ は G であり、Z₁₀ は T であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しない、

請求項 3 1～3 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 3 8】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は N であり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は B であり、Z₅ は B であり、Z₆ は S であり、Z₇ は S であり、Z₈ は V であり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ S A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T S Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

式中、

10

20

30

40

50

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項 31～33 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

10

【請求項 39】

a) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' T G C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G C A 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G G C C A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T G G C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

20

d) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 38 に記載の核酸分子。

【請求項 40】

前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

30

式中、
a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

40

好ましくは、前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、
a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存

50

在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、
請求項31～33のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項41】

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、
請求項31～33のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項42】

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、請求項31～33のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項43】

配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、または

配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、同一性は少なくとも85%である、請求項26～28および30～42のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項44】

配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号89、配列番号90、配列番号156および配列番号157の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号89、配列番号90、配列番号156および配列番号157の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、または

10

20

30

40

50

配列番号 71、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 156 および配列番号 157 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 85% である、請求項 26～29 および 31～42 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 45】

前記核酸分子が C 型の核酸分子であり、前記 C 型の核酸分子が、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 97 および配列番号 102 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 97 および配列番号 102 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、または

配列番号 83、配列番号 84、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 97 および配列番号 102 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 85% である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 46】

前記核酸分子のヌクレオチドまたはそれを形成するヌクレオチドが L-ヌクレオチドである、請求項 1～45 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 47】

前記核酸分子が L-核酸分子である、請求項 1～45 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 48】

前記核酸分子が、グルカゴンに結合することが可能である少なくとも 1 つの結合部分を含み、前記結合部分は L-ヌクレオチドからなる、請求項 1～47 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 49】

前記核酸分子がグルカゴンによって仲介される活性のアンタゴニストである、請求項 1～48 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 50】

前記核酸分子が GIP に結合することが可能である、請求項 1～49 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 51】

前記核酸が GIP によって仲介される活性のアンタゴニストである、請求項 1～50 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 52】

前記核酸分子が修飾基を含み、生物体からの前記修飾基を含む前記核酸分子の排泄速度は、前記修飾基を含まない核酸と比較して低減される、請求項 1～51 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 53】

前記核酸分子が修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子が、前記修飾基を含まない核酸分子と比較して生物体内で増加した保持時間を有する、請求項 1～51 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 54】

前記修飾基が生分解性および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは、前記修飾基が、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分枝ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される、請求項 52 または 53 に記載の核酸分子。

【請求項 55】

前記修飾基が、直鎖ポリエチレングリコールまたは分枝ポリエチレングリコールからなるポリエチレングリコールであり、前記ポリエチレングリコールの分子量は、好ましくは

10

20

30

40

50

約 20,000～約 120,000 Da、より好ましくは約 30,000～約 80,000 Da、最も好ましくは約 40,000 Da である、請求項 54 に記載の核酸分子。

【請求項 56】

前記修飾基がヒドロキシエチルデンプンであり、前記ヒドロキシエチルデンプンの分子量は、約 50 kDa～約 1000 kDa、より好ましくは約 100 kDa～約 700 kDa、最も好ましくは 300 kDa～500 kDa である、請求項 54 に記載の核酸分子。

【請求項 57】

前記修飾基が、リンカーを介して前記核酸分子に結合しており、好ましくは、前記リンカーは生分解性リンカーである、請求項 52～56 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 58】

前記修飾基が、前記核酸分子の 5' 末端ヌクレオチドおよび／もしくは 3' 末端ヌクレオチドに、ならびに／または前記核酸分子の 5' 末端ヌクレオチドと前記核酸分子の 3' 末端ヌクレオチドの間の前記核酸分子のヌクレオチドに結合している、請求項 52～56 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 59】

前記生物体が動物またはヒト生体、好ましくはヒト生体である、請求項 52～58 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 60】

疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のための方法に使用される、請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 61】

前記疾患または障害が、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される、請求項 60 に記載の核酸分子。

【請求項 62】

前記糖尿病が、1 型糖尿病、2 型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される、請求項 61 に記載の核酸分子。

【請求項 63】

前記糖尿病合併症または糖尿病状態が、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能の存在下での静脈血栓、および神経精神医学的徴候の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である、請求項 62 に記載の核酸分子。

【請求項 64】

請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子および任意選択でさらなる構成要素を含み、前記さらなる構成要素は、薬学的に許容される添加剤、薬学的に許容される担体および薬学的に活性な薬剤を含む群から選択される、医薬組成物。

【請求項 65】

請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む、請求項 64 に記載の医薬組成物。

【請求項 66】

医薬の製造のための、請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 67】

前記医薬がヒト医療用、または獣医医療用である、請求項 66 に記載の使用。

【請求項 68】

診断手段の製造のための、請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 6 9】

前記医薬が、疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のためであり、前記疾患または障害が、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される、請求項 6 6 に記載の使用。

【請求項 7 0】

前記糖尿病が、1 型糖尿病、2 型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される、請求項 6 9 に記載の核酸分子。

【請求項 7 1】

前記糖尿病合併症または糖尿病状態が、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能および神経精神医学的徴候の存在下での静脈血栓の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である、請求項 6 9 に記載の核酸分子。

【請求項 7 2】

請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子およびグルカゴンおよび／または G I P を含み、好ましくは結晶性複合体である複合体。

【請求項 7 3】

グルカゴンおよび／または G I P の検出のための、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 7 4】

グルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストのスクリーニング方法であって、

ーグルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性の候補アンタゴニストを用意するステップと、

ー請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を用意するステップと、

ーグルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を用意するステップと、

ーグルカゴンおよび／または G I P によって仲介される前記活性の前記候補アンタゴニストがグルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストであるかどうか判定するステップと

を含む方法。

【請求項 7 5】

請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含む、グルカゴンの検出のためのキット。

【請求項 7 6】

試料中の請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸の検出方法であって、

a) 請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブ、あるいは、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブを用意するステップと；

b) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、別々にまたは一緒に、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含有する試料に加えるか、または請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含有すると推定される試料に加えるステップと；

c) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子またはその一部と同時に、または任意の順序で逐次的に反応させるステップと；

d) 任意選択で、前記捕捉プローブが、ステップ a) で提供される請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子とハイブリダイズするかどうか検出するステップと；

e) 請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子および前記捕捉プローブおよび前記検出プローブからなる、ステップ c) で形成される複合体を検出するステップとを含む方法。

【請求項 77】

前記検出プローブが検出手段を含み、および／または前記捕捉プローブが支持体、好ましくは固体支持体に固定化されている、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

ステップ e) で前記複合体の一部である検出プローブだけが検出されるように、ステップ c) で形成される前記複合体の一部でないあらゆる検出プローブが前記反応から除去される、請求項 76 または 77 に記載の方法。

【請求項 79】

ステップ e) が、前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項 1～59 のいずれか 1 項に記載の核酸分子またはその一部の存在下、および前記核酸分子またはその一部の非存在下でハイブリダイズさせたときの、前記検出手段によって生成されるシグナルを比較するステップを含む、請求項 76～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルカゴンに結合することが可能な核酸分子、医薬、診断薬および検出薬それぞれの製造のためのその使用、そのような核酸分子を含む組成物、そのような核酸分子を含む複合体、そのような核酸分子を用いる、グルカゴンによって仲介される活性のアンタゴニストのスクリーニング方法、ならびにそのような核酸分子の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病（略語 DM）は世界中で有病率の驚異的な増加を示し（特にアジアで）、それは、主に 2 型糖尿病（略語 DM2）によって引き起こされる。米国のデータは、1990 年に 4.9%であったのに対して、2001 年には、18 歳以上の人々の 7.9%が糖尿病と診断されたことを示す。発生率は、年齢と肥満度指数の両方に関連づけられる。米国で 2000 年に生まれた男性の場合、糖尿病を発症する可能性は 33%であり、女性の場合にはそれはさらに高く 39%であると数理モデルは予測する。同じモデルは、これらの男性で生存年数 9 年の減少、女性では 12 年の減少を予測する。主な危険因子、例えば肥満、身体活動の不足は周知であるが、それらは影響を及ぼすことが極めて困難であることが見出されている。驚異的な傾向は、DM2 を処置するのに適した新しい治療薬の探索をさらに緊急なものにしている。理想的な薬剤は、血糖を低減するだけでなく、体重に関して少なくとも中性であり、トリグリセリドも減少させるべきである。

【0003】

いくつかの抗高血糖薬が今日利用できるが、異なる作用機構を有する新規薬剤への切迫した必要性がある。既存薬はしばしば有効ではなく、または経時的に効果が低下し、および／またはかなりの副作用と関連する。2 種類の有害事象、体重増加および低血糖が特に一般的であり、憂慮すべきものであり、潜在的に有害である。例外は、薬剤メトホルミンおよびアカルボースである。しかし、それらは一般的に DM2 の初期形または重症形で用いられるだけであり、効果が限定的で、しばしば胃腸副作用をもたらす。さらに、糖尿病のメトホルミン処置は、特に慢性の腎不全および心不全を有する高齢患者で、生命にかかわる乳酸性アシドーシスの危険と関連する。

【0004】

古典的薬剤の他に、過去10年に新薬が市場に参入した。しかし、これらのほとんどは、標的集団で特に懸念される穏やかな効能または副作用のいずれかによって制限される。グルカゴン様ペプチド（略語GLP-1）の類似体（インクレチンとも呼ばれる）またはGLP-1分解酵素ジペプチジルペプチダーゼ4（略語DPP-IV）の阻害剤は、他の薬剤では効果がなく、抗高血糖作用に関して穏やかな効能を示すだけであることが証明された場合にのみ承認された。しかし、インクレチンの注射可能な剤形は、好ましい体重変化プロファイルの利点を少なくとも有する（Amorini, Laurin 2007年）。これらの薬剤による療法は、空腹時高血糖を予防するために、通常持続性インスリンの注射を必要とする。別の比較的新しい物質クラスである、PPARαゴニストとして作用するチアゾリジンジオンは、近年、欧州での販売認可の停止（EMA 2010）およびロジグリタゾンに関して米国でのより厳重な処方規則（FDA 2011）につながったが、心血管副作用に関する議論の対象となった。これは、ロジグリタゾンと心不全、心筋梗塞および心不全死との関連性によって引き起こされた（NissenおよびWolski 2007年）。このクラスの別のメンバーであるトログリタゾンは、薬物性肝臓損傷により販売中止となった。第3のチアゾリジンジオン、ピオグリタゾンの販売は、その薬物（商品名Actos（登録商標））が膀胱がんの危険率を上げることが研究で示唆された後に、フランスで停止された（Takedaプレスリリース、2011年7月11日）。

【0005】

現在用いられている薬物の大部分はインスリン自体またはインスリン活性の相対的不足を重視するが、DM2が少なくとも、インスリン欠乏またはインスリン抵抗性ととも不適切に高いグルカゴンレベルで特徴付けられる二ホルモン障害であるとの理解を、多くの研究は支持する（JiangおよびZhang 2003年）。

【0006】

グルカゴンは、インスリンと同様に、すい臓で生産されるホルモンであるが、末梢組織、特に肝臓ではインスリンと反対の作用を有する。ここでは、それは、食間において血糖レベルを安定させるために、主に糖新生およびグリコーゲン分解を誘導する。

【0007】

大多数の糖尿病患者では、混合食または炭水化物摂取に続く循環グルカゴンレベルの逆説的な増加が報告されている（Ohneda, Watanabeら 1978年）。これは、DMでの微小および大血管合併症の病態生理において重要な役割を演ずる、食後の血糖レベルの上昇への主要な寄与因子と見られている（GinおよびRigalleau 2000年）。

【0008】

したがって、異なるアプローチによってグルカゴンの作用をブロックすることは、広く研究されている。多くのペプチジルおよび非ペプチジル小分子グルカゴン受容体アンタゴニストが、報告されている（JiangおよびZhang 2003年）。むしろ低いグルカゴン受容体親和性を一般に有するこれらの小分子アンタゴニストのいくつかは、動物モデルにおいて、空腹時血糖を低くするか、外因性グルカゴンによって刺激される血糖上昇をブロックすることが示されている。非ペプチジル小分子グルカゴン受容体アンタゴニストは、ヒトにおいて、グルカゴンによって誘導される肝グルコース生成および血糖の上昇を用量依存的にブロックすることが示された（PetersenおよびSullivan 2001年）。より近年、db/dbマウスでのアンチセンスオリゴヌクレオチドによるグルカゴン受容体発現の低減は、低血糖を起こさずに、血糖、遊離脂肪酸およびトリグリセリドの低減をもたらした（Liang, Osborneら 2004年）。これらの作用は、DM2患者に理想的である。

【0009】

その他に、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは、生存可能であること、ならびにごく軽度の低血糖、改善された耐糖能およびグルカゴンレベルの上昇の徴候を示すことが見出された。それらは食餌誘発性の肥満にも抵抗性であり（Conarell, Jiangら 2007年）、β細胞温存において有益であり得るよりも高いインスリン感受性も

10

20

30

40

50

有する (Sorensen、Winzellら 2006 年)。さらに、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは、ストレプトゾトシンで誘導される「1 型糖尿病表現型」に抵抗性であり、すなわち、それらは空腹状態で、ならびに経口および腹腔内耐糖能試験の後に、正常血糖を示した (Lee、Wangら 2011 年)。

【0010】

モノクローナル抗体によるグルカゴン自体の中和も、血糖、トリグリセリド、HbA1c および肝グルコース生産の急性および持続的低減につながった (Brand、Rolinら 1994 年; Sorensen、Brandら 2006 年)。しかし、それらの潜在的免疫原性のため、上記の抗体および他の抗体は、DM の長期処置のための存続可能な選択肢でないかもしれない。

10

【0011】

本質的に、グルカゴンのレベル／活性を下げることによる治療的介入の試みは、グルカゴン拮抗作用の概念を裏づける多くの結果を与えたが、十分な効力を有する化合物または受け入れがたい肝毒性を有する化合物につながらなかった。

【0012】

ホルモン胃抑制ペプチド (略語 GIP)、グルカゴンと配列類似性がある 42 アミノ酸長のペプチドは、十二指腸および近位空腸に主に位置する K 細胞から放出される。それは、栄養素、特にグルコースまたは脂肪の摂取の結果分泌され、脂肪はヒトでの GIP 分泌の最も強力な刺激物質である。

【0013】

GIP 受容体は、7 つの膜貫通ヘリックスを有する一般的な G タンパク質共役受容体である。GIP 受容体遺伝子は、すい臓、胃、小腸、脂肪組織、副腎皮質、脳下垂体、心臓、精巣、内皮細胞、骨細胞、気管、脾臓、胸腺、肺、腎臓、甲状腺および脳のいくつかの領域で発現されることが見出された。

20

【0014】

GIP は、その名称が示唆するようにインスリン放出を誘導するだけでなく、脂質ホメオスタシスで役割を担うこともでき、いくつかの動物研究が示すように肥満の発達に必要かもしれない (Asmar 2011 年)。50 日間の GIP 受容体アンタゴニスト Pro3-GIP の連日投与は、筋肉および肝臓でのトリグリセリドレベルの低減と一緒に、より高齢の高脂肪食糖尿病マウスで、体重減、脂肪組織の蓄積の減少、ならびにグルコース、糖化ヘモグロビンおよびすい臓インスリンのレベルの著しい向上をもたらした。高脂肪食の摂取量の変化は、記されなかった (McClellan、Irwinら 2007 年)。同様の傾向として、GIP 受容体ノックアウトマウスは肥満の発達に抵抗性であることが見出されたが、同じ高脂肪食を与えた野生型マウスは、インスリン抵抗性ととも GIP の過分泌と極度の内臓および皮下脂肪の堆積の両方を示した (Miyawaki、Yamadaら 2002 年)。しかし、経口グルコース負荷の後の初期のインスリン応答は損なわれ、より高い血糖レベルにつながった (Miyawaki、Yamadaら 1999 年)。肥満への GIP の寄与についての詳細な記載は、Irwin および Flatt (Irwin および Flatt 2009 年) による近年のレビューで見出すこともできる。

30

40

【0015】

グルカゴンと配列が関連し、同じ遺伝子から転写される他のペプチドは、以下の通りである

- ・グリセンチン
- ・グリセンチン関連のポリペプチド
- ・オキシントモジュリン
- ・GLP-1 およびその活性型 GLP-1 (7-36) および GLP-1 (7-37)
- ・GLP-2

【0016】

さらに、関連するポリペプチドがある

50

・プレプロ血管作用性腸管ペプチド（８１－１２２）（プレプロ－VIP／腸管ペプチドPHV－４２）

【００１７】

これらのペプチドのアミノ酸配列のアラインメントを、図２１に示す。

【発明の概要】

【００１８】

本発明の根底にある問題は、グルカゴンおよび／またはGIPと特異的に相互作用し、それによって、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病状態および／または高グルカゴン血症の予防および／または処置のために適する手段を提供することである。

【００１９】

本発明の根底にあるこれらおよび他の問題は、添付の独立請求項の主題によって解決される。好ましい実施形態は、従属請求項からとることができる。

【００２０】

本発明の根底にある問題は、第１の態様の第１の実施形態でもある第１の態様において、グルカゴンに結合することが可能な核酸分子により解決され、そこで、核酸分子は、A型の核酸分子、B型の核酸分子およびC型の核酸分子を含む群から選択される。

【００２１】

第１の態様の第１の実施形態の一実施形態でもある第１の態様の第２の実施形態では、核酸分子はA型の核酸分子であり、A型の核酸分子は中央のヌクレオチドストレッチを含み、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' Bn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A K G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T R R R 3' [配列番号 173] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはrGであり、n₂ はGまたはrGであり、n₃ はGまたはrGであり、n₄ はGまたはrGであり、n₅ はYまたはrTであり、n₆ はAまたはrAであり、n₇ はAまたはrAであり、

G、A、T、C、B、K、YおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

rG、rAおよびrTのいずれかはリボヌクレオチドである。

【００２２】

第１の態様の第２の実施形態の一実施形態でもある第１の態様の第３の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' Bn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A R 3' [配列番号 174] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n₁ はGまたはrGであり、n₂ はGまたはrGであり、n₃ はGまたはrGであり、n₄ はGまたはrGであり、n₅ はTまたはrTであり、n₆ はAまたはrAであり、n₇ はAまたはrAであり、

G、A、T、C、BおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

rG、rAおよびrTのいずれかはリボヌクレオチドである。

【００２３】

第１の態様の第２および３の実施形態の一実施形態でもある第１の態様の第４の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' Tn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 175]、

5' Tn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A A 3' [配列番号 176]、

5' Cn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 177]、および

5' Gn₁ AAA T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 178]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

10

20

30

40

50

n_1 は G または r G であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、
r G、r A および r T のいずれかは リボヌクレオチド である。

【0024】

第1の態様の第2、3および4の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第5の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' G n_1 A A A T G n_2 G A n_3 n_4 G C T A G G n_5 G G n_6 n_7 G G A A T C T G A G 3' [配列番号178] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n_1 は G または r G であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、
r G、r A および r T のいずれかは リボヌクレオチド である。

【0025】

第1の態様の第2、3および4の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第6の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' G n_1 A A A T G n_2 G A n_3 n_4 G C T A G G n_5 G G n_6 n_7 G G A A T C T G A G 3' [配列番号177] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n_1 は G または r G であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、
r G、r A および r T は リボヌクレオチド である。

【0026】

第1の態様の第2、3、4、5および6の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第7の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドからなる。

【0027】

第1の態様の第2、3、4、5、6および7の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第8の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' G r G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号179]、

5' G G A A A T G r G G A G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号180]、

5' G G A A A T G G G A r G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号181]、

5' G G A A A T G G G A G r G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号182]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号183]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号184]；

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号185]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号186]、

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号187]、

5' GGAAATGGGA rGGGCTAGGTGG rArAGGAATCTGAG 3'、
 [配列番号188]、
 5' GrGAAATGr rGGAr rGGGCTAGGTGG rArAGGAATCTGAG
 3' [配列番号189]、
 5' GrGAAATGr rGGAr rGrGGCTAGGTGG rArAGGAATCTGA
 G 3' [配列番号190] および
 5' GrGAAATGr rGGAr rGrGGCTAGGr TGGr rArAGGAATCTG
 AG 3' [配列番号191]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

G、A、TおよびCのいずれかは2'ーデオキシリボヌクレオチドであり、
 rG、rAおよびrTのいずれかはリボヌクレオチドである。

10

【0028】

第1の態様の第2、3、4、5および6の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第9の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、2'ーデオキシリボヌクレオチドからなる。

【0029】

第1の態様の第2、3、4、5、6、7、8および9の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第10の実施形態では、核酸分子は、5'→3'方向で、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

20

第1の末端のヌクレオチドストレッチは1〜7ヌクレオチドを含み、

第2の末端のヌクレオチドストレッチは1〜7ヌクレオチドを含む。

【0030】

第1の態様の第2、3、4、5、6、7、8および9の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第11の実施形態では、核酸分子は、5'→3'方向で、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第1の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

第1の末端のヌクレオチドストレッチは1〜7ヌクレオチドを含み、

第2の末端のヌクレオチドストレッチは1〜7ヌクレオチドを含む。

【0031】

第1の態様の第10および11の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第12の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、
 式中、

30

Z₁はGであるかまたは存在せず、Z₂はSであるかまたは存在せず、Z₃はVであるかまたは存在せず、Z₄はBであるかまたは存在せず、Z₅はBであるかまたは存在せず、Z₆はVであるかまたは存在せず、Z₇はBであるかまたは存在せず、Z₈はVであるかまたは存在せず、Z₉はVであるかまたは存在せず、Z₁₀はBであるかまたは存在せず、Z₁₁はSであるかまたは存在せず、Z₁₂はCであるかまたは存在しない。

40

【0032】

第1の態様の第10、11および12の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第13の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、
 式中、

a) Z₁はGであり、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はVであり、Z₇はBであり、Z₈はVであり、Z₉はVであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂はCであるか、

b) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBで

50

あり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は C であるか、

c) Z_1 は G であり、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、

a) Z_1 は G であり、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は C であるか、

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は C であるか、

c) Z_1 は G であり、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は存在しない。

【0033】

第1の態様の第13の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第14の実施形態では、

a) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A C T G A 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A G T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' T C A C T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' C T A C T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C G C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' G C G C C A G 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' T C G G C G C 3' のヌクレオチド配列を含む。

【0034】

第1の態様の第10、11および12の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第15の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ V 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは 5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B

であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在せず、
 好ましくは、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G 3'$
 のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
 式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しない。

【0035】

第 1 の態様の第 15 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 16 の実施形態では、

a) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G C G C G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C T G C G C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G C G C G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C C G C G C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G G G C C G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C G G C C C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G C G C C G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C G G C G C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G A G C G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C C G C T C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G C G T G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C C A C G C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

g) 第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' G C G T C G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' C G A C G C 3'$ のヌクレオチド配列を含む。

【0036】

第 1 の態様の第 10、11 および 12 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 17 の実施形態では、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは $5' B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
 式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

10

20

30

40

50

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、
好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はVであり、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はVであり、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0037】

第1の態様の第17の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第18の実施形態では、

a) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $G G C G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C C G C C 3'$ のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C G C G G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C C G C G 3'$ のヌクレオチド配列を含む。

【0038】

第1の態様の第10、11および12の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第19の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

10

20

30

40

50

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は G であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0039】

第1の態様の第19の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第20の実施形態では、

第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' GCGG3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CCGC3' のヌクレオチド配列を含む。

【0040】

第1の態様の第10、11および12の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第21の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V$ 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ ' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ ' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は S であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は S であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0041】

第1の態様の第21の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第22の実施形態では、

第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' GCG3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CGC3' のヌクレオチド配列を含む。

【0042】

第1の態様の第10、11および12の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第23の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V$ 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' $B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ ' のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3' のヌクレオチド配列を含み、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは 5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は G であり、 Z_7 は C であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0043】

第 1 の態様の第 2、3、4、5、6、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 および 23 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 24 の実施形態では、核酸分子は配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、

配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、

配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、同一性は少なくとも 85% である。

【0044】

第 1 の態様の第 2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 および 23 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 25 の実施形態では、核酸分子は配列番号 23、配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、

配列番号 23、配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、

配列番号 43、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 91、配列番号 92、配列番号 158 および配列番号 159 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、同一性は少なくとも 85% である。

【0045】

第 1 の態様の第 1 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 26 の実施形態では、核酸分子は B 型の核酸分子であり、B 型の核酸分子は 29～32 ヌクレオチドの中央のストレッチを含み、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' - A K G A R n_1 K G T T G S Y A W A n_2 R T T C G n_3 T T G G A n_4 T C n_5 - 3' [配列番号 197]、

5' - A G A A G G T T G G T A A G T T T C G G T T G G A T C T G - 3' [配列番号 198]、

5' - A G A A G G T C G G T A A G T T T C G G T A G G A T C T G - 3' [配列番号 199]、

10

20

30

40

50

5' - A G G A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 200]、

5' - A G G A A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 201] および

5' - A G G A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 202]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、 n_1 は A または r A であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は T または r U であり、 n_5 は A または r A であり、

G、A、T、C、K、Y、S、W および R のいずれかは 2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r U のいずれかは リボヌクレオチドである。

【0046】

第 1 の態様の第 26 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 27 の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' A G G A A n_1 G G T T G G T A A A n_2 G T T C G n_3 T T G G A n_4 T C n_5 3' [配列番号 203] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n_1 は A または r A であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は T または r U であり、 n_5 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r U のいずれかは リボヌクレオチドである。

【0047】

第 1 の態様の第 26 および 27 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 28 の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、2' - デオキシリボヌクレオチドおよび リボヌクレオチドからなる。

【0048】

第 1 の態様の第 26、27 および 28 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 29 の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A 3' [配列番号 204]、

5' A G G A A A G G T T G G T A A A r G G T T C G G T T G G A T T C A 3' [配列番号 205]、

5' A G G A A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A r U T C A 3' [配列番号 206]、

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A r G G T T C G G T T G G A T T C A 3' [配列番号 207]、

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A r U T C G 3' [配列番号 208]、

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A r U T C A 3' [配列番号 209]、

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A r G G T T C G G T T G G A r U T C A 3' [配列番号 210] および

5' A G G A A r A G G T T G G T A A A r G G T T C G r G T T G G A r U T C r A 3' [配列番号 211]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

G、A、T および C のいずれかは 2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r U のいずれかは リボヌクレオチドである。

【0049】

第 1 の態様の第 26 および 27 の実施形態の一実施形態でもある第 1 の態様の第 30 の実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、2' - デオキシリボヌクレオチドから

10

20

30

40

50

なる。

【0050】

第1の態様の第26、27、28、29および30の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第31の実施形態では、核酸分子は、5'→3'方向で、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む。

【0051】

第1の態様の第26、27、28、29および30の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第32の実施形態では、核酸分子は、5'→3'方向で、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第1の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む。

【0052】

第1の態様の第31および32の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第33の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

Z₁はCであるかまたは存在せず、Z₂はGであるかまたは存在せず、Z₃はRであるかまたは存在せず、Z₄はBであるかまたは存在せず、Z₅はBであるかまたは存在せず、Z₆はSであるかまたは存在せず、Z₇はSであるかまたは存在せず、Z₈はVであるかまたは存在せず、Z₉はVであるかまたは存在せず、Z₁₀はKであるかまたは存在せず、Z₁₁はMであるかまたは存在せず、Z₁₂はSであるかまたは存在しない。

【0053】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第34の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁はCであり、Z₂はGであり、Z₃はRであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈はVであり、Z₉はNであり、Z₁₀はKであり、Z₁₁はMであり、Z₁₂はSであるか、

b) Z₁は存在せず、Z₂はGであり、Z₃はRであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈はVであり、Z₉はNであり、Z₁₀はKであり、Z₁₁はMであり、Z₁₂はSであるか、

c) Z₁はCであり、Z₂はGであり、Z₃はRであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈はVであり、Z₉はNであり、Z₁₀はKであり、Z₁₁はMであり、Z₁₂は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆GAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁はCであり、Z₂はGであり、Z₃はRであり、Z₄はCであり、Z₅はTであり、Z₆はCであり、Z₇はGであり、Z₈はAであり、Z₉はGであり、Z₁₀はTであり、Z₁₁はCであり、Z₁₂はGであるか、

b) Z₁は存在せず、Z₂はGであり、Z₃はRであり、Z₄はCであり、Z₅はTであり、Z₆はCであり、Z₇はGであり、Z₈はAであり、Z₉はGであり、Z₁₀はT

10

20

30

40

50

であり、 Z_{11} はCであり、 Z_{12} はGであるか、

c) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} はCであり、 Z_{12} は存在しない。

【0054】

第1の態様の第34の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第35の実施形態では、

a) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'CGACTCGAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCGAGTCG3'のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'CGGCTCGAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCGAGTCG3'のヌクレオチド配列を含む。

【0055】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第36の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKV $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在しない。

【0056】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第37の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKV $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ GAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTC $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はAであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はAであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はAであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0057】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第38の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ SAK 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CKV $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ SAG 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CTS $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0058】

第1の態様の第38の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第39の実施形態では、

a) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' GTCGAG 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CTCGAC 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' TCGGAG 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CTCGCA 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' GGCCAG 3' のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CTGGCC 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' GCCGAG 3' のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCGGC3'のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCGAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCGAG3'のヌクレオチド配列を含む。

【0059】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第40の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅はBであり、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈はVであり、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅はBであり、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

c) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈はVであり、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在せず、

好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆GAG3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CTCZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅はTであり、Z₆はCであり、Z₇はGであり、Z₈はAであり、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅はTであり、Z₆はCであり、Z₇はGであり、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

c) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆はCであり、Z₇はGであり、Z₈はAであり、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しない。

【0060】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第41の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5'CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、
式中、

a) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆はSであり、Z₇はSであり、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆は存在せず、Z₇はSであり、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または

c) Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆はSであり、Z₇は存在せず、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しない。

【0061】

第1の態様の第31、32および33の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第

42の実施形態では、第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ SAK 3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CKV Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆は存在せず、Z₇は存在せず、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しないか、または第1の末端のヌクレオチドストレッチは5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ GAG 3'のヌクレオチド配列を含み、第2の末端のヌクレオチドストレッチは5' CTC Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、Z₁は存在せず、Z₂は存在せず、Z₃は存在せず、Z₄は存在せず、Z₅は存在せず、Z₆は存在せず、Z₇は存在せず、Z₈は存在せず、Z₉は存在せず、Z₁₀は存在せず、Z₁₁は存在せず、Z₁₂は存在しない。

10

【0062】

第1の態様の第26、27、28、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41および42の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第43の実施形態では、核酸分子は配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、配列番号50、配列番号54、配列番号58、配列番号59、配列番号88および配列番号155の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも85%である。

20

【0063】

第1の態様の第26、27、28、29、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41および42の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第44の実施形態では、核酸分子は配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号89、配列番号90、配列番号156および配列番号157の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号89、配列番号90、配列番号156および配列番号157の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号89、配列番号90、配列番号156および配列番号157の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも85%である。

30

【0064】

第1の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第45の実施形態では、核酸分子はC型の核酸分子であり、C型の核酸分子は、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも85%である。

40

【0065】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、

50

28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44および45の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第46の実施形態では、核酸分子のヌクレオチドまたは核酸分子を形成するヌクレオチドはL-ヌクレオチドである。

【0066】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44および45の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第47の実施形態では、核酸分子はL-核酸分子である。

10

【0067】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46および47の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第48の実施形態では、核酸分子は、グルカゴンに結合することが可能である少なくとも1つの結合部分を含み、このような結合部分はL-ヌクレオチドからなる。

【0068】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47および48の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第49の実施形態では、核酸分子はグルカゴンによって仲介される活性のアンタゴニストである。

20

【0069】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48および49の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第50の実施形態では、核酸分子はGIPに結合することが可能である。

30

【0070】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49および50の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第51の実施形態では、核酸はGIPによって仲介される活性のアンタゴニストである。

【0071】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50および51の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第52の実施形態では、核酸分子は修飾基を含み、修飾基を含む核酸分子の生物体からの排泄速度は、修飾基を含まない核酸と比較して低減される。

40

【0072】

第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、4

50

1、42、43、44、45、46、47、48、49、50および51の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第53の実施形態では、核酸分子は修飾基を含み、修飾基を含む核酸分子は、修飾基を含まない核酸分子と比較して生物体内で増加した保持時間を有する。

【0073】

第1の態様の第52および53の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第54の実施形態では、修飾基は生分解性および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは、修飾基は、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分枝ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される。

10

【0074】

第1の態様の第54の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第55の実施形態では、修飾基は、直鎖ポリエチレングリコールまたは分枝ポリエチレングリコールからなるポリエチレングリコールであり、ポリエチレングリコールの分子量は、好ましくは約20,000~約120,000Da、より好ましくは約30,000~約80,000Da、最も好ましくは約40,000Daである。

【0075】

第1の態様の第54の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第56の実施形態では、修飾基はヒドロキシエチルデンプンであり、ヒドロキシエチルデンプンの分子量は、約50kDa~約1000kDa、より好ましくは約100kDa~約700kDa、最も好ましくは300kDa~500kDaである。

20

【0076】

第1の態様の第52、53、54、55および56の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第57の実施形態では、修飾基は、リンカーを介して核酸分子に結合しており、好ましくはリンカーは生分解性リンカーである。

【0077】

第1の態様の第52、53、54、55および56の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第58の実施形態では、修飾基は、核酸分子の5'末端ヌクレオチドおよび／もしくは3'末端ヌクレオチドに、ならびに／または核酸分子の5'末端ヌクレオチドと核酸分子の3'末端ヌクレオチドの間の核酸分子のヌクレオチドに結合している。

30

【0078】

第1の態様の第52、53、54、55、56、57および58の実施形態の一実施形態でもある第1の態様の第59の実施形態では、生物体は動物またはヒト生体、好ましくはヒト生体である。

【0079】

本発明の根底にある問題は、第2の態様の第1の実施形態でもある第2の態様において、疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のための方法で用いるための、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つによる核酸分子により解決される。

40

【0080】

第2の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第2の態様の第2の実施形態では、疾患または障害は、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される。

【0081】

第2の態様の第2の実施形態の一実施形態でもある第2の態様の第3の実施形態では、糖尿病は、1型糖尿病、2型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される。

50

【0082】

第2の態様の第3の実施形態の一実施形態でもある第2の態様の第4の実施形態では、糖尿病合併症または糖尿病状態は、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能の存在下での静脈血栓、および神経精神医学的徴候の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である。

【0083】

本発明の根底にある問題は、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子および任意選択でさらなる構成要素を含み、さらなる構成要素は、薬学的に許容される添加剤、薬学的に許容される担体および薬学的に活性な薬剤を含む群から選択される医薬組成物による第3の態様の第1の実施形態でもある第3の態様で解決される。

【0084】

第3の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第3の態様の第2の実施形態では、医薬組成物は、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む。

【0085】

本発明の根底にある問題は、医薬の製造のための、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の使用による第4の態様の第1の実施形態でもある第4の態様で解決される。

【0086】

第4の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第4の態様の第2の実施形態では、医薬はヒト医療用、または獣医医療用である。

【0087】

本発明の根底にある問題は、診断手段の製造のための、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の使用による第5の態様の第1の実施形態でもある第4の態様で解決される。

【0088】

第4の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第4の態様の第3の実施形態では、

医薬は、疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のためであり、疾患または障害は、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される。

【0089】

第4の態様の第3の実施形態の一実施形態でもある第4の態様の第4の実施形態では、糖尿病は、1型糖尿病、2型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される。

【0090】

第4の態様の第3の実施形態の一実施形態でもある第4の態様の第5の実施形態では、糖尿病合併症または糖尿病状態は、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能および神経精神医学的徴候の存在下での静脈血栓の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である。

【0091】

本発明の根底にある問題は、請求項1～59のいずれか1項に記載の核酸分子およびグルカゴンおよび／またはGIPを含み、好ましくは結晶性複合体である複合体による第6の態様の第1の実施形態でもある第6の態様で解決される。

【0092】

本発明の根底にある問題は、グルカゴンおよび／またはGIPの検出のための、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の使用による第7の態様の第1の実施形態でもある第7の態様で解決される。

【0093】

本発明の根底にある問題は、グルカゴンおよび／またはGIPによって仲介される活性のアンタゴニストのスクリーニングの方法であって、

－グルカゴンおよび／またはGIPによって仲介される活性の候補アンタゴニストを用意するステップと、

－第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子を用意するステップと、

－グルカゴンおよび／またはGIPによって仲介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を用意するステップと、

－グルカゴンおよび／またはGIPによって仲介される活性の候補アンタゴニストがグルカゴンおよび／またはGIPによって仲介される活性のアンタゴニストであるかどうか判定するステップと

を含む方法による第8の態様の第1の実施形態でもある第8の態様で解決される。

【0094】

本発明の根底にある問題は、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50

0、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子を含む、グルカゴンの検出のためのキットによる第9の態様の第1の実施形態でもある第9の態様で解決される。

【0095】

本発明の根底にある問題は、試料中の第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸の検出方法であって、

10

a) 第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の第1の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の第2の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブ、あるいは、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の第2の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子の第1の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブを用意するステップと；

20

30

b) 捕捉プローブおよび検出プローブを、別々にまたは一緒に、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子を含有する試料に加えるか、または第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子を含有すると推定される試料に加えるステップと；

40

c) 捕捉プローブおよび検出プローブを、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、4

50

8、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子またはその一部と同時に、または任意の順序で逐次的に反応させるステップと；

d) 任意選択で、捕捉プローブが、ステップa) で提供される第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子とハイブリダイズするかどうか検出するステップと；

e) 第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子および捕捉プローブおよび検出プローブからなる、ステップc) で形成される複合体を検出するステップと

を含む方法による第10の態様の第1の実施形態でもある第10の態様で解決される。

【0096】

第10の態様の第1の実施形態の一実施形態でもある第10の態様の第2の実施形態では、検出プローブは検出手段を含み、および／または捕捉プローブは支持体、好ましくは固体支持体に固定化されている。

【0097】

第10の態様の第1および2の実施形態の一実施形態でもある第10の態様の第3の実施形態では、ステップe) で複合体の一部である検出プローブだけが検出されるように、ステップc) で形成される複合体の一部でないあらゆる検出プローブが反応から除去される。

【0098】

第10の態様の第1、2および3の実施形態の一実施形態でもある第10の態様の第4の実施形態では、ステップe) は、捕捉プローブおよび検出プローブを、第1の態様の第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58および59の実施形態のいずれか1つに記載の核酸分子またはその一部の存在下、および前記核酸分子またはその一部の非存在下でハイブリダイズさせたときに、検出手段によって生成されるシグナルを比較するステップを含む。

【0099】

いかなる理論によっても縛られることを望まないが、本発明による核酸分子が、グルカゴンに特異的におよび高い親和性で結合し、それによってそのグルカゴン受容体へのグルカゴンの結合を阻害すること、および／または、したがって、直接または間接に、糖尿病、糖尿病合併症、糖尿病状態および／または高グルカゴン血症の処置のために有益であり、用いられることを本発明者らは見出した。さらに、本発明者らは、本発明による核酸分子が、グルカゴンとグルカゴン受容体との相互作用をブロックするのに適することを見出した。その範囲において、本発明による核酸分子は、グルカゴン受容体のアンタゴニストとして、およびそれぞれ、グルカゴンの作用、特にその受容体へのグルカゴンの作用のアンタゴニストと見ることもできる。

【0100】

グルカゴンに対するアンタゴニストは、グルカゴンに結合する分子—例えば本発明による核酸分子—であり、グルカゴンの機能を、好ましくは実施例に記載のインビトロアッセ

10

20

30

40

50

イまたはインビボモデルで阻害する。

【0101】

本発明による核酸分子、または組成物、好ましくは核酸分子を含む医薬組成物を用いることによって処置または予防することができる様々な疾患、状態および障害に関して、そのような疾患、状態および障害は、特に本出願の導入部分に記載および説明されるものを含む、本明細書に記載されるものであると認められなければならない。その範囲において、明細書のそれぞれの節および明細書の導入部分は、前記疾患、状態および障害のそれぞれの予防および処置のための、本発明の核酸分子の適合性を教示する、本開示の不可欠な部分を形成する。

【0102】

さらに、グルカゴン-グルカゴン受容体系の生理作用がグルカゴンのより高い血漿レベルに関連するならば、本発明による核分子は好ましい。

【0103】

本明細書で用いるように、用語グルカゴンは、哺乳動物のグルカゴンを含む任意のグルカゴンを指すが、それに限定されない。好ましくは、哺乳動物のグルカゴンは、ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ、ウサギ、ハムスター、イヌ、ヒナ、ニワトリおよびウシのグルカゴンを含む群から選択される（図22のグルカゴン種のアラインメントを参照）。より好ましくは、グルカゴンはヒトグルカゴンである。様々なグルカゴンのアミノ酸配列が当業者に公知であり、とりわけ図22に示される。

【0104】

グルカゴンに対するアンタゴニストは、グルカゴンに結合する分子（例えば本発明による核酸分子）であり、グルカゴンの機能を、好ましくは実施例に記載のインビトロアッセイまたはインビボモデルで阻害する。

【0105】

さらに、本発明者らは、本発明によるB型の核酸分子が、そのグルカゴン受容体へのグルカゴンの結合およびその受容体へのGIPの結合を阻害することを見出した。さらに、本発明によるB型の核酸分子は、グルカゴンとグルカゴン受容体、およびGIPとGIP受容体との相互作用をブロックするのに適する。その範囲において、本発明によるB型の核酸分子は、グルカゴン受容体のアンタゴニストとして、およびGIP受容体のアンタゴニストと見することもできる。

【0106】

GIPに対するアンタゴニストは、GIPに結合する分子（例えば本発明による核酸分子）であり、GIPの機能を、好ましくは実施例に記載のインビトロアッセイまたはインビボモデルで阻害する。

【0107】

本明細書で用いるように、用語GIPは、それに限定されないが哺乳動物のGIPを含む任意のGIPを指す。より好ましくは、GIPはヒトGIPである。GIPのアミノ酸配列が当業者に公知であり、とりわけ本明細書に開示される配列番号168によって代表される。

【0108】

本発明による核酸が核酸分子であることは、本発明の範囲内である。その範囲において、否定されていないならば、本明細書において用語核酸および核酸分子は同義で用いられる。さらに、本明細書において、そのような核酸は、好ましくは、本発明による核酸分子、本発明による核酸、発明の核酸または発明の核酸分子とも呼ばれる。

【0109】

本明細書に記載される本発明による核酸の特徴は、核酸が単独で、または任意の組合せで用いられる、本発明の任意の態様で実現することができる。

【0110】

本明細書でさらに詳細に概説されるように、本発明者らは、それによって、本明細書で、開示されるようにも呼ばれるヌクレオチドストレッチで核酸分子を特徴付けることがで

10

20

30

40

50

きる、いくつかの異なるグルカゴン結合核酸分子を同定した（実施例1を参照）。実施例8で実験により示されるように、発明者らは、驚くべきことにいくつかの系で、本発明による核酸分子が糖尿病の処置のために適することを実証することができた。

【0111】

グルカゴンおよび／またはGIPに結合する本発明の異なる型のグルカゴン結合核酸分子の各々は、3つの異なるヌクレオチドストレッチ、すなわち、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含む。一般に、本発明のグルカゴン結合核酸分子は、それらの5'末端および3'末端に、末端のヌクレオチドストレッチの各1つ、すなわち、第1の末端のヌクレオチドストレッチまたは第2の末端のヌクレオチドストレッチ（5'末端のヌクレオチドストレッチおよび3'末端のヌクレオチドストレッチとも呼ばれる）を含む。第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、原則的にそれらの塩基相補性により、互いとハイブリダイズすることができ、それにより、ハイブリダイゼーションの結果、二本鎖構造が形成される。しかし、そのようなハイブリダイゼーションは、生理的および／または非生理的条件下の分子で必ずしも実現されとは限らない。グルカゴン結合核酸分子の3つのヌクレオチドストレッチ（第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチ）は、互いに5'→3'方向に、すなわち、第1の末端のヌクレオチドストレッチ中央のヌクレオチドストレッチ第2の末端のヌクレオチドストレッチのように配列される。あるいは、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび末端の第1のヌクレオチドストレッチが、互いに5'→3'方向に配列される。

【0112】

異なるグルカゴン結合核酸分子間の規定のストレッチの配列の差は、グルカゴンおよび／またはGIPへの結合親和性に影響することができる。本発明の異なるグルカゴン結合核酸分子の結合分析に基づいて、中央のストレッチおよびそれを形成するヌクレオチドは、グルカゴンおよび／またはGIPへの結合のために、個々に、より好ましくは全体として必須である。

【0113】

用語「ストレッチ」および「ヌクレオチドストレッチ」は、特に断らない限り、本明細書において同義で用いられる。

【0114】

好ましい実施形態では、本発明による核酸分子は、単一の核酸分子である。さらなる実施形態では、単一の核酸分子は、多数の単一の核酸分子として、または多数の単一の核酸分子種として存在する。

【0115】

当業者は、本発明による核酸分子が、好ましくはホスホジエステル連結または結合を通して互いに共有結合しているヌクレオチドから好ましくはなると認める。

【0116】

本発明による核酸分子が、原則として互いとハイブリダイズすることができる、2つ以上のストレッチまたはその一部を含むことは、本発明の範囲内である。そのようなハイブリダイゼーションの結果、二本鎖構造が形成される。当業者は、そのようなハイブリダイゼーションは、特にインビトロおよび／またはインビボの条件下で起こることができるか起こることができないと認める。さらに、ハイブリダイゼーションの場合に、少なくとも塩基対形成の規則に基づき、そのようなハイブリダイゼーション、したがって二本鎖構造の形成が原則として起こることができる、2つのストレッチの全長にわたってそのようなハイブリダイゼーションが必ずしも起こるとは限らない。好ましくは本明細書で用いられるように、二本鎖構造は、核酸分子の一部であるか、または2つ以上の別個の鎖もしくは2つの空間的に分離した核酸分子ストレッチの単一の鎖によって形成され、それによって、好ましくはワトソン-クリック型塩基対規則による塩基対形成である、少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の塩基対が存在する構造である。当業者は、H o o g s t e n塩基

対形成などの他の塩基対形成がそのような二本鎖構造に存在するか、それを形成してもよいことを認めよう。2つのストレッチがハイブリダイズするという特徴が、そのようなハイブリダイゼーションがインビボおよび／またはインビトロで実際に起こるか否かを問わず、2つのストレッチの塩基相補性のためにそのようなハイブリダイゼーションが起こると仮定されることを好ましくは示すことも認められる。

【0117】

好ましい実施形態では、本明細書で用いられる用語配置は、本明細書に開示される核酸分子に関連して、本明細書に記載される構造的または機能的特徴またはエレメントの順序または配列を意味する。

【0118】

当業者は、本発明による核酸分子が、グルカゴンおよび／またはG I Pに結合することが可能であると認めよう。いかなる理論によっても縛られることを望まないが、本発明者らは、グルカゴン結合および／またはG I P結合が、本発明の核酸分子の三次元の構造的形質またはエレメントの組合せから生じると仮定し、それらはそのような形質またはエレメントを形成する本発明の核酸分子のヌクレオチドの一次配列の配向および折畳みパターンに起因し、それによって好ましくは、そのような形質またはエレメントは、本発明の核酸分子の第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび／または第2の末端のヌクレオチドストレッチである。個々の形質またはエレメントは様々な異なる個々の配列によって形成されてもよいこと、その変動の程度は三次元構造に従って異なってもよいこと、グルカゴンおよび／またはG I Pへの本発明の核酸分子の結合を仲介するために、そのようなエレメントまたは形質が形成されなければならないことは明白である。本発明の核酸の全体の結合特性は、様々なエレメントおよび形質の相互作用からそれぞれもたらされ、それは、本発明の核酸分子とその標的、すなわちグルカゴンおよびG I Pそれぞれとの相互作用を最終的にもたらす。再度、いかなる理論によっても縛られることを望まないが、本発明の核酸に特徴的である中央のヌクレオチドストレッチは、グルカゴンおよび／またはG I Pとの本発明の核酸分子の結合の仲介にとって重要である。したがって、本発明による核酸分子は、グルカゴンと相互作用することが可能である。さらに、当業者は、本発明による核酸分子が、グルカゴンおよび／またはG I Pのアンタゴニストであることを認めよう。この理由で、本発明による核酸分子は、グルカゴンおよび／またはG I Pに関連するかそれによって引き起こされる任意の疾患または状態の処置および予防のためにそれぞれ適する。そのような疾患および状態は、グルカゴンおよび／またはG I Pが前記疾患および状態にそれぞれ関与するか関連することを立証し、参照により本明細書に組み込まれている、本発明の核酸分子の治療的使用のための科学的な根拠を提供する先行技術から持ってくることができる。

【0119】

本発明による核酸分子は、本明細書に開示される特定のヌクレオチド配列に本質的に相同的である核酸分子も含むものとする。実質的に相同的という用語は、相同性が少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%を超えるものであると、理解されるものとする。

【0120】

本発明による核酸分子に存在する相同的ヌクレオチドの実際の百分率は、核酸に存在するヌクレオチドの総数によって決まる。修飾パーセントは、核酸分子に存在するヌクレオチドの総数に基づいて計算することができる。

【0121】

2つの核酸分子の間の相同性は、当業者に公知である通りに判定することができる。より具体的には、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列相同性パーセントを計算するために、配列比較アルゴリズムを用いることができる。試験配列は、好ましくは、異なる核酸分子に相同的と言われているか、またはそれが相同的であるかどうか、もしそうであるならばどの程度であるか試験される配列または核酸

分子であり、それによって、そのような異なる核酸分子も参照配列と呼ばれる。一実施形態では、参照配列は本明細書に記載される核酸分子、好ましくは、配列番号6、配列番号7、配列番号43、配列番号47、配列番号48、配列番号91、配列番号92、配列番号71、配列番号81、配列番号82、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号50、配列番号54または配列番号59のいずれか1つによる配列を有する核酸分子である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman (SmithおよびWaterman、1981年)のローカル相同性アルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch (NeedlemanおよびWunsch、1970年)の相同性アラインメントアルゴリズム、PearsonおよびLipman (PearsonおよびLipman、1988年)の類似性検索法、これらのアルゴリズム (Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージ、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis. 中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)のコンピュータによる実行によって、または目視検査によって実行することができる。

10

【0122】

配列同一性パーセントを判定するのに適するアルゴリズムの一例は、ベーシックローカルアラインメント検索ツール (以下、「BLAST」) で用いられるアルゴリズムであり、例えば、Altschulら (Altschulら 1990年およびAltschulら、1997年)を参照されたい。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (以下、「NCBI」)を通して公開されている。NCBIから入手できるソフトウェア、例えばBLASTN (ヌクレオチド配列のために) およびBLASTP (アミノ酸配列のために) を用いて配列同一性を判定するのに用いられるデフォルトパラメータは、McGinnisら (McGinnisら、2004年)に記載されている。

20

【0123】

本発明による核酸分子は、本明細書に開示され、それ／それらのヌクレオチド配列によって規定される本発明の核酸に対して、一定程度の同一性を有する核酸分子も含むものとする。より好ましくは、本発明は、それらのヌクレオチド配列またはその一部によって規定される本発明の核酸分子に対して少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%を超える同一性を有する核酸分子も含む。

30

【0124】

本発明による発明の核酸または核酸分子という用語は、好ましくはその核酸分子またはその一部がグルカゴンへの結合に関与するかグルカゴンへの結合が可能である範囲内で、本明細書に開示される核酸配列またはその一部を含む核酸分子、例えば、本発明による核酸の代謝産物または誘導体も含むものとする。そのような核酸分子は、本明細書に開示されるものから、例えばランケーションによって誘導することができる。ランケーションは、本明細書に開示される本発明の核酸分子の末端の片方または両方に関連してよい。さらに、ランケーションはヌクレオチドの内部配列と関連してよく、すなわちそれは、5'末端ヌクレオチドと3'末端ヌクレオチドの間のヌクレオチドの1つまたはいくつかとそれぞれ関連してよい。さらに、ランケーションは、本明細書に開示される本発明の核酸分子の配列からの、単一のヌクレオチドというわずかな欠失を含むものとする。ランケーションは、本発明の核酸分子の1つを超えるヌクレオチドストレッチに関連していてもよく、それにより、ヌクレオチドストレッチは長さがわずか1ヌクレオチドであってよい。本発明による核酸分子の結合は、好ましくは実施例のパートで本明細書に記載される通りに、慣用される実験を用いて、または本明細書に記載される方法を用いるか採用することによって、当業者が判断することができる。

40

【0125】

本発明による核酸分子は、D-核酸分子またはL-核酸分子のいずれかであってよい。好ましくは、本発明による核酸分子は、L-核酸分子である。

50

【0126】

一実施形態では、それらの核酸配列に関して完全に本明細書で記載される核酸分子の各々およびいずれも、指示される特定のヌクレオチド配列に限定されることも、本発明の範囲内である。言い換えると、用語「含むこと」または「含む」は、そのような実施形態では、含有するまたはからなるという意味で解釈するものとする。

【0127】

本発明による核酸分子はより長い核酸の一部であり、それにより、このより長い核酸はいくつかの部分を含み、それにより、少なくとも1つのそのような部分は本発明の核酸分子またはその一部であることも、本発明の範囲内である。そのようなより長い核酸の他の部分は、1つまたはいくつかのD-核酸またはL-核酸であってよい。任意の組合せを、本発明と共に用いることができる。より長い核酸のこれらの他の部分は、結合と異なる、好ましくはグルカゴンおよび／またはGIPへの結合と異なる機能を示すことができる。1つの可能な機能は、他の分子との相互作用を可能にすることであり、それにより、そのような他の分子は、例えば固定、架橋、検出または増幅のために、グルカゴンと好ましくは異なる。本発明のさらなる実施形態では、本発明による核酸分子は、個々のまたは組み合わせた部分として、本発明の核酸分子のいくつかを含む。本発明の核酸分子のいくつかを含むそのような核酸も、より長い核酸という用語に包含される。

【0128】

本明細書で用いられるL-核酸は、L-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にL-ヌクレオチドからなる核酸または核酸分子である。

【0129】

本明細書で用いられるD-核酸は、D-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にD-ヌクレオチドからなる核酸または核酸分子である。

【0130】

明示的に否定されていないならば、本明細書において用語核酸および核酸分子は互換的に用いられる。

【0131】

さらに、否定されていないならば、本明細書においていかなるヌクレオチド配列も5'→3'方向で示される。

【0132】

好ましくは本明細書で用いられるように、ヌクレオチドのいかなる位置も、そのようなヌクレオチドを含有する配列、ストレッチ、またはサブストレッチの5'末端に対して決められるか呼ばれる。したがって、第2のヌクレオチドは、配列、ストレッチ、またはサブストレッチの5'末端からそれぞれ数えて第2のヌクレオチドである。さらに、それに従って、最後から2番目のヌクレオチドは、配列、ストレッチ、またはサブストレッチの3'末端からそれぞれ数えて第2のヌクレオチドである。

【0133】

本発明の核酸分子が、D-ヌクレオチド、L-ヌクレオチド、または、例えば少なくとも1つのL-ヌクレオチドおよび少なくとも1つのD-核酸からなるストレッチのランダムな組合せか規定の配列である両方の組合せからなるかどうかにかかわらず、核酸は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはその組合せからなることができる。

【0134】

核酸分子がリボヌクレオチドおよび2'デオキシリボヌクレオチドの両方からなることも、本発明の範囲内である。2'デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、図29および30A~Bに示す。本発明による核酸分子の配列でリボヌクレオチドと2'デオキシリボヌクレオチドを区別するために、以下の参照コードが本明細書で用いられる。

【0135】

本発明による核酸分子は、主に2'デオキシリボヌクレオチドからなり、そこにおいて、好ましくは、

Gは、2'デオキシグアノシン-5'-モノホスフェートであり、
Cは、2'デオキシシチジン-5'-モノホスフェートであり、
Aは、2'デオキシアデノシン-5'-モノホスフェートであり、
Tは、2'デオキシチミジン-5'-モノホスフェートであり、
r Gは、グアノシン-5'-モノホスフェートであり、
r Cは、シチジン-5'-モノホスフェートであり、
r Aは、アデノシン-5'-モノホスフェートであり、
r Uは、ウリジン-5'-モノホスフェートであり、
r Tは、チミジン-5'-モノホスフェートである。

【0136】

本発明による核酸分子は、主にリボヌクレオチドからなり、そこにおいて、好ましくは

Gは、グアノシン-5'-モノホスフェートであり、
Cは、シチジン-5'-モノホスフェートであり、
Aは、アデノシン-5'-モノホスフェートであり、
Uは、ウリジン-5'-モノホスフェートであり、
d Gは、2'デオキシグアノシン-5'-モノホスフェートであり、
d Cは、2'デオキシシチジン-5'-モノホスフェートであり、
d Aは、2'デオキシアデノシン-5'-モノホスフェートであり、
d Tは、2'デオキシチミジン-5'-モノホスフェートである。

【0137】

L-核酸分子として本発明の核酸分子を設計することは、いくつかの理由で有利である。L-核酸分子は、天然に存在する核酸の鏡像異性体である。しかし、ヌクレアーゼの広範囲にわたる存在のために、D-核酸分子は、水溶液中で、特に生体系または生体試料においてあまり安定でない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞からのヌクレアーゼは、L-核酸を分解することができない。このため、L-核酸分子の生体半減期は、動物およびヒトの体を含むそのような系でかなり増加する。L-核酸分子の分解性の欠如のために、ヌクレアーゼ分解生成物は生成されず、したがって、そこから生じる副作用は、動物およびヒトの体を含むそのような系では観察されない。この態様は、L-核酸分子と、グルカゴンの存在が関与する疾患および／または障害の療法で用いられる實際上全ての他の化合物とを区別する。ワトソンクリック塩基対形成と異なる機構を通して標的分子に特異的に結合するL-核酸分子、または、標的分子へのアプタマーの結合に関与するアプタマーの部分の特に有する、部分的または完全にL-ヌクレオチドからなるアプタマーは、シュピーゲルマーとも呼ばれる。そのようなアプタマーおよびシュピーゲルマーは当業者に公知であり、中でも「The Aptamer Handbook」(Klussmann編、2006年)に記載されている。

【0138】

本発明の核酸分子は、それがD-核酸、L-核酸もしくはD, L-核酸として存在するかどうかに関係なく、またはそれがDNAもしくはRNAであるかどうかにかかわらず、一本鎖または二本鎖の核酸分子として存在することができることも本発明の範囲内である。一般的に、核酸分子は、その一次配列のために規定の二次構造を示し、したがってさらに三次構造を形成することができる一本鎖核酸分子である。しかし、核酸分子は、互いに相補的であるか部分的に相補的である2つの鎖が互いとハイブリダイズするという意味で、二本鎖であってもよい。

【0139】

本発明の核酸分子は、改変されてもよい。そのような改変は核酸分子の単一のヌクレオチドに関するものであってよく、当技術分野で周知である。そのような改変の例は、中でも、Venkatesanら(Venkatesan、Kimら 2003年)およびKusser(Kusser 2000年)によって記載される。そのような改変は、核酸分子を構成する個々のヌクレオチドの全ての1つ、いくつかの2'位での、H原子、F原

子または $\text{O}-\text{CH}_3$ 基または NH_2 基であってよい。さらに、本発明による核酸分子は、少なくとも1つのLNAヌクレオチドを含むことができる。一実施形態では、本発明による核酸分子は、LNAヌクレオチドからなる。

【0140】

一実施形態では、本発明による核酸分子は、多重編成の核酸分子であってよい。本明細書で用いられる多重編成の核酸分子は、少なくとも2つの別個の核酸鎖からなる核酸分子である。これらの少なくとも2つの核酸鎖は機能的単位を形成し、それによって、この機能的単位は、標的分子へのリガンド、好ましくは、グルカゴンおよび／またはGIPの本例では、標的分子へのアンタゴニストである。少なくとも2つの核酸鎖は、本発明の核酸分子を切断して少なくとも2つの鎖を生成するか、または本発明の完全長核酸分子の第1の部分に対応する1つの核酸分子および本発明の完全長核酸分子の別の部分に対応する別の核酸分子を合成するかのいずれかによって、本発明の核酸分子のいずれかから誘導することができる。完全長核酸分子を形成する部分の数により、必要なヌクレオチド配列を有する部分の対応する数が合成される。上で例示されるような2つを超える鎖が存在する多重編成の核酸分子を生成するために、切断アプローチおよび合成アプローチの両方を適用することができることを認めるべきである。言い換えると、少なくとも2つの別々の核酸鎖は、互いに相補的であってハイブリダイズする2つの鎖と一般的に異なるが、前記少なくとも2つの別々の核酸鎖間の一定程度の相補性が存在してもよく、それによって、そのような相補性は前記別々の鎖のハイブリダイゼーションをもたらすことができる。

【0141】

最後に、本発明による核酸分子のために、完全に閉じた、すなわち環状の構造が実現されること、すなわち、一実施形態では、本発明による核酸分子が、好ましくは共有結合を通して閉じられ、それによって、より好ましくは、そのような共有結合が、本明細書に開示される本発明の核酸分子またはその任意の誘導体の核酸配列の5'末端と3'末端の間で形成されることも本発明の範囲内である。

【0142】

本発明による核酸分子の結合定数を判定する可能性は、本発明による核酸が K_D 値の好ましい範囲を示すとの上の知見を確認する、実施例3および4に記載の方法の使用である。個々の核酸分子と、この場合はグルカゴンである標的の間の結合強度を表すために適当な尺度は、それ自体、ならびにその判定法が当業者に公知である、いわゆる K_D 値である。

【0143】

好ましくは、本発明による核酸によって示される K_D 値は、 $1\ \mu\text{M}$ 未満である。約 $1\ \mu\text{M}$ の K_D 値は、標的への核酸の非特異的結合の特徴であると言われる。当業者が認めるように、本発明による核酸分子の様々な実施形態などの一群の化合物の K_D 値は、一定の範囲内にある。前述の約 $1\ \mu\text{M}$ の K_D は、 K_D 値の好ましい上限である。本発明の核酸分子の1つなどの標的結合核酸の K_D の下限は、わずか約10ピコモルであってよいが、より高くてもよい。グルカゴンに結合する個々の核酸の K_D 値が好ましくはこの範囲内であることは、本発明の範囲内である。 K_D 値の好ましい範囲は、この範囲内の任意の第1の数字およびこの範囲内の任意の第2の数字を選択することによって規定することができる。好ましい上の K_D 値は250 nMおよび100 nMであり、好ましい下の K_D 値は50 nM、10 nM、1 nM、100 pMおよび10 pMである。より好ましい上の K_D 値は10 nMであり、より好ましい下の K_D 値は100 pMである。

【0144】

本発明による核酸分子の結合特性に加えて、本発明による核酸分子は、この場合はグルカゴンおよび／またはGIPであるそれぞれの標的分子の機能を阻害する。グルカゴンおよび／またはGIPの機能（例えば、前に記載されるそれぞれの受容体の刺激）の阻害は、グルカゴンおよび／またはGIPへの本発明による核酸分子の結合、ならびに本発明による核酸分子とグルカゴンおよび／またはGIPとの複合体の形成によって達成される。本発明の核酸分子とグルカゴンおよび／またはGIPとのそのような複合体は、グルカゴ

ンおよび／またはG I P、すなわち本発明の核酸分子との複合体で存在しないグルカゴンおよび／またはG I Pによって通常刺激される受容体を刺激することができない。したがって、本発明による核酸分子による受容体機能の阻害は、グルカゴンおよび／またはG I Pによって刺激することができるそれぞれの受容体から独立し、そのような阻害は、むしろ、本発明による核酸分子により、グルカゴンおよび／またはG I Pによる受容体の刺激を阻止することから起こる。

【0145】

本発明による核酸分子の阻害定数を判定する可能性は、本発明による核酸が、治療的処置スキームでの前記核酸分子の使用を可能にする、好ましい阻害定数を示すとの上の知見を確認する、実施例5に記載の方法の使用である。この場合はグルカゴンである標的とそれぞれの受容体との相互作用に及ぼす個々の核酸分子の阻害作用の強度を表すために適当な尺度は、それ自体、ならびにその判定法が当業者に公知である、いわゆる最大半減阻害濃度（略語 IC_{50} ）である。

【0146】

好ましくは、本発明による核酸分子によって示される IC_{50} 値は、 $1\mu M$ 未満である。約 $1\mu M$ の IC_{50} 値は、核酸分子による標的機能の非特異的阻害、好ましくは標的による標的受容体の活性化の阻害の特徴であると言われる。当業者が認めるように、本発明による核酸分子の様々な実施形態などの一群の化合物の IC_{50} 値は、一定の範囲内にある。前述の約 $1\mu M$ の IC_{50} は、 IC_{50} 値の好ましい上限である。本発明の標的結合核酸分子の IC_{50} の下限は、わずかに約 10 ピコモルであってよい、より高くてもよい。グルカゴンに結合する本発明の個々の核酸の IC_{50} 値が好ましくはこの範囲内であることは、本発明の範囲内である。好ましい範囲は、この範囲内の任意の第1の数字およびこの範囲内の任意の第2の数字を選択することによって規定することができる。好ましい上の IC_{50} 値は $250nM$ および $100nM$ であり、好ましい下の IC_{50} 値は $50nM$ 、 $10nM$ 、 $1nM$ 、 $100pM$ および $10pM$ である。より好ましい上の IC_{50} 値は $5nM$ であり、より好ましい下の IC_{50} 値は $1nM$ である。

【0147】

本発明による核酸分子は、本例ではグルカゴンおよび／またはG I Pである標的分子にそれが結合することがなほ可能であるならば、任意の長さを有することができる。本発明による核酸分子の好ましい長さがあることが、当技術分野で認められる。一般的に、長さは $15\sim 120$ ヌクレオチドである。当業者は、本発明による核酸分子にとって $15\sim 120$ の間の任意の整数が可能な長さであることを認めよう。本発明による核酸分子の長さのより好ましい範囲は、約 $20\sim 100$ ヌクレオチド、約 $20\sim 80$ ヌクレオチド、約 $20\sim 60$ ヌクレオチド、約 $20\sim 54$ ヌクレオチドおよび約 $39\sim 44$ ヌクレオチドの長さである。

【0148】

本発明の核酸分子が、好ましくは高分子量の部分であり、および／または、好ましくは、中でも、動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間に関して、核酸分子の特性の改変を可能にする部分を含むことは、本発明の範囲内である。そのような改変の特に好ましい実施形態は、本発明による核酸のPEG化およびHES化である。本明細書で用いるように、PEGはポリ（エチレングリコール）を、HESはヒドロキシエチルデンプンを表す。好ましくは本明細書で用いられるPEG化は、本発明による核酸分子の改変であり、それによって、そのような改変は、本発明による核酸分子に結合するPEG部分からなる。好ましくは本明細書で用いられるHES化は、本発明による核酸分子の改変であり、それによって、そのような改変は、本発明による核酸分子に結合するHES部分からなる。これらの改変ならびにそのような改変を用いて核酸分子を改変する方法は、欧州特許出願EP 1306382に記載され、その開示はこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【0149】

PEGがそのような高分子量部分である場合は、分子量は、好ましくは約 $20,000$

10

20

30

40

50

～約120,000Da、より好ましくは約30,000～約80,000Da、最も好ましくは約40,000Daである。HESがそのような高分子量部分である場合は、分子量は、好ましくは約50kDa～約1000kDa、より好ましくは約100kDa～約700kDa、最も好ましくは200kDa～500kDaである。HESは、0.1～1.5、より好ましくは1～1.5のモル置換を示し、およそ0.1～1.5、好ましくはおよそ3～10の、C2/C6比で表される置換グレードを示す。HES改変の方法は、例えば、独国特許出願DE12004006249.8に記載され、その開示はこれにより参照により本明細書に組み込まれる。

【0150】

改変は、原則として、本発明の核酸分子に、その任意の位置に加えることができる。好ましくは、そのような改変は、核酸分子の5'末端ヌクレオチド、3'末端ヌクレオチドおよび／または5'ヌクレオチドと3'ヌクレオチドの間の任意のヌクレオチドに加えられる。

10

【0151】

改変、ならびに好ましくはPEGおよび／またはHES部分は、本発明の核酸分子に直接または間接に、好ましくはリンカーを通して間接に結合させることができる。本発明による核酸分子が、1つまたは複数の改変、好ましくは1つまたは複数のPEGおよび／またはHES部分を含むことも、本発明の範囲内である。一実施形態では、個々のリンカー分子は、1つを超えるPEG部分またはHES部分を、本発明による核酸分子に結合させる。本発明に関連して用いられるリンカーは、それ自体直鎖または分枝状のいずれかであ

20

【0152】

好ましい実施形態では、リンカーは生分解性リンカーである。生分解性リンカーは、中でも、本発明による核酸分子からの改変の放出による、動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間に関して、本発明による核酸分子の特性を改変することを可能にする。生分解性リンカーの使用は、本発明による核酸分子の滞留時間のより優れた制御を可能にすることができる。そのような生分解性リンカーの好ましい実施形態は、それらに限定されないが、国際特許出願WO2006/052790、WO2008/034122、WO2004/092191およびWO2005/099768に記載される生分解性リンカーである。

30

【0153】

改変または修飾基が生分解性改変であり、生分解性改変は、直接に、または好ましくはリンカーを通して間接に、本発明の核酸分子に結合させることができることは、本発明の範囲内である。生分解性改変は、中でも、本発明による核酸分子からの改変の放出または分解による、動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間に関して、本発明による核酸分子の特性を改変することを可能にする。生分解性改変の使用は、本発明による核酸分子の滞留時間のより優れた制御を可能にすることができる。そのような生分解性改変の好ましい実施形態は、それらに限定されないが、国際特許出願WO2002/065963、WO2003/070823、WO2004/113394およびWO2000/41647、好ましくはWO2000/41647、18頁、4～24行目に記載されているように生分解性である。

40

【0154】

本発明による核酸分子の特性を改変するために、前記の改変の他に、他の改変を用いることができ、それによって、そのような他の改変は、タンパク質、脂質、例えばコレステロール、および糖鎖、例えばアミラーゼ、デキストランなどの群から選択することができる。

【0155】

いかなる理論によっても縛られることを望まないが、本発明による核酸分子を、高分子量部分、例えばポリマー、より詳しくは、好ましくは生理的に許容される、本明細書に開

50

示されるポリマーの1つまたはいくつかで改変することによって、本発明のこのように改変される核酸分子の排泄動態は変更される。より詳しくは、本発明のこのように改変される核酸分子の増加する分子量のために、および、本発明の核酸分子が、特にL形の場合、すなわちL-核酸分子である場合は代謝を受けないことにより、動物体から、好ましくは哺乳動物の体、より好ましくはヒトの体からの排泄は減少する。排泄は腎臓を介して一般に起こるので、本発明者らは、このように改変される核酸分子の糸球体濾過速度は、動物体内での改変核酸分子の滞留時間の増加をもたらすこの種の高分子量改変を持たない核酸分子と比較して、かなり低減されると仮定する。それとの関連で、そのような高分子量改変にもかかわらず、本発明による核酸分子の特異性が有害な影響を受けないことは特に注目し得る。その範囲において、本発明による核酸分子は、中でも、本発明による核酸分子の徐放性を提供するために、徐放性を可能にする医薬製剤が必ずしも必要とは限らないという意外な特性（薬学的に活性な化合物から通常予想することができない特性）を有する。むしろ、高分子量部分を含むその改変形の本発明による核酸分子は、その改変のために徐放性製剤から放出されるかのように既に作用するので、それ自体を徐放性製剤として既に用いることができる。その範囲において、本明細書に開示される本発明による核酸分子の改変、ならびにこのように改変された本発明による核酸分子およびそれを含む任意の組成物は、異なる、好ましくは制御されたその薬物動態および体内分布を可能にすることができる。これは、動物およびヒトの体の循環中の滞留時間、ならびにそのような動物およびヒトの組織への分布も含む。そのような改変は、特許出願W O 2 0 0 3 / 0 3 5 6 6 5でさらに記載される。

10

20

【0156】

しかし、本発明による核酸分子がいかなる改変も、特にPEGまたはHESなどの高分子量改変も含まないことも本発明の範囲内である。そのような実施形態は、本発明による核酸分子が体内の任意の標的器官もしくは組織への優先分布を示す場合、または投与後の本発明による核酸分子の体からの速いクリアランスが所望の場合に特に好ましい。体内の任意の標的器官または組織への優先分布プロファイルを有する、本明細書で開示される本発明による核酸分子は、核酸分子の全身の濃度を低く保ちつつ、標的組織での有効な局所濃度の確立を可能にする。これは、経済的観点から有益であるだけでなく、核酸分子への他の組織の不必要な曝露を低減し、このように副作用の潜在的危険率を低減する、低用量の使用を可能にするであろう。投与後の本発明による核酸分子の体からの速いクリアランスは、とりわけ、本発明による核酸分子またはそれを含む医薬を用いるインビボでの画像化または特定の治療的投与必要条件の場合に、望ましいかもしれない。

30

【0157】

本発明による核酸分子および／または本発明によるアンタゴニストは、医薬の生成または製造のために用いることができる。本発明によるそのような医薬または医薬組成物は、グルカゴンおよび／またはGIPへの結合が可能な本発明の核酸分子の少なくとも1種を、任意選択でさらなる薬学的に活性な化合物と一緒に含有し、それによって、本発明の核酸分子は好ましくはそれ自体薬学的に活性な化合物として作用する。好ましい実施形態では、そのような医薬は、少なくとも薬学的に許容される担体を含む。そのような担体は、例えば、水、緩衝剤、PBS、グルコース溶液、好ましくは5%グルコース、塩平衡溶液、クエン酸、デンプン、糖、ゼラチンまたは他の任意の許容される担体物質であってよい。そのような担体は、当業者に一般に公知である。当業者は、本発明の医薬の、またはそれに関連する任意の実施形態、使用および態様が、本発明の医薬組成物にも適用でき、その逆も可能であることを認めよう。

40

【0158】

本発明による、またはそれに従って調製される核酸分子、医薬組成物および医薬がその処置および／または予防のためである適応症、疾患および障害は、それぞれの病原機構における直接的または間接的なグルカゴンの関与から生じる。

【0159】

糖尿病に関連するか関与する経路へのグルカゴンの関与に基づき、本発明の核酸分子、

50

本発明の核酸分子の1つまたはいくつかの種を含有する医薬組成物、およびその1つまたはいくつかを含有する医薬が、前記疾患、障害および病的状態の処置および／または予防で用いることができることは明白である。したがって、そのような疾患および／または障害および／または病的状態には、それらに限定されないが、1型糖尿病、2型糖尿病（妊娠性糖尿病を含む）、糖尿病合併症、糖尿病状態および／または真性糖尿病および高グルカゴン血症の後遺症ならびに他の原因によるアルストレーム症候群が含まれ、それによって生じる合併症は、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、妊娠糖尿病、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、グルコース感受性低下、インスリン感受性低下、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病ケトアシドーシス、および高浸透圧性高血糖性非ケトン昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑（NME）、貧血、正常な凝固機能の存在下での静脈血栓、神経精神医学的徴候（うつ病、認知症、不眠症、運動失調）を含む群から選択される。

10

【0160】

当然、本発明によるグルカゴン結合核酸分子はグルカゴンおよび／またはGIPと相互作用するかそれに結合するので、当業者は、本明細書に記載されるヒトおよび動物の任意の疾患の処置、予防および／または診断のために、本発明によるグルカゴン結合核酸分子を容易に用いることができることを一般に理解する。それに関連して、本発明による核酸分子が、そのような疾患、障害および状態の根底にある作用様式にかかわりなく、本明細書に記載される疾患、障害または状態のいずれかの処置および予防のために用いることができることを認めるべきである。

20

【0161】

以下では、様々な疾患、障害および状態に関連した、本発明による核酸分子の使用の根拠が提供され、したがって、本発明による核酸分子の請求される治療的、予防的および診断的適用性を信頼できるものにする。いかなる不必要な繰り返しも避けるために、それに関連して概説されるグルカゴン-グルカゴン受容体系および／またはGIP-GIP受容体系の関与のために、請求される治療的、予防的および診断的効果が達成されるように、前記系は本発明による核酸分子によって対処することができることを認めるべきである。患者の疾患、障害および状態の詳細、ならびにそれに関連して記載される処置レジメンのあらゆる詳細は、本適用の好ましい実施形態の対象であってよいことをさらに認めるべきである。

30

【0162】

大多数の糖尿病患者では、混合食または炭水化物摂取に続く循環グルカゴンレベルの逆説的な増加が報告されている（Ohneda、Watanabeら 1978年）。これは、DMでの微小および大血管合併症の病態生理において重要な役割を演ずる、食後の血糖レベルの上昇への主要な寄与因子と見られている（GinおよびRigalleau 2000年）。

【0163】

多くのペプチジルおよび非ペプチジル小分子グルカゴン受容体アンタゴニストが、報告されている（JiangおよびZhang 2003年）。むしろ低いグルカゴン受容体親和性を一般に有するこれらの小分子アンタゴニストのいくつかは、動物モデルにおいて、空腹時血糖を低くするか、外因性グルカゴンによって刺激される血糖上昇をブロックすることが示されている。非ペプチジル小分子グルカゴン受容体アンタゴニストは、ヒトにおいて、グルカゴンによって誘導される肝グルコース生成および血糖の上昇を用量依存的にブロックすることが示された（PetersenおよびSullivan 2001年）。より近年、db/dbマウスでのアンチセンスオリゴヌクレオチドによるグルカゴン受容体発現の低減は、低血糖を起こさずに、血糖、遊離脂肪酸およびトリグリセリドの低減をもたらした（Liang、Osborneら 2004年）。これらの作用は、D

40

50

M2患者に理想的である。

【0164】

その他に、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは、生存可能であること、ならびに軽度なだけの低血糖、改善された耐糖能およびグルカゴンレベルの上昇の徴候を示すことが見出された。それらは食餌誘発性の肥満にも抵抗性であり（Conarellio、Jiangら 2007年）、β細胞温存において有益であるより高いインスリン感受性も有する（Sorensen、Winzellら 2006年）。さらに、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは、ストレプトゾトシンで誘導される「1型糖尿病表現型」に抵抗性であり、すなわち、それらは空腹状態で、ならびに経口および腹腔内耐糖能試験の後に、正常血糖を示した（Lee、Wangら 2011年）。 10

【0165】

モノクローナル抗体によるグルカゴン自体の中和も、血糖、トリグリセリド、HbA1cおよび肝グルコース生産の急性および持続的低減につながった（Brand、Rolli nら 1994年；Sorensen、Brandら 2006年）。しかし、それらの潜在的免疫原性のため、これらのおよび他の抗体は、DMの長期処置のための存続可能な選択肢でないかもしれない。

【0166】

本質的に、グルカゴンのレベル／活性を下げることを通しての治療的介入の試みは、グルカゴン拮抗作用の概念を裏づける多くの結果を与えた。しかし、そのような試みは、十分な効力がない化合物、または受け入れがたい肝毒性を有する化合物のいずれかにつながった。 20

【0167】

1型糖尿病（DM1）は、DM2と対照的にインスリン抵抗性による機能的欠乏ではなく、すい臓のβ細胞喪失による絶対的欠乏であるインスリン欠乏によって特徴付けられる。DM1は、大部分は児童および若年成人で発達するので、若年型糖尿病としばしば呼ばれる。近年発表された研究では、グルカゴン受容体ノックアウトマウスは、ストレプトゾトシンで誘導される「1型糖尿病表現型」に抵抗性であり、すなわち、それらは空腹状態で、ならびに経口および腹腔内耐糖能試験の後に、正常血糖を示した（Lee、Wangら 2011年）。 30

【0168】

DM1患者において、インスリン依存性の食後のグルカゴン抑制の不足は、耐糖能を損なう。DMの急性の生命にかかわる合併症およびグルカゴンーインスリン不均衡の直接的な結果は、過剰なケトン体産生の後の糖尿病ケトアシドーシス（略語DKA）、および高浸透圧性高血糖性非ケトン昏睡（略語HHNK）などの糖尿病合併症である。HHNKでは、糖尿の浸透圧作用は腎臓におけるNaCl吸収阻害をもたらし、したがって高ナトリウム血症につながる水再吸収をもたらす（Wahid、Naveedら 2007年）。DKAおよびHHNKは、DM2のインスリン依存性の症例でも観察することができる。

【0169】

神経内分泌腫瘍は、それらが起源とする細胞によって通常生産されるそれぞれのホルモンの過剰発現につながる可能性がある、稀な腫瘍である。したがって、高グルカゴン血症はグルカゴン産生細胞の過形成または新生物（グルカゴノーマ）、例えばα細胞に由来する新生物に起因する。同様に、グリセンチン、オキシントモジュリンおよびGLP-1がグルカゴン遺伝子転写産物から生産される、腸管のランゲルハンス細胞の新生物は、プロセシングがゆがめられる場合、これらのペプチドの過剰発現、またはグルカゴンの過剰発現につながる可能性がある。 40

【0170】

高グルカゴン血症は、合併症、例えば、真性糖尿病、ケトアシドーシスおよび体重減少壊死融解性移動性紅斑（略語NME）、貧血、正常な凝固機能の存在下での静脈血栓、神経精神医学的徴候（うつ病、認知症、不眠症、運動失調）ならびに他の症状につながる可能性がある（Griffing、Odekeら 2011年）。 50

【0171】

G I Pは、その名称が示唆するようにインスリン放出を誘導するだけでなく、脂質ホメオスタシスにおいて役割を果たすこともでき、いくつかの動物研究が示すように肥満の発達に必要なかもしれない（A s m a r 2011年）。50日間のG I P受容体アンタゴニストP r o 3-G I Pの連日投与は、筋肉および肝臓でのトリグリセリドレベルの低減と一緒に、より高齢の高脂肪食糖尿病マウスで、体重減、脂肪組織の蓄積の減少、ならびにグルコース、糖化ヘモグロビンおよびすい臓インスリンのレベルの著しい向上をもたらした。高脂肪食の摂取量の変化は、記されなかった（M c C l e a n、I r w i nら 2007年）。同じ方向を指して、G I P受容体ノックアウトマウスは肥満の発達に抵抗性であることが見出されたが、同じ高脂肪食を与えた野生型マウスは、インスリン抵抗性と一緒にG I Pの過分泌と極度の内臓および皮下脂肪の堆積の両方を示した（M i y a w a k i、Y a m a d aら 2002年）。しかし、経口グルコース負荷の後の初期のインスリン応答は損なわれ、より高い血糖レベルにつながった（M i y a w a k i、Y a m a d aら 1999年）。

10

【0172】

さらなる実施形態では、医薬はさらなる薬学的に活性な薬剤を含む。そのようなさらなる薬学的に活性な化合物は、それらに限定されないが、とりわけ糖尿病、好ましくはDM2、および糖尿病合併症の処置および／または予防のための化合物であり、それによって化合物は、スルホニル尿素薬、ビグアニド、アルファグルコシダーゼ阻害剤、チアゾリンジオン、D P P 4阻害剤、メグリチニド、グルカゴン様ペプチド類似体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、インクレチン模倣体、インスリン、ならびにインスリン抵抗性および／またはDM2の処置で用いられるか、インスリン抵抗性および／またはDM2の予防で用いられる他の治療薬などを含む群から選択される。本発明による核酸分子によって本発明に従って対処することができる様々な適応症を考慮すると、前記のさらなる薬学的に活性な薬剤は、そのような疾患の処置および／または予防のために原則として適するいかなるものであってよいことは、当業者ならば理解しよう。本発明による核酸分子は、特に存在するか、または医薬として用いられる場合は、好ましくは、スルホニル尿素薬、ビグアニド、アルファグルコシダーゼ阻害剤、チアゾリンジオン、メグリチニド、グルカゴン様ペプチド類似体、胃抑制ペプチド類似体、アミリン類似体、インクレチン模倣体、D P P 4阻害剤、インスリン、ならびにDM1、インスリン抵抗性および／またはDM2の処置で用いられるか、インスリン抵抗性および／またはDM2の予防で用いられる他の治療薬などと組み合わせられる。

20

30

【0173】

医薬が、原則として前記疾患の処置のための医薬の使用に関連して開示される疾患のいずれかの予防のために、代わりに、または追加で用いられることは、本発明の範囲内である。したがって、それぞれのマーカー、すなわちそれぞれの疾患のためのマーカーは、当業者に公知である。好ましくは、それぞれのマーカーは、高グルカゴン血症である。あるいは、および／またはさらに、それぞれのマーカーは、オキシントモジュリン、グリセンチンおよびG I P（G I P結合核酸分子の場合）を含む群から選択される。さらなる群のマーカーは、強力な渇き、高い水分摂取量、頻尿、極度の空腹感、H b A 1 c値、血漿インスリンレベル、O G Tの後の血漿グルコースレベル、空腹時血漿グルコースレベル、空腹時血漿グルコースレベル、尿グルコースレベル、体重、血圧、けだるさ、疲労、食事制限なしの体重減少、体重増加、頻繁な細菌または真菌感染、不良な創傷治癒、手足の麻痺および視覚障害を含む群から選択される。

40

【0174】

本発明の医薬の1つの実施形態では、そのような医薬は、本明細書で開示される疾患、特に本発明の医薬が用いられるべき疾患のいずれかのための他の処置と一緒に用いるためのものである。

【0175】

「併用療法」（または「共療法」）は、本発明の医薬、および、それらの治療薬の共同

50

作用からの有益な作用を少なくとも提供することを目的とする特定の処置レジメンの一部としての少なくとも第2の、またはさらなる薬剤、すなわち本発明の医薬および前記第2の、またはさらなる薬剤の投与を含む。組合せの有益な作用には、それに限定されないが、治療的に有効な薬剤の組合せからもたらされる薬物動態学的または薬力学的共同作用が含まれる。併用されるこれらの治療的に有効な薬剤の投与は、一般的に規定の時間（選択される組合せによって、通常、数分、数時間、数日または数週間）にわたって実行される。

【0176】

「併用療法」は、別々の単独療法レジメンの一部としての、これらの治療的に有効な薬剤の2つ以上の投与を包含することを意図することができるが、一般には意図されない。

「併用療法」は、これらの治療的に有効な薬剤の逐次的な投与、すなわち治療的に有効な各薬剤は異なる時間に投与されること、ならびにこれらの治療的に有効な薬剤、または治療的に有効な薬剤の少なくとも2つの実質的に同時の投与を包含するものとする。実質的に同時の投与は、例えば、治療的に有効な薬剤の各々の固定比を有する単一のカプセル剤を、または治療的に有効な薬剤の各々の複数の単一のカプセル剤で対象に投与することによって達成することができる。

【0177】

治療的に有効な各薬剤の逐次的または実質的に同時の投与は、それらに限定されないが、局所経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路および粘膜組織を経由する直接吸収を含む任意の適当な経路によって実行することができる。これらの治療薬は、同じ経路によって、または異なる経路によって投与されてもよい。例えば、選択される組合せの第1の治療的に有効な薬剤は注射によって投与し、組合せの他の治療的に有効な薬剤は局所的に投与してもよい。

【0178】

あるいは、例えば、全ての治療的に有効な薬剤は局所的に投与することができ、または全ての治療的に有効な薬剤は注射によって投与することができる。治療的に有効な薬剤が投与される順序は、特に明記しない限り厳密に重要でない。「併用療法」は、他の生物学的に活性な成分とさらに組み合わせた、前記の治療的に有効な薬剤の投与も包含することができる。併用療法が非薬物処置をさらに含む場合、非薬物処置は、治療的に有効な薬剤と非薬物処置の組合せの共同作用からの有益な効果が達成される限り、任意の適する時間に実行することができる。例えば、適当な場合には、非薬物処置が治療的に有効な薬剤の投与から、おそらく数日または数週でさえ一時的に切り離されるときでも、有益な効果はなお達成される。

【0179】

上において一般用語で概説されるように、本発明による医薬は、原則として当業者に公知であるいかなる形で投与することもできる。好ましい投与経路は全身投与であり、より好ましくは非経口投与、好ましくは注射による。あるいは、医薬は局所的に投与されてもよい。他の投与経路は、筋肉内、腹腔内、および皮下、*o r u m*経路、鼻腔内、気管内または肺を含み、最も低侵襲性であるが効率の確保された投与経路が優先される。

【0180】

非経口投与は、皮下、筋肉内または静脈内注射および注入のために一般に用いられる。さらに、非経口投与のための1つのアプローチは、当業技術者に周知である、一定レベルの投薬量が維持されることを保証する、緩効性または徐放性の系の埋め込みを使用する。

【0181】

さらに、本発明の好ましい医薬は、適する鼻腔内ビヒクル、吸入剤の局所使用による鼻腔内形で、または当業者に周知である経皮皮膚パッチの形を用いる経皮経路により投与することができる。経皮送達系の形で投与するために、投薬量の投与は、投薬レジメン全体を通して当然ながら間欠的ではなく連続的である。他の好ましい局所調製物には、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、エアゾールスプレー剤およびゲル剤が含まれる。

【0182】

本発明の方法、核酸分子、医薬組成物および医薬に有利に応答する対象には、ヒトおよびヒト患者を含む医科および獣医科の対象全般が含まれる。とりわけ、そのような対象は、好ましくは、ネコ、イヌ、大きな動物、トリ、例えばニワトリなどを含む群から選択される。

【0183】

本発明の医薬は、薬学的に許容される媒体に溶解または分散される、それに限定されないが本発明の核酸分子を含む、療法の活性成分の有効量を一般に含む。薬学的に許容される媒体または担体は、任意の全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤などを含む。医薬用の活性物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。補助活性成分が、本発明の医薬に組み込まれてもよい。

10

【0184】

さらなる態様では、本発明は医薬組成物に関する。そのような医薬組成物は、本発明による少なくとも1つの核酸分子、および好ましくは、薬学的に許容される添加剤を含む。そのような結合剤は、当技術分野で用いられ、および／または公知である任意の添加剤であってよい。より詳しくは、そのような添加剤は、本明細書に開示される医薬の製造に関連して論じられている、任意の添加剤である。さらなる実施形態では、医薬組成物はさらなる薬学的に活性な薬剤を含む。

【0185】

本発明の医薬および医薬組成物の調製は、本開示を考慮して当業者に知られる。一般的に、そのような組成物は、液体溶液もしくは懸濁液として注射剤として；注射前の液体の溶液もしくは懸濁液に適する固体形として；錠剤もしくは経口投与のための他の任意の固体として；時限放出カプセル剤として；または、点眼剤、クリーム剤、ローション剤、膏薬、吸入剤などを含む現在用いられている他の任意の形で調製することができる。手術分野で特定領域を処置するための、外科医、医師または医療従事者による無菌の製剤、例えば食塩水をベースとした洗浄液の使用も、特に有益かもしれない。組成物は、マイクロデバイス、微粒子またはスポンジを介して送達することもできる。

20

【0186】

製剤にした後、医薬は投薬製剤に適合する様式で、かつ薬理的に有効な量で投与される。製剤は、様々な剤形で、例えば上記の注射可能な溶液の型で容易に投与されるが、薬物放出カプセル剤などを使用することもできる。

30

【0187】

本発明の医薬は、時限放出および徐放性の錠剤またはカプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁剤、シロップ剤および乳剤として経口剤形で投与することもできる。坐薬は、脂肪性の乳剤または懸濁液から有利に調製される。

【0188】

医薬組成物または医薬は滅菌されてもよく、および／またはアジュバント、例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤または乳化剤、溶液促進剤、浸透圧を調節するための塩および／または緩衝剤を含有することができる。さらに、それらは他の治療的に価値ある物質を含有することもできる。組成物は、混合、顆粒化またはコーティング方法を含む従来技術によって調製され、約0.1%～75%、好ましくは約1%～50%の有効成分を一般的に含有する。

40

【0189】

液体、特に注射可能な組成物は、例えば、溶解すること、分散させることなどによって調製することができる。活性化合物は、薬学的に純粋な溶媒、例えば水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどに溶解されるか、それと混合され、それによって注射可能な溶液または懸濁液を形成する。さらに、注射の前に液体に溶解するのに適する固体形を調製することができる。

【0190】

本発明の医薬および核酸分子は、それぞれ、リボソーム送達系、例えば小単層膜小胞、

50

大単層膜小胞および多重膜小胞の形で投与することもできる。リボソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンを含有する種々のリン脂質から形成することができる。一部の実施形態では、脂質構成成分の膜が薬物の水溶液で水和されて、薬物を封入する脂質層を形成するが、それは当業者に周知である。例えば、本明細書に開示される本発明の核酸分子は、当技術分野で公知の方法を用いて構築される、親油性化合物または非免疫原性の高分子量化合物との複合体として提供することができる。さらに、リボソームは、細胞殺滅を仲介するために、細胞毒性薬剤を内部にターゲッティングおよび運ぶために、それらの表面に本発明の核酸分子を有することができる。核酸関連複合体の例は、米国特許第 6, 0 1 1, 0 2 0 号で提供される。

【0191】

10

本発明の医薬および核酸分子は、それぞれ、ターゲッティング可能な薬物担体として可溶性ポリマーと結合させることもできる。そのようなポリマーには、ポリビニルピロリドン、ピラン共重合体、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミドフェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミドフェノールまたはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンを含めることができる。さらに、本発明の医薬および核酸分子は、それぞれ、薬物の制御放出を達成するのに有益な生分解性ポリマーのクラス、例えば、ポリ乳酸、ポリε-カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレートおよびヒドロゲルの架橋または両親媒性のブロックコポリマーと結合させることができる。

【0192】

20

所望により、投与される本発明の医薬組成物および医薬は、それぞれ、少量の非毒性補助的物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH 緩衝剤、および他の物質、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を含有することもできる。

【0193】

本発明の核酸分子および医薬をそれぞれ用いる投薬レジメンは、患者の型、種、年齢、体重、性別および医学的状态；処置される状態の重症度；投与経路；患者の腎臓および肝臓の機能；ならびに、使用される本発明の特定の核酸またはその塩を含む、様々な因子に従って選択される。通常技術の医師または獣医は、状態の進行を予防、対抗または阻止するために必要な薬物の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【0194】

30

本明細書に開示される疾患のいずれかの処置における、本発明による核酸の有効な血漿レベルは、好ましくは、500 fM ~ 200 μM、好ましくは 1 nM ~ 20 μM、より好ましくは 5 nM ~ 20 μM、最も好ましくは 50 nM ~ 20 μM である。

【0195】

本発明の核酸分子および医薬のそれぞれは、好ましくは単一の日用量、2、3 日ごと、週ごと、一週おき、2 週ごと、月一の用量または 3 カ月ごとに投与することができる。

【0196】

本明細書に記載される医薬が、本明細書で開示される医薬組成物を構成することは、本発明の範囲内である。

【0197】

40

さらなる態様では、本発明は、そのような処置を必要とする対象の処置方法であって、それによって、本発明の核酸分子の少なくとも 1 種の薬学的に活性な量の投与を含む方法に関する。一実施形態では、対象は疾患を起こしているか、またはそのような疾患を起こす危険にあり、それによって、その疾患は、本明細書で開示される疾患のいずれか、特に医薬の製造のための本発明による核酸分子のいずれかの使用に関連して開示される疾患のいずれかである。

【0198】

本発明による核酸ならびにアンタゴニストが、医薬として、または医薬の製造のためにだけでなく、特に炎症を起こした局所の皮膚病変でのグルカゴンの関与に関して美容目的のために用いることもできることを理解すべきである。

50

【0199】

好ましくは本明細書で用いられるように、診断薬または診断用薬または診断手段（3つの用語の全ては断らない限り互換的に用いられる）は、グルカゴン、好ましくは本明細書に記載されるグルカゴン、より好ましくは本明細書に記載される様々な障害および疾患に関連して本明細書に記載されるグルカゴンを直接または間接に検出するのに適する。診断薬は、本明細書に記載される障害および疾患それぞれのいずれかの検出および／または経過観察に適する。そのような検出は、本発明による核酸分子のグルカゴンへの結合を通して可能である。そのような結合は、直接または間接に検出することができる。それぞれの方法および手段は、当業者に公知である。とりわけ、本発明による核酸分子は、本発明による核酸分子、好ましくはグルカゴンに結合している核酸の検出を可能にする標識を含むことができる。そのような標識は、好ましくは、放射性、酵素および蛍光性標識を含む群から選択される。原則として、抗体のために開発された全ての公知のアッセイを本発明による核酸分子のために採用することができるが、標的結合抗体は標的結合核酸と置換される。非標識の標的結合抗体を用いる抗体アッセイでは、検出は、好ましくは、放射性、酵素および蛍光性標識で修飾され、そのFc断片で標的結合抗体に結合する二次抗体によって行われる。核酸分子、好ましくは本発明による核酸分子の場合、核酸分子はそのような標識で修飾され、それによって、好ましくはそのような標識は、ビオチン、Cy-3およびCy-5を含む群から選択され、そのような標識は、そのような標識を標的にする抗体、例えば抗ビオチン抗体、抗Cy3抗体もしくは抗Cy5抗体によって検出され、または一標識がビオチンである場合には一標識はビオチンに自然に結合するストレプトアビジンもしくはアビジンによって検出される。そのような抗体、ストレプトアビジンまたはアビジンは、好ましくは、それぞれの標識、例えば放射性、酵素または蛍光性標識（二次抗体など）で次に修飾される。

10

20

【0200】

さらなる実施形態では、本発明による核酸分子は、第2の検出手段によって検出または分析され、前記検出手段は分子ビーコンである。分子ビーコンの方法は、当業者に公知であり、Mairalら（Mairalら、2008年）によってレビューされている。

【0201】

本発明による核酸分子を用いるグルカゴンの検出は、特に、本明細書に規定されるグルカゴンの検出を可能にすることが認められる。

30

【0202】

グルカゴンの検出に関連して、好ましい方法は以下のステップ：

- (a) グルカゴンの存在について試験される試料を提供するステップ、
- (b) 本発明による核酸分子を提供するステップ、
- (c) 試料と核酸分子を、好ましくは反応容器内で反応させるステップ

を含み、それによって、ステップ(a)はステップ(b)の前に実施することができ、または、ステップ(b)はステップ(a)の前に実施することができる。

【0203】

好ましい実施形態では、さらなるステップd)が提供され、それは試料と核酸分子との反応の検出からなる。好ましくは、ステップb)の核酸分子は、表面に固定化される。表面は、反応容器、例えば反応管の表面、プレートのウェル、またはそのような反応容器に含有されるデバイス、例えばビーズの表面であってよい。表面への核酸分子の固定化は、それらに限定されないが非共有または共有結合を含む、当業者に公知である任意の手段によって実行することができる。好ましくは、結合は、表面と核酸分子との間の共有化学結合を通して確立される。しかし、核酸分子が表面に間接に固定化され、それによって、そのような間接的な固定化はさらなる構成成分または一对の相互作用パートナーの使用を含むことも、本発明の範囲内である。そのようなさらなる構成成分は、好ましくは、固定化される核酸分子と特異的に相互作用し、したがって表面への核酸分子の結合を仲介する、相互作用パートナーとも呼ばれる化合物である。相互作用パートナーは、好ましくは、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される。好ましくは、相互作

40

50

用パートナーは抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。あるいは、相互作用パートナーは核酸分子であり、好ましくは機能的核酸分子である。より好ましくは、そのような機能的核酸分子は、前記核酸分子に少なくとも部分的に相補的である、アプタマー、シュビーゲルマーおよび核酸分子を含む群から選択される。さらなる代替の実施形態では、表面への核酸分子の結合は、多重編成の相互作用パートナーによって仲介される。そのような多重編成の相互作用パートナーは、好ましくは、一対の相互作用パートナー、または第1のメンバーおよび第2のメンバーからなる相互作用パートナーであり、それによって、第1のメンバーは核酸分子に含まれるかそれに結合し、第2のメンバーは表面に結合するかそれに含まれる。多重編成の相互作用パートナーは、好ましくは、ビオチンとアビジン、ビオチンとストレプトアビジン、およびビオチンとニュートラビジンを含む相互作用パートナーの対の群から選択される。好ましくは、相互作用パートナーの対の第1のメンバーはビオチンである。

10

【0204】

そのような方法の好ましい結果は、グルカゴンと核酸分子との固定化された複合体の形成であり、それによって、より好ましくは前記複合体が検出される。複合体からグルカゴンが検出されるのは、実施形態の範囲内である。

【0205】

この必要条件に適合するそれぞれの検出手段は、例えば、グルカゴンのその／それらの一部に特異的である任意の検出手段である。特に好ましい検出手段は、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される検出手段であり、その生成は当業者に公知である。

20

【0206】

グルカゴンの検出のための方法は、ステップc)を実施するために好ましくは用いられた反応容器から試料を除去することを含む。

【0207】

さらなる実施形態では、本方法は、グルカゴンの相互作用パートナーを表面に、好ましくは上で規定される表面に固定化するステップも含み、それによって、相互作用パートナーは、本明細書で、好ましくはそれぞれの方法に関連して上で規定される通りであり、より好ましくは、それらの様々な実施形態において、核酸分子、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む。この実施形態では、特に好ましい検出手段は本発明による核酸分子であり、それによって、そのような核酸分子は、好ましくは標識されてもよい、標識されなくてもよい。そのような核酸分子が標識される場合には、それは直接または間接に検出することができる。そのような検出は、好ましくは、本明細書に記載される核酸分子、ポリペプチドおよびタンパク質を含む群から同様に選択される、第2の検出手段の使用を含むこともできる。そのような検出手段は、好ましくは、本発明による核酸分子に特異的である。より好ましい実施形態では、第2の検出手段は、分子ビーコンである。好ましい実施形態では、核酸分子または第2の検出手段のいずれかまたは両方は、検出標識を含むことができる。検出標識は、好ましくは、ビオチン、プロモードソキシウリジン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識、UV標識、放射標識およびキレーター分子を含む群から選択される。あるいは、第2の検出手段は、好ましくは核酸に含有されるか、含まれるか、またはそれに結合している検出標識と相互作用する。特に好ましい組合せは、以下の通りである：

30

40

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はビオチンに対する抗体であり、または

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はアビジンもしくはアビジン含有分子であり、または

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はストレプトアビジンもしくはストレプトアビジン含有分子であり、または

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はニュートラビジンもしくはニュートラビジン含有分子であり、または

検出標識はプロモードソキシウリジンであり、第2の検出手段はプロモードソキシウリ

50

ジンに対する抗体であり、または

検出標識はジゴキシゲニンであり、第2の検出手段はジゴキシゲニンに対する抗体であり、または

検出標識はキレーターであり、第2の検出手段は放射性核種であり、それによって、前記検出標識は核酸分子に結合していることが好ましい。この種の組合せが、核酸分子が表面に結合している実施形態にも適用可能であることを認めるべきである。そのような実施形態では、検出標識が相互作用パートナーに結合していることが好ましい。

【0208】

最後に、第2の検出手段が第3の検出手段を用いて検出され、好ましくは、第3の検出手段は、酵素、より好ましくは第2の検出手段の検出により酵素反応を示す酵素であり、または第3の検出手段は、放射線、より好ましくは放射性核種によって放出される放射線を検出するための手段であることも、本発明の範囲内である。好ましくは、第3の検出手段は、第2の検出手段を特異的に検出し、および／またはそれと相互作用する。

【0209】

さらに、グルカゴンの相互作用パートナーが表面に固定化され、本発明による核酸分子が、好ましくは、相互作用パートナーとグルカゴンの間で形成される複合体に加えられる実施形態では、試料は反応から、より好ましくはステップc) および／またはd) が実施される反応容器から取り出すことができる。

【0210】

一実施形態では、本発明による核酸分子は蛍光部分を含み、その結果として、蛍光部分の蛍光は、核酸分子とグルカゴンおよび遊離グルカゴンの間での複合体形成により異なる。

【0211】

さらなる実施形態では、核酸分子は本発明による核酸分子の誘導体であり、それによって、核酸分子の誘導体は、アデノシンを交換する、アデノシンの少なくとも1つの蛍光性誘導体を含む。好ましい実施形態では、アデノシンの蛍光性誘導体は、エテノアデノシンである。

【0212】

さらなる実施形態では、本発明による核酸分子の誘導体およびグルカゴンからなる複合体は、蛍光を用いて検出される。

【0213】

本方法の一実施形態では、ステップ(c) またはステップ(d) でシグナルが生成され、好ましくは、シグナルは試料中のグルカゴンの濃度と相関している。

【0214】

好ましい実施形態では、アッセイは96ウェルプレートで実施することができ、そこで、構成成分は前記のように反応容器に固定化され、ウェルは反応容器の役割をする。

【0215】

本発明の核酸分子は、薬剤発見のための出発物質としてさらに用いることができる。基本的に、2つの可能なアプローチがある。1つのアプローチは化合物ライブラリーのスクリーニングであり、そのような化合物ライブラリーは好ましくは低分子量化合物ライブラリーである。その実施形態では、スクリーニングはハイスループットスクリーニングである。

【0216】

好ましくは、ハイスループットスクリーニングは、標的ベースのアッセイでの化合物の速く、効率的な試行錯誤評価である。最良の場合には、分析は比色測定によって実行される。それとの関連で用いられるライブラリーは、当業者に公知である。

【0217】

例えば当業者に公知である競合アッセイを用いる化合物ライブラリーのスクリーニングの場合、適当なグルカゴン類似体、グルカゴンアゴニストまたはグルカゴンアンタゴニストを見出すことができる。そのような競合アッセイは、以下の通りに設定することができ

10

20

30

40

50

る。本発明の核酸分子、好ましくはシュペーゲルマー、すなわち本発明のL-核酸を、固体相に結合する。グルカゴン類似体を同定するために、標識グルカゴンをアッセイに加えてもよい。潜在的類似体は、本発明の核酸分子に結合するグルカゴン分子と競合し、それは、それぞれの標識によって得られるシグナルの減少と並行する。アゴニストまたはアンタゴニストについてのスクリーニングは、当業者に公知である細胞培養アッセイの使用を含むことができる。

【0218】

好ましくはグルカゴンの検出のために、より好ましくはグルカゴンの検出のために、本発明によるキットは、本発明の核酸分子の種の少なくとも1つまたはいくつかを含むことができる。さらに、キットは、少なくとも1つまたはいくつかの陽性または陰性の対照を含むことができる。陽性対照は、好ましくは液体の形である、例えば、グルカゴン、特に本発明の核酸分子がそれに対して選択されるもの、またはそれが結合するものであってよい。陰性対照は、例えば、グルカゴンに類似した生物物理特性で規定されるが、本発明の核酸分子によって認識されないペプチドであってよい。さらに、前記キットは、1つまたはいくつかの緩衝剤を含むことができる。乾燥もしくは凍結乾燥された形で、または液体に溶解されて、様々な成分がキットに含有されてもよい。キットは1つまたはいくつかの容器を含むことができ、それは、次に、キットの1つまたはいくつかの成分を含有することができる。さらなる実施形態では、キットは、キットおよびその様々な成分の使用法に関する情報を使用者に提供する説明書または説明用リーフレットを含む。

【0219】

本発明による核酸の薬学的小および生物分析的測定は、ヒトおよびヒト以外の体のいくつかの体液、組織および器官でのその薬物動態学的小および生体力学的プロファイルの評価にとって重要である。そのような目的のために、本明細書で開示されるか、または当業者に公知である検出方法のいずれかを用いることができる。本発明のさらなる態様では、本発明による核酸分子の検出のためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイが提供される。検出アッセイの範囲内で、捕捉プローブおよび検出プローブが用いられる。捕捉プローブは、本発明による核酸分子の第1の部分に、検出プローブは第2の部分に相補的である。捕捉プローブは、表面またはマトリックスに固定化される。検出プローブは、好ましくは、本明細書で前述の通りに検出することができるマーカー分子または標識を有する。

【0220】

本発明による核酸分子の検出は、以下の通りに実行することができる：

本発明による核酸分子は、その末端の1つで捕捉プローブと、および他の末端で検出プローブとハイブリダイズする。その後、未結合の検出プローブが、例えば1回または数回の洗浄ステップで除去される。標識またはマーカー分子を好ましくは有する結合した検出プローブの量は、その後、例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO/2008/052774でより詳細に概説される通りに測定することができる。

【0221】

好ましくは本明細書で用いられるように、好ましい実施形態では、処置という用語は、さらに、または代わりに予防および／または経過観察を含む。

【0222】

好ましくは本明細書で用いられるように、断らない限り、疾患および障害という用語は互換的に用いられるものとする。

【0223】

本明細書で用いられるように、含むという用語は、好ましくは、そのような用語が続くか、またはそれによって記載される主題を限定することを意図しない。しかし、代わりの実施形態では、含むという用語は含有するという意味で、したがってそのような用語が続くか、またはそれによって記載される対象物を限定すると理解されるものとする。

【0224】

様々な配列番号、本発明による核酸分子の化学的性質、その実際の配列および内部参照

番号は、以下の表に要約される。

【表 1 A】

A型のグルカゴン結合核酸分子

化合物	nt.	配列	5' -> 3'	Comp (APM)	PD (APM) K ₀ [nM]	PD (SPM) K ₀ [nM]	CHO_GR IC ₅₀ [nM]
257-A1-001	47	GCACTGGG	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	<	143		
257-D4-001	47	GCACTGGG	TGAAATGGAGGGCTATGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	<<			
257-F4-001	47	GCACTGAT	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAAAGCAGTGC	<			
257-B3-001	47	GCACTAGC	TGAAATGGAGGGCTAGGCGGAAGGAATCTGAGGTAGTGC	<<			
257-D3-001	47	GCACTAA	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTAAGGTAGTGC	<<			
257-E4-001	47	GCACTGGG	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGTCACTGC	=	124		
257-E1-001	47	GCACTGGG	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTGC	=	137	179	500-1000
257-C4-001	47	GCACTTAC	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGGAGTAAATGC	<<			
257-C1-001	47	GCGCTGGG	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	<			
257-H2-001	47	GCGCCAGC	TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGTCGGCGC	<			

nt.:ヌクレオチドの数 G、C、TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドである

APM:アプタマー SPM:シユピーゲルマー

□で縁取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

図 1

【表 1 B】

配列番号	配列	内部参照
17	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGGAGGGCTAGGTGGArAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R30-001
18	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGrGGAGGGCTAGGTGGrAAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R15/29-001
19	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGGAGGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R29/30-001
20	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGrGGAGGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R15/29/30-001
21	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGGGArGGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R18/29/30-001
22	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGAAATGrGGArGGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACTG C	257-E1-R15/18/29/30-001
23	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACTG TGC	257-E1-6xR-001
24	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GAGTGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACT C	257-E1-6xR-003
25	L-DNA/ <u>L-RNA</u> AGTGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACT	257-E1-6xR-004
26	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGGTGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACC C	257-E1-6xR-005
27	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGTGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTACG C	257-E1-6xR-006
28	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGCGGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTGCC C	257-E1-6xR-007
29	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGCGGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCTGCG C	257-E1-6xR-008
30	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGCGGGGrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGAGCCGCC C	257-E1-6xR-009

10

20

30

40

【表 1 C】

配列番号	配列	内部参照
31	L-DNA/ <u>L-RNA</u> CGCGGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCGCG</u> C	257-E1-6xR-010
32	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGGCCGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCGGCC</u> C	257-E1-6xR-011
33	L-DNA/ <u>L-RNA</u> CGCGGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCGGCG</u> C	257-E1-6xR-012
34	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GAGCGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCGCT</u> C	257-E1-6xR-013
35	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GAGCGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCGGCT</u> C	257-E1-6xR-014
36	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GAGTGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCACT</u> C	257-E1-6xR-015
37	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGTGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCACG</u> C	257-E1-6xR-016
38	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GAGTCGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCGACT</u> C	257-E1-6xR-017
39	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGTCGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCGACG</u> C	257-E1-6xR-018
40	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGCGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCGCC</u> C	257-E1-6xR-019
41	L-DNA/ <u>L-RNA</u> CGCGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCGCG</u> C	257-E1-6xR-020
42	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCGC</u> C	257-E1-6xR-029
43	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCG</u> C	257-E1-6xR-030
44	L-DNA/ <u>L-RNA</u> CGGG <u>CGAAATG</u> <u>GGAG</u> <u>GGCTAGGTGG</u> <u>ArAGGAATCTGAGCCG</u> C	257-E1-6xR-031

10

20

30

40

【表 1 D】

配列番号	配列	内部参照
45	L-DNA / <u>L-RNA</u> GGG <u>GrGAAATGrGGA</u> <u>rGrGGCTAGGTGG</u> <u>rArAGGAATCTGAGCC</u>	257-E1-6xR-032
46	L-DNA / <u>L-RNA</u> GG <u>GrGAAATGrGGA</u> <u>rGrGGCTAGGTGG</u> <u>rArAGGAATCTGAGC</u>	257-E1-6xR-033
47	L-DNA / <u>L-RNA</u> GCGCGG <u>GrGAAATGrGGA</u> <u>rGrGGCTAGGTGG</u> <u>rArAGGAATCTGAGCCG</u> CGC	257-E1-7xR-023
48	L-DNA / <u>L-RNA</u> GCG <u>GrGAAATGrGGA</u> <u>rGrGGCTAGGTGG</u> <u>rArAGGAATCTGAGCGC</u>	257-E1-7xR-037
49	L-DNA CGACTCGAGAGGAAAGGTTGCTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-D5-001
50	L-DNA CGACTCGAGAGGAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-H6-001
51	L-DNA CGACTCGAGAGGAAAGGTTGGTATAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-B7-001
52	L-DNA CGACTCGAGAGGAAATGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-B8-001
53	L-DNA CGACTCGAGAGGAGAGGTTGGTAAAGATTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-A5-001
54	L-DNA CGGCTCGAGAGGAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-C8-001
55	L-DNA CGACTCGAGATGAAAGGTTGGCAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-E5-001
56	L-DNA CGAGTCGATAGAAGGTCGGTAAGTTTCGGTAGGATCTGCCACGAGACG	259-E7-001
57	L-DNA CGAGTCGATAGAAGGTTGGTAAGTTTCGGTTGGATCTGCCACGAGACG	259-F5-001
58	L-DNA ACTCGAGAGGAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGT	259-H6-002
59	L-DNA GTCGAGAGGAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAC	259-H6-005

10

20

30

40

【表 1 E】

配列番号	配列	内部参照
60	L-DNA	259-H6-003
61	L-DNA	259-H6-004
62	L-DNA	259-H6-006
63	L-DNA	259-H6-007
64	L-DNA	259-H6-008
65	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R13
66	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R24
67	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R36
68	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R13/24
69	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R13/36
70	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R24/36
71	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-002-R13/24/36

10

20

30

40

【表 1 F】

配列番号	配列	内部参照
72	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-005-R12
73	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-009-R12
74	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-010-R12
75	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-011-R12
76	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-012-R12
77	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-013-R12
78	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-014-R12
79	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-015-R12
80	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-016-R12
81	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-014-R12/23/35
82	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	259-H6-014-R12/23/29/35/38
83	L-DNA	258-D4-001
84	L-DNA	258-H1-001
85	L-RNA	GLU-18-25-A3-001

10

20

30

40

【表 1 G】

配列番号	配列	内部参照
86	L-RNA	GLU-18-25-A3-002
87	L-RNA	CGACGUGUGGGUAGAUGCACCUGCGGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCG CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCUGCGGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG
88	L-DNA	NOX-G11stabi2 = GLU-18-25-A3-003
89	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	NOX-G12 = 259-H6 -002-5'-PEG
90	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	NOX-G13 = 259-H6 -002-R13-5'-PEG
91	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	NOX-G14 = 259-H6 -014-R12/23/35-5' '-PEG
92	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	NOX-G15 = 257-E1 -6xR-030-5'-PEG NOX-G16 = 257-E1 -7xR-037-5'-PEG

10

20

30

40

【表 1 H】

配列番号	配列	内部参照
93	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGG <u>g</u> GAATGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R9-001
94	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGGAATGGGA <u>r</u> GGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R18-001
95	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GCAGTGGGGAATGGGAG <u>r</u> GGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-R19-001
96	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGAd <u>CC</u> GUGUGUGGGUAGAUGCACCUGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D05
97	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACG <u>d</u> TGUGUGGGUAGAUGCACCUGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D07
98	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGG <u>d</u> TAGAUGCACCUGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D15
99	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGU <u>d</u> AGAUGCACCUGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D16
100	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGUAGAd <u>T</u> GCA <u>CC</u> UGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D19
101	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGUAGAU <u>d</u> GCA <u>CC</u> UGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D20
102	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGUAGAUG <u>d</u> CA <u>CC</u> UGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D21
103	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGUAGAUGC <u>da</u> CCUGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D22
104	L-RNA/ <u>L-DNA</u> CAGACGUGUGUGGGUAGAUGCAd <u>CC</u> UGCGAUUUGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D23

10

20

30

40

【表 1 I】

配列番号		配列	内部参照
105	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCAC <u>d</u> CUGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG G	NOX-G11-D24
106	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCC <u>d</u> TGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D25
107	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCU <u>d</u> GCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D26
108	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCU <u>d</u> CGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	NOX-G11-D27
109	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCU <u>d</u> CAGAUUCGCUAAAAAGUGCC <u>d</u> ACACGUCUG	NOX-G11-D46
110	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CAGACGUGUGGGUAGAUGCACCU <u>d</u> CUGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCAC <u>d</u> ACGUCUG	NOX-G11-D48
111	D-DNA	GCACTGGTGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	257-A1-001
112	D-DNA	GCACTGGTGAAATGGGAGGGCTATGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	257-D4-001
113	D-DNA	GCACTGATGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAAGCAGTGC	257-F4-001
114	D-DNA	GCACTAGGGAATGGGAGGGCTAGGCGGAAGGAATCTGAGGTAGTGC	257-B3-001
115	D-DNA	GCACTAACGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTAAGGTAGTGC	257-D3-001
116	D-DNA	GCACTGGCGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGTCACTGC	257-E4-001
117	D-DNA	GCACTGGGGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTGC	257-E1-001
118	D-DNA	GCATTACTGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGGAGTAATGC	257-C4-001
119	D-DNA	GCGCTGGGGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGGCAGTGC	257-C1-001

10

20

30

40

【表 1 J】

配列番号	配列	内部参照
120	D-DNA GCGCCAGCGAAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGTCGGCGC	257-H2-001
121	D-DNA CAGTGGGAAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTG	257-E1-002
122	D-DNA GAGTGGGAAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACTC	257-E1-003
123	D-DNA AGTGGGAAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTACT	257-E1-004
124	D-DNA GTGGGAAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAGCTAC	257-E1-005
125	D-DNA CGACTCGAGAGGAAAAGGTTGCTAAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-D5-001
126	D-DNA CGACTCGAGAGGAAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-H6-001
127	D-DNA CGACTCGAGAGGAAAAGGTTGGTATAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-B7-001
128	D-DNA CGACTCGAGAGGAAAATGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-B8-001
129	D-DNA CGACTCGAGAGGAGAGGTTGGTAAAGATTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-A5-001
130	D-DNA CGGCTCGAGAGGAAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-C8-001
131	D-DNA CGACTCGAGATGAAAAGGTTGGCAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGTC G	259-E5-001
132	D-DNA CGAGTCGATAGAAGGTCGGTAAGTTTCGGTAGGATCTGCGACGAGACG	259-E7-001
133	D-DNA CGAGTCGATAGAAGGTTGGTAAGTTTCGGTTGGATCTGCGACGAGACG	259-F5-001
134	D-DNA ACTCGAGAGGAAAAGGTTGGTAAAGGTTCCGGTTGGATTCACTCGAGT	259-H6-002

10

20

30

40

【表 1 K】

配列番号	配列	内部参照
135	D-DNA	259-H6-005
136	D-DNA	259-H6-003
137	D-DNA	259-H6-004
138	D-DNA	259-H6-006
139	D-DNA	259-H6-007
140	D-DNA	259-H6-008
141	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-002-R13
142	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-005-R12
143	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-009-R12
144	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-010-R12
145	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-011-R12
146	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-012-R12
147	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-013-R12
148	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-014-R12
149	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-015-R12

10

20

30

40

【表 1 L】

配列番号	配列	内部参照
150	D-DNA/ <u>D-RNA</u>	259-H6-016-R12
151	D-DNA	258-D4-001
152	D-DNA	258-H1-001
152	D-RNA	GLU-18-25-A3-001
153	D-RNA	GLU-18-25-A3-002
154	D-RNA	NOX-G11stabi2 = GLU-18-25-A3-003
155	L-DNA	259-H6-002-5'- γ $\equiv$ /
156	L-DNA/ L-RNA	259-H6-002-R13-5'- γ $\equiv$ /
157	L-DNA/ L-RNA	259-H6-014-R12/23/35-5'- γ $\equiv$ /
158	L-DNA/ L-RNA	257-E1-6xR-030-5'- γ $\equiv$ /
159	L-DNA/ L-RNA	257-E1-7xR-037-5'- γ $\equiv$ /

10

20

30

40

【表 1 M】

配列番号	配列	内部参照
160	L-ペプチド RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNEDKRHSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQW LMNTKRNRNIA	グリセンチン
161	L-ペプチド RSLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNE	GRPP
162	L-ペプチド HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRNIA	OXY/OXM
163	L-ペプチド HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT	グルカゴン (ヒト、ラット、マウス、リスザル、ブタ、ウサギ、ハムスター、イヌ、ヒツジ、ニワトリ、ウシ)
164	L-ペプチド HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	GLP-1
165	L-ペプチド HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG	GLP-1 (7-37)
166	L-ペプチド HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR	GLP-1 (7-36)
167	L-ペプチド HADGSFSDNMNTILDNLARDFINWLIQTITD	GLP-2
168	L-ペプチド YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKNDWKHNITQ	GIP

10

20

30

40

【表 1 N】

配列番号	配列	内部参照
169	L-ペプチド HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLESLMGKRVSSNISSEDPVPV	腸管ペプチド PHV-42 / Pr epro-VIP (81-122)
170	L-ペプチド HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLESLM	腸管ペプチド PHM-27
171	L-ペプチド HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQQFLKWLLNV	グルカゴン (モルモット)
172	L-ペプチド HSQGTFTSDYSKHLDSRYAQEFVQWLMT	グルカゴン (チンチラ)

10

20

30

40

【表 10】

配列番号	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	配列
173	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	Bn ₁ AAATGn ₂ GAn ₃ n ₄ GCTAKGn ₅ GGn ₆ n ₇ GGAATCTRRR 式中、n ₁ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₅ はYまたは <u>rt</u> であり、n ₆ はAまたは <u>ra</u> であり、n ₇ はAまたは <u>ra</u> である。
174	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	Bn ₁ AAATGn ₂ GAn ₃ n ₄ GCTAGGn ₅ GGn ₆ n ₇ GGAATCTGAR 式中、n ₁ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₅ はTまたは <u>rt</u> であり、n ₆ はAまたは <u>ra</u> であり、n ₇ はAまたは <u>ra</u> である。
175	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	Tn ₁ AAATGn ₂ GAn ₃ n ₄ GCTAGGn ₅ GGn ₆ n ₇ GGAATCTGAG 式中、n ₁ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₅ はTまたは <u>rt</u> であり、n ₆ はAまたは <u>ra</u> であり、n ₇ はAまたは <u>ra</u> である。
176	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	Tn ₁ AAATGn ₂ GAn ₃ n ₄ GCTAGGn ₅ GGn ₆ n ₇ GGAATCTGAA 式中、n ₁ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₅ はTまたは <u>rt</u> であり、n ₆ はAまたは <u>ra</u> であり、n ₇ はAまたは <u>ra</u> である。
177	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	Cn ₁ AAATGn ₂ GAn ₃ n ₄ GCTAGGn ₅ GGn ₆ n ₇ GGAATCTGAG 式中、n ₁ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₅ はTまたは <u>rt</u> であり、n ₆ はAまたは <u>ra</u> であり、n ₇ はAまたは <u>ra</u> である。

10

20

30

40

【表 1 P】

配列番号	配列
178	Gn₁AAATGn₂GA n₃n₄GCTAGGn₅GGn₆n₇GGAATCTGAG 式中、n₁はGまたは<u>rg</u>であり、n₂はGまたは<u>rg</u>であり、n₃はGまたは<u>rg</u>であり、n₄はGまたは<u>rg</u>であり、n₅はTまたは<u>rt</u>であり、n₆はAまたは<u>ra</u>であり、n₇はAまたは<u>ra</u>である。
179	G <u>rg</u> AAATGGGAGGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAG
180	GGAAATG <u>rg</u> GGAGGCTAGGTGGAAGGAATCTGAG
181	GGAAATGGGA <u>rg</u> GGCTAGGTGGAAGGAATCTGAG
182	GGAAATGGGAG <u>rg</u> GGCTAGGTGGAAGGAATCTGAG

10

20

30

40

【表 1 Q】

配列番号	配列
183	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATGGAGGGCTAGGTGG <u>r</u> AGGAATCTGAG
184	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATGGAGGGCTAGGTGG <u>r</u> AGGAATCTGAG
185	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATG <u>r</u> GGAGGGCTAGGTGG <u>r</u> AGGAATCTGAG
186	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATGGAGGGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
187	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATG <u>r</u> GGAGGGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
188	L-DNA/ <u>L-RNA</u> GGAAATGGGA <u>r</u> GGGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
189	L-DNA/ <u>L-RNA</u> G <u>r</u> GAAATG <u>r</u> GGA <u>r</u> GGGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
190	L-DNA/ <u>L-RNA</u> G <u>r</u> GAAATG <u>r</u> GGA <u>r</u> G <u>r</u> GGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
191	L-DNA/ <u>L-RNA</u> G <u>r</u> GAAATG <u>r</u> GGA <u>r</u> G <u>r</u> GGCTAGGTGG <u>r</u> ArAGGAATCTGAG
192	L-DNA BGAAATGGAGGGCTAKGYGGAAGGAATCTRRR
193	L-DNA TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG
194	L-DNA TGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAA
195	L-DNA CGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG
196	L-DNA GGAAATGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG
197	L-DNA/ <u>L-RNA</u> AKGAR n ₁ KGTTGSYAWAn ₂ RTTCGn ₃ TTGGAn ₄ TCn ₅ 式中、n ₁ はAまたはrAであり、n ₂ はgまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はgまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はTまたは <u>rv</u> であり、n ₅ はAまたはrAである。
198	L-DNA AGAAGGTTGGTAAAGTTTCGGTTGGATCTG
199	L-DNA AGAAGGTCGGTAAAGTTTCGGTAGGATCTG

10

20

30

40

【表 1 R】

配列番号		配列
200	L-DNA	AGGAAGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
201	L-DNA	AGGAAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
202	L-DNA	AGGAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
203	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAAn ₁ GTTGGTAAAn ₂ GTTTCGn ₃ TTGGAn ₄ TCn ₅ 式中、n ₁ はAまたはrAであり、n ₂ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₃ はGまたは <u>rg</u> であり、n ₄ はTまたは <u>ru</u> であり、n ₅ はAまたはrAである。
204	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
205	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAAAGGTTGGTAAArGGTTTCGGTTGGATTCA
206	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTCA
207	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGGTTGGATTCA
208	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTCG
209	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGArUTCA
210	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGGTTGGArUTCA
211	L-DNA/ <u>L-RNA</u>	AGGAArAGGTTGGTAAArGGTTTCGrGTTGGArUTCrA
212	L-DNA	AGGAAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
213	L-DNA	AAGTTGGTA
214	L-DNA	AGGTTTCGGTTGGAT
215	L-DNA	AGTTTCGGTTGGAT
216	L-DNA	AGTTTCGGTAGGAT
217	L-DNA	AGTTTCGGTAGGAT

10

20

30

40

【表 1 S】

配列番号		配列
218	L-DNA	AGGAAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
219	L-DNA	AGGAAAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA
220	L-DNA	AGGAAAGGTTGGTAAAGGTTTCGGTTGGATTCA
221	L-DNA	AKGARAKGTTGSIYAWAGRTTCGGTTGGATTCA

【 0 2 2 5】

本発明は、図面、実施例および配列表によりさらに説明され、それらから、さらなる特

10

20

30

40

50

徴、実施形態および利点が解釈され得る。

【図面の簡単な説明】

【0226】

【図1】「A型」の本発明のグルカゴン結合核酸分子の配列のアラインメントを示す図である。

【図2A】「A型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子257-E1-001の誘導体を示す図である。

【図2B】「A型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子257-E1-001の誘導体を示す図である。

【図3A】「A型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子257-E1-6xR-001の誘導体を示す図である。

【図3B】「A型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子257-E1-6xR-001の誘導体を示す図である。

【図3C】「A型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子257-E1-6xR-001の誘導体を示す図である。

【図4】「B型」の本発明のグルカゴン結合核酸分子の配列のアラインメントを示す図である。

【図5】「B型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子259-H6-001の誘導体を示す図である。

【図6A】「B型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子259-H6-002の誘導体を示す図である。

【図6B】「B型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子259-H6-002の誘導体を示す図である。

【図6C】「B型」のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子259-H6-002の誘導体を示す図である。

【図7】「C型」の本発明のグルカゴン結合核酸分子の配列のアラインメントを示す図である。

【図8】「C型」の本発明のさらなるグルカゴン結合核酸分子の配列のアラインメントを示す図である。

【図9】シュピーゲルマー257-E1-001ならびにその誘導体257-E1-R15(257-E1-R15-001とも称される)、257-E1-R29(257-E1-R29-001とも称される)および257-E1-6xR-001のビオチン化グルカゴンに対する競合プルダウンアッセイの結果を示す図である。ここで、シュピーゲルマー257-E1-001または257-E1-6xR-001が標識され(→参照分子)、37℃でのビオチン化グルカゴンへの参照配列の結合を、0.032~5000nMの非標識シュピーゲルマーと競合させた。

【図10】グルカゴン結合シュピーゲルマー259-H6-002-R13、259-H6-002-R24および259-H6-002-R36対シュピーゲルマー259-H6-002の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力的評価を示す図である。ここで、シュピーゲルマーの500nM注入に関するデータが示される。

【図11】グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G13の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力的評価を示す図である。ここで、1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9および1.95~0nMのシュピーゲルマーNOX-G13に関するデータが示される。

【図12】グルカゴン結合シュピーゲルマー259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-002-R13-R24、259-H6-002-R13-R36、259-H6-002-R24-R36および259-H6-002-R13-R24-R36対シュピーゲルマー259-H6-002の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力的評価

を示す図である。ここで、シュピーゲルマーの500 nM注入に関するデータが示される。

【図13】グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G14の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力学的評価を示す図である。ここで、125、62、5、31、3、15、6、7、8、3、9、1、95および0 nMのシュピーゲルマーNOX-G14に関するデータが示される。

【図14】グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G15の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力学的評価を示す図である。ここで、125、62、5、31、3、15、6、7、8、3、9、1、95および0 nMのシュピーゲルマーNOX-G15に関するデータが示される。

【図15】グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G16の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力学的評価を示す図である。ここで、125、62、5、31、3、15、6、7、8、3、9、1、95および0 nMのシュピーゲルマーNOX-G16に関するデータが示される。

【図16】シュピーゲルマー259-H6-002ならびにその誘導体259-H6-002-R13および259-H6-002-R13-R24-R36（259-H6-002-R13/24/36とも称される）によるcAMPのグルカゴン誘導性生産の阻害を示す図である。ここで、a) ウェル1個当たりのcAMPの生成量を、各データセットの最大値に対して正規化して、シュピーゲルマー濃度に対する活性パーセントとして表した。

【図17】シュピーゲルマーNOX-G15およびNOX-G16によるcAMPのグルカゴン誘導性生産の阻害を示す図である。ここで、a) ウェル1個当たりのcAMPの生成量を、各データセットの最大値に対して正規化して、シュピーゲルマー濃度に対する活性パーセントとして表し、b) cAMP生産が50%分阻害されるシュピーゲルマー濃度（IC₅₀）を、Prism5ソフトウェアを用いて非線形回帰（4つのパラメータフィット）を使用して算出し、c) 決定したNOX-G15（5回の独立した実験）およびNOX-G16（3回の独立した実験）に関するIC₅₀値は、それぞれ3.44 nMおよび2.43 nMであった。

【図18】シュピーゲルマー259-H6-002、259-H6-002-R13-PEG（NOX-G13とも称される）および257-E1-001によるcAMPのGIP誘導性生産の阻害を示す図である。ここで、a) ウェル1個当たりのcAMPの生成量を、各データセットの最大値に対して正規化して、シュピーゲルマー濃度に対する活性パーセントとして表し、b) cAMP生産が50%阻害されるシュピーゲルマー濃度（IC₅₀）を、Prism5ソフトウェアを用いて非線形回帰（4つのパラメータフィット）を使用して算出し、c) シュピーゲルマー259-H6-002および259-H6-002-R13-PEGは、GIP誘導性cAMP生成の用量依存性阻害を示し、シュピーゲルマー257-E1-001は、GIPに対する阻害活性を示さなかった。

【図19】シュピーゲルマーNOX-G13、NOX-G14、NOX-G15およびNOX-G16と競合相手ペプチドグルカゴンであるグルカゴン依存性インスリン分泌性ポリペプチド（略記、GIP）、グルカゴン様ペプチド-1（略記、GLP-1）（7~37）、グルカゴン様ペプチド-2（略記、GLP-2）（1~33）、オキシントモジュリン（略記、OXM）および血管作動性腸管ペプチド（略記、VIP）との競合ピアコア選択性アッセイのデータを示す図である。対照は「競合相手ペプチドなし」を意味し、データは、対照（100%）に対して正規化した。

【図20A】シュピーゲルマー257-E1-6xR-001、257-E1-7xR-037、257-E1-6xR-030-5'-PEG（NOX-G15とも称される）、257-E1-7xR-037-5'-PEG（NOX-G16とも称される）、259-H6-002-R13-5'-PEG（NOX-G13とも称される）および259-H6-014-R12/23/35-5'-PEG（NOX-G14とも称される）のグルカゴン、GIP、GLP-1、OXMおよびVIPへの結合、ならびにインビトロでの

10

20

30

40

50

グルカゴン誘導性 cAMP 生成に対する上記シュピーゲルマーの効果との GIP、GLP-1、OXM および VIP の競合に関するデータを示す図である。

【図 20B】シュピーゲルマー 257-E1-6xR-001、257-E1-7xR-037、257-E1-6xR-030-5'-PEG (NOX-G15 と称される)、257-E1-7xR-037-5'-PEG (NOX-G16 と称される)、259-H6-002-R13-5'-PEG (NOX-G13 と称される) および 259-H6-014-R12/23/35-5'-PEG (NOX-G14 と称される) のグルカゴン、GIP、GLP-1、OXM および VIP への結合、ならびにインビトロでのグルカゴン誘導性 cAMP 生成に対する上記シュピーゲルマーの効果との GIP、GLP-1、OXM および VIP の競合に関するデータを示す図である。

10

【図 21】グリセンチン、グリセンチン関連ポリペプチド (省略名 = GRPP)、オキシントモジュリン (省略名 = OXY、省略名 = OXM)、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド 1 (省略名 = GLP-1)、グルカゴン様ペプチド 1 (7~37) (省略名 = GLP-1 (7~37))、グルカゴン様ペプチド 1 (7~36) (省略名 = GLP-1 (7~36)) およびグルカゴン様ペプチド 2 (省略名 = GLP-2) のアミノ酸配列を示す図である。

【図 22】様々な種のグルカゴンのアミノ酸配列を示す図である。

【図 23A】経時的な血中グルコース (平均値および SEM) を示す図 23A および曲線下面積 (AUC) 決定を示す図 23B による 1 型糖尿病マウスモデルにおける腹腔内グルコース負荷試験の結果を示す図である。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル: * 平均値 $p < 0.05$ 、** 平均値 $p < 0.01$ 。

20

【図 23B】経時的な血中グルコース (平均値および SEM) を示す図 23A および曲線下面積 (AUC) 決定を示す図 23B による 1 型糖尿病マウスモデルにおける腹腔内グルコース負荷試験の結果を示す図である。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル: * 平均値 $p < 0.05$ 、** 平均値 $p < 0.01$ 。

【図 24A】2 型糖尿病マウスモデルにおける腹腔内グルコース負荷試験を示す図である。(A): 経時的な血中グルコースを示し、また (B): 曲線下面積 (AUC) 決定を示す。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル: * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

30

【図 24B】2 型糖尿病マウスモデルにおける腹腔内グルコース負荷試験を示す図である。(A): 経時的な血中グルコースを示し、また (B): 曲線下面積 (AUC) 決定を示す。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル: * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図 25A】「C 型」の本発明のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子 NOX-G11stab i の誘導体を示す図である。

【図 25B】「C 型」の本発明のグルカゴン結合核酸分子であるグルカゴン結合核酸分子 NOX-G11stab i の誘導体を示す図である。

【図 26】グルカゴン結合シュピーゲルマー NOX-G11stab i 2、NOX-G11-D07、NOX-G11-D16、NOX-G11-D19、NOX-G11-D21 および NOX-G11-D22 の固定化ビオチン化ヒトグルカゴンに対するピアコア測定による動力的評価を示す図である。

40

【図 27】1 型糖尿病マウスモデルにおける腹腔内グルコース負荷試験を示す図である。(A): NOX-G16 の単回用量後の 1 日目、(B): NOX-G16 の 5 回用量 (q1d) 後の 5 日目、および (C): NOX-G16 の 7 回用量 (q1d) 後の 7 日目。上部パネル: 経時的な血中グルコース (平均値および SEM)。下部パネル: 曲線下面積 (AUC) 決定。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル: * $p < 0.05$ 。

【図 28】9 回 NOX-G16 用量 (q1d) 後の 9 日目の血漿 FGF-21 レベルを示

50

す図である。データは、一元配置 ANOVA およびチューキーポストテストを使用して解析した。ビヒクル群に対して有意なレベル：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図 29】本発明による核酸分子を構成する 2' デオキシリボヌクレオチドを示す図である。

【図 30A】本発明による核酸分子を構成するリボヌクレオチドを示す図である。

【図 30B】本発明による核酸分子を構成するリボヌクレオチドを示す図である。

【実施例 1】

【0227】

＜グルカゴンを結合する核酸分子＞

いくつかのグルカゴン結合核酸分子およびそれらの誘導体を特定した。それらのヌクレオチド配列を図 1～図 8 に表す。グルカゴン結合核酸分子は、

a) アプタマー（すなわち直接的プルダウンアッセイ（実施例 3）および／または比較的競合プルダウンアッセイ（実施例 3）を使用して、D-核酸分子として）、

b) シュピーゲルマー（すなわち比較的競合プルダウンアッセイ（実施例 3）を使用して、表面プラズモン共鳴測定（実施例 4）により、およびヒトグルカゴン受容体によるインビトロアッセイ（実施例 5）により L-核酸）（さらに、シュピーゲルマーはインビボで試験された（実施例 8））

を特徴とした。

【0228】

シュピーゲルマーおよびアプタマーは、実施例 2 に記載するように合成した。

【0229】

このようにして生成された核酸分子は、わずかに異なる配列を示し、ここで、3つの主なタイプが特定され、グルカゴン結合核酸分子：A型のグルカゴン結合核酸分子（図 1～図 3）、B型のグルカゴン結合核酸分子（図 4～図 6）およびC型のグルカゴン結合核酸分子（図 7 および図 8）として定義した。

【0230】

2' -デオキシヌクレオチド配列モチーフの定義に関して、不明瞭なヌクレオチドに関する IUPAC 略記が使用される：

S 強	G または C、
W 弱	A または T、
R プリン	G または A、
Y ピリミジン	C または T、
K ケト	G または T、
M イミノ	A または C、
B Aではない	C または T または G、
D Cではない	A または G または T、
H Gではない	A または C または T、
V Tではない	A または C または G、
N 全て	A または G または C または T

【0231】

断らない限り、それぞれ、任意の核酸配列またはストレッチの配列は、5' → 3' 方向で示される。

【0232】

1. 1 A型のグルカゴン結合核酸分子

図 1～図 3 で表されるように、A型のグルカゴン結合核酸分子は、潜在的なグルカゴン結合モチーフを規定する 1つの中央のヌクレオチドストレッチを含む。

【0233】

一般に、A型のグルカゴン核酸分子は、5' 末端および 3' 末端に、末端のヌクレオチドストレッチ（第 1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第 2の末端のヌクレオチドストレッチ）を含む。第 1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第 2の末端のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドストレッチは、互いにハイブリダイズすることができ、ここで、ハイブリダイゼーション時に、二重鎖構造が形成される。しかしながら、かかるハイブリダイゼーションは、分子中で必ずしも付与されるとは限らない。

【0234】

A型のグルカゴン結合核酸分子の3つのヌクレオチドストレッチである第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、下記の通りに5'→3'方向で配置される：第1の末端のヌクレオチドストレッチ中央のヌクレオチドストレッチ第2の末端のヌクレオチドストレッチ。しかしながら、あるいは、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、下記の通りに互いに5'→3'方向で配列される：第2の末端のヌクレオチドストレッチ中央のヌクレオチドストレッチ第1の末端のヌクレオチドストレッチ。

10

【0235】

規定されるストレッチの配列は、グルカゴンへの結合親和性に影響を及ぼすA型のグルカゴン結合核酸分子間で異なり得る。A型の種々のグルカゴン結合核酸分子の結合分析に基づいて、以下で記載されるような中央のヌクレオチドストレッチおよびそれらのヌクレオチド配列は、個々に、より好ましくはそれら全体で、ヒトグルカゴンへの結合に必須である。

【0236】

本発明によるA型のグルカゴン結合核酸分子を図1～図3に示す。それらは全て、グルカゴンを結合するそれらの能力に関して、アプタマーおよび／またはシュピーゲルマーとして試験した。グルカゴンに対するその結合親和性に関して特徴付けられるA型の第1のグルカゴン結合核酸分子は、2'-デオキシリボヌクレオチドで構成される核酸分子257-E1-001であった。核酸分子257-E1-001の平衡結合定数 K_D は、直接的プルダウン結合アッセイによりアプタマーとして、およびシュピーゲルマーとして決定された($K_{D_アプタマー} = 137 \text{ nM}$ 、 $K_{D_シュピーゲルマー} = 179 \text{ nM}$ 、図1)。

20

【0237】

グルカゴン結合核酸分子257-A1-001、257-D4-001、257-F4-001、257-B3-001、257-D3-001、257-E4-001、257-C4-001、257-C1-001および257-H2-001（それらは全て、2'-デオキシリボヌクレオチドで構成される）を、グルカゴン結合核酸257-E1-001に対して比較的競合プルダウンアッセイでアプタマーとして試験した。グルカゴン結合核酸分子257-E4-001は、257-E1-001と類似の結合親和性を示した。グルカゴン結合核酸分子257-A1-001、257-F4-001、257-C1-001および257-H2-001は、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001と比較して、より弱い結合親和性を示した。グルカゴン結合核酸分子257-D4-001、257-B3-001、257-D3-001および257-C4-001は、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001と比較して、はるかに弱い結合親和性を示した（図1）。

30

40

【0238】

グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の誘導体257-E1-002、257-E1-003、257-E1-004および257-E1-005は、各々が6個、5個または4個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、ここで、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001は、それぞれ、各々が7個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを含む。グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の誘導体257-E1-002、257-E1-003、257-E1-004および257-E1-005は、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001と比較して、比較的競合プルダウンアッセイで、低減された結合親和性を示した（図2）。したがって、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の第

50

1 および第2の末端のヌクレオチドストレッチの切断は、グルカゴンに対して低減された結合親和性をもたらした。

【0239】

グルカゴン結合核酸分子257-A1-001、257-D4-001、257-F4-001、257-B3-001、257-D3-001、257-E4-001、257-C4-001、257-C1-001、257-H2-001、257-E1-001ならびにその誘導体257-E1-002、257-E1-003、257-E1-004および257-E1-005は、中央のヌクレオチドストレッチに関して、配列5' BGA A A T G G G A G G G C T A K G Y G G A A G G A A T C T R R R 3' [配列番号192]を共有し、ここで、G、A、T、C、B、Y、KおよびRは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、式中、

a) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' T G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号193]を含み、式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

b) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' T G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A A 3' [配列番号194]を含み、式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

c) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' C G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号195]を含み、式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

d) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号196]を含み、式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0240】

グルカゴン結合核酸分子257-E4-001および257-E1-001は、グルカゴンに対して最良の結合親和性を示し、中央のストレッチにaに関して以下の配列を含む：

a) 257-E4-001：5' C G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号195]

b) 257-E1-001およびその誘導体：5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号196]

(ここで、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドである)。

【0241】

本発明者等は驚くべきことに、比較的競合シュピーゲルマーブルダウンアッセイ方式において、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の結合親和性は、中央のヌクレオチドストレッチの配列内で2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることにより改善されることを示した。2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、図29および図30A～図30Bに示されており、ここで実施例1. 1および相当する図面において、以下の略記を使用した：Gは、2'-デオキシグアノシン(5'-リン酸)であり、Cは、2'-デオキシシチジン(5'-リン酸)であり、Aは、2'-デオキシアデノシン(5'-リン酸)であり、Tは、2'-デオキシチミジン(5'-リン酸)であり、rGは、グアノシン(5'-リン酸)であり、rTは、チミジン(5'-リン酸)であり、rAは、アデノシン(5'-リン酸)である。特に、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001において最大7個の2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることで、最大40倍を上回って、グルカゴンの改善された結合親和性をもたらした。より詳細には、本発明者等は驚くべきことに、

a) グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の中央のヌクレオチドストレッチにおいて2位、8位、11位、12位、22位または23位で、1個の2'-デオキシリボヌクレオチドを1個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子257-E1-001の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと(図2Bおよび図9を参照、シュピーゲルマー257-E1-

10

20

30

40

50

R 0 9 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 1 5 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 1 8 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 1 9 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 2 9 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 3 0 - 0 0 1)、

b) グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の中央のヌクレオチドストレッチにおいて 8 位および 2 2 位または 2 2 位および 2 3 位で、2 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドを 2 個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと (図 2 B を参照、シュピーゲルマー 2 5 7 - E 1 - R 1 5 / 2 9 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 2 9 / 3 0 - 0 0 1)、

c) グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の中央のヌクレオチドストレッチにおいて 8 位、2 2 位および 2 3 位または 1 1 位、2 2 位および 2 3 位で、3 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドを 3 個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと (図 2 B を参照、シュピーゲルマー 2 5 7 - E 1 - R 1 5 / 2 9 / 3 0 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - R 1 8 / 2 9 / 3 0 - 0 0 1)、

d) グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の中央のヌクレオチドストレッチにおいて 8 位、1 1 位、2 2 位および 2 3 位で、4 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドを 4 個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと (図 2 B を参照、シュピーゲルマー 2 5 7 - E 1 - R 1 5 / 1 8 / 2 9 / 3 0 - 0 0 1)、

e) グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の中央のヌクレオチドストレッチにおいて 2 位、8 位、1 1 位、1 2 位、2 2 位および 2 3 位で、6 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドを 6 個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと (図 2 B および図 9 を参照、シュピーゲルマー 2 5 7 - E 1 - 6 x R - 0 0 1) および

f) グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の中央のヌクレオチドストレッチにおいて 2 位、8 位、1 1 位、1 2 位、1 9 位、2 2 位および 2 3 位で、7 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドを 7 個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の結合親和性と比較して、ビオチン化グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと (図 3 C を参照、シュピーゲルマー 2 5 7 - E 1 - 7 x R - 0 2 3 および 2 5 7 - E 1 - 7 x R - 0 3 7)

を見出した。

【0242】

A 型のグルカゴン結合核酸分子の中央のヌクレオチドストレッチのいくつかの位置で、2' - デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴンに対して改善された結合がもたらされることを示すデータに基づいて、試験した A 型のグルカゴン結合核酸分子全ての中央のストレッチを下記一般式で要約することができる:

5' B n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A K G X₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T R R R 3' [配列番号 173] (式中、n₁ は G または r G であり、n₂ は G または r G であり、n₃ は G または r G であり、n₄ は G または r G であり、n₅ は Y または r T であり、n₆ は A または r A であり、n₇ は A または r A であり、G、A、T、C、B、K、Y および R は 2' - デオキシリボヌクレオチドであり、r G、r A および r T はリボヌクレオチドである)。

【0243】

グルカゴン結合核酸分子 2 5 7 - A 1 - 0 0 1、2 5 7 - F 4 - 0 0 1、2 5 7 - E 4 - 0 0 1、2 5 7 - C 1 - 0 0 1、2 5 7 - H 2 - 0 0 1、2 5 7 - E 1 - 0 0 1 および中央のヌクレオチドストレッチのいくつかの位置で 2' - デオキシリボヌクレオチドに代わってリボヌクレオチドを含む 2 5 7 - E 1 - 0 0 1 の誘導体は、A 型の他のグルカゴン

結合核酸分子よりも、グルカゴンに対してより良好な結合親和性を示し、中央のストレッチに関して以下の配列：5' Bn₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A R 3' [配列番号174]を共有し、式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、T、C、BおよびRは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドであり、式中、

a) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号175]を含み、式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドであり、

b) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A A 3' [配列番号176]を含み、式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドであり、

c) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' C n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号177]を含み、式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドであり、

d) 好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' G n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号178]を含み、式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドであり、

より好ましい実施形態では、中央のヌクレオチドストレッチは、配列5' G n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号178] (式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドである)、または

配列5' C n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号177] (式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドである)を含む。

【0244】

グルカゴン結合核酸分子257-E1-R09-001、257-E1-R15-001、257-E1-R18-001、257-E1-R19-001、257-E1-R29-001、257-E1-R30-001、257-E1-R15/29-001、257-E1-R29/30-001、257-E1-R15/29/30、257-E1-R18/29/30-001、257-E1-R15/18/29/30-001、257-E1-7xR-023、257-E1-6xR-001およびそれらの切断誘導

10

20

30

40

50

体 (257-E1-6xR-003・・・257-E1-6xR-020および257-E1-6xR-029、257-E1-6xR-033、257-E1-7xR-037、図3A、図3Bおよび図3Cを参照)は、グルカゴンに対して最良の結合親和性を示し、中央のヌクレオチドストレッチに関して以下の配列を含む。

a) 257-E1-R09-001: 5' GrGAAATGGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG3' [配列番号179] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGはリボヌクレオチドである)、

b) 257-E1-R15-001: 5' GGAAATGrGGGAGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG3' [配列番号180] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGはリボヌクレオチドである)、

c) 257-E1-R18-001: 5' GGAAATGGGA rGGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG3' [配列番号181] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGはリボヌクレオチドである)、

d) 257-E1-R19-001: 5' GGAAATGGGA rGGCTAGGTGGAAAGGAATCTGAG3' [配列番号182] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGはリボヌクレオチドである)、

e) 257-E1-R29-001: 5' GGAAATGGGAGGGCTAGGTGG rAAGGAATCTGAG3' [配列番号183] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rAはリボヌクレオチドである)、

f) 257-E1-R30-001: 5' GGAAATGGGAGGGCTAGGTGG rAAGGAATCTGAG3' [配列番号184] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rAはリボヌクレオチドである)、

g) 257-E1-R15/29-001: 5' GGAAATGrGGGAGGGCTAGGTGG rAAGGAATCTGAG3' [配列番号185] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGおよびrAはリボヌクレオチドである)、

h) 257-E1-R29/30-001: 5' GGAAATGGGAGGGCTAGGTGG rA rAAGGAATCTGAG3' [配列番号186] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rAはリボヌクレオチドである)、

i) 257-E1-R15/29/30-001: 5' G_GAAATGrGGGAGGGCTAGGTGG rA rAAGGAATCTGAG3' [配列番号187] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGおよびrAはリボヌクレオチドである)、

j) 257-E1-R18/29/30-001: 5' GGAAATGGGA rGGGCTAGGTGG rA rAAGGAATCTGAG3' [配列番号188] (式中、X₁はGであり、X₂はGであり、X₃はrGであり、X₄はGであり、X₅はTであり、X₆はrAであり、X₇はrAであり、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGおよびrAはリボヌクレオチドである)、

k) 257-E1-R15/18/29/30-001: 5' GGAAATGrGGArGGGCTAGGTGG rA rAAGGAATCTGAG3' [配列番号189] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGおよびrAはリボヌクレオチドである)、

l) 257-E1-6xR-001: 5' GrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGG rA rAAGGAATCTGAG3' [配列番号190] (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rGおよびrAはリボヌクレオチドである)、

m) 257-E1-7xR-023: 5' GrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGG rTGG rA rAAGGAATCTGAG3' (式中、G、A、TおよびCは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrTはリボヌクレオチドである)。

【0245】

10

20

30

40

50

上記で示されるように、グルカゴン結合核酸 257-E1-001 は、2'-デオキシリボヌクレオチドで構成され、257-E1-001 の第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチのヌクレオチド欠失は、低減された結合親和性をもたらした（図2Aを参照、257-E1-002、257-E1-003、257-E1-004、257-E1-004および257-E1-005）。

【0246】

驚くべきことに、2'-デオキシリボヌクレオチドに代わって6個のリボヌクレオチドを有する中央のヌクレオチドストレッチを含むグルカゴン結合核酸 257-E1-6xR-001 に関して、本発明者等は、第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチの、7個のヌクレオチド（257-E1-6xR-001、図3Aを参照）から6個のヌクレオチド（257-E1-6xR-008/-010/-011/-012/-013/-016/-018/、図3Aおよび図3Bを参照）および5個のヌクレオチド（257-E1-6xR-020、図3Cを参照）への切断は、結合親和性の低減をもたらさないことを示すことができた。5個未満のヌクレオチドを有する末端のストレッチを含むグルカゴン結合核酸 257-E1-6xR-001 の誘導体は、グルカゴンに対して、低減された結合親和性を示した：各々が4個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを有する 257-E1-6xR-029、各々が3個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを有する 257-E1-6xR-030および257-E1-6xR-031、各々が2個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを有する 257-E1-6xR-032、ならびに各々が1個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを有する 257-E1-6xR-033（図3Cを参照）。

【0247】

グルカゴンに対する結合親和性を維持しながら、グルカゴン結合核酸分子 257-E1-6xR-010 をさらに切断するために、中央のヌクレオチドストレッチの19位にある2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置換して、グルカゴン結合核酸 257-E1-7xR-023 をもたらした。グルカゴン結合核酸分子 257-E1-6xR-010 およびグルカゴン結合核酸分子 257-E1-7xR-023 の両方の分子が、グルカゴンに対して類似の結合親和性を示した（図3Aおよび図3C）。驚くべきことに、本発明者等は、同一の中央のヌクレオチドストレッチ、ならびに各々が3個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを含む分子（グルカゴン結合核酸分子 257-E1-7xR-037）が、グルカゴンに対して、それぞれ第1および第2の末端の6個のヌクレオチドのストレッチを有するグルカゴン結合核酸分子 257-E1-7xR-023 とほぼ同じ結合親和性を有することを示すことができた（図3Cを参照）。

【0248】

A型のグルカゴン結合核酸分子の第1および第2の末端のストレッチは、1個（257-E1-6xR-033を参照）、2個（257-E1-6xR-032を参照）、3個（例えば、257-E1-6xR-030または257-E1-7xR-037）、4個（257-E1-6xR-029を参照）、5個（例えば、257-E1-6xR-020）、6個（例えば、257-E1-6xR-010）または7個（例えば、257-E1-RxR-001または257-E1-E1-001）のヌクレオチドを含み（図1～図3）、ここで、ストレッチは任意選択で、互いにハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション時に二重鎖構造が形成される。この二重鎖構造は、1個～7個の塩基対で構成され得る。しかしながら、かかるハイブリダイゼーションは、分子中で必ずしも付与されるとは限らない。

【0249】

試験したA型のグルカゴン結合核酸分子全ての第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆V3'であり、第2の末端

第 1 の好ましい実施形態では、

10

第2の好ましい実施形態では、

20

第3の好ましい実施形態では、

30

第4の好ましい実施形態では、

40

第5の好ましい実施形態では、

50

在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

第6の好ましい実施形態では、

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はVであり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

g) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 はBであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

h) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0250】

グルカゴン結合核酸分子257-A1-001、257-D4-001、257-F4-001、257-B3-001、257-D3-001、257-E4-001、257-C4-001、257-C1-001、257-H2-001、257-E1-001、257-E1-R9-001、257-E1-R15-001、257-E1-R18-001、257-E1-R19-001、257-E1-R29-001、257-E1-R30-001、257-E1-R15/29-001、257-E1-R29/30-001、257-E1-R15/29/30-001、257-E1-R18/29/30-001、257-E1-R15/18/29/30-001および257-E1-6xR-001の第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V 3'$ であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ であり、式中、

d) Z_1 はGであり、 Z_2 はCであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はRであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はYであり、 Z_{11} はGであり、 Z_{12} はCであるか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 はCであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はRであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はYであり、 Z_{11} はGであり、 Z_{12} はCであるか、または

f) Z_1 はGであり、 Z_2 はCであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はRであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はYであり、 Z_{11} はGであり、 Z_{12} は存在せず、

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸分子は、第1の末端のストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

g) 257-A1-001： $5' G C A C T G G 3'$ （第1の末端のヌクレオチドストレッチ）および $5' G C A G T G C 3'$ （第2の末端のヌクレオチドストレッチ）、または

h) 257-F4-001： $5' G C A C T G A 3'$ （第1の末端のヌクレオチドストレッチ）および $5' G C A G T G C 3'$ （第2の末端のヌクレオチドストレッチ）、または

10

20

30

40

50

i) 257-E4-001: 5' GCAGTGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' TCACTGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

j) 257-E1-001: 5' GCAGTGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CTACTGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

k) 257-C1-001: 5' GCGCTGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' GCAGTGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

l) 257-H2-001: 5' GCGCCAG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' TCGGCGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)。

10

【0251】

グルカゴン結合核酸分子 257-E1-002、257-E1-003、257-E1-6xR-003、257-E1-6xR-005、257-E1-6xR-006、257-E1-6xR-007、257-E1-6xR-008、257-E1-6xR-009、257-E1-6xR-010、257-E1-6xR-011、257-E1-6xR-012、257-E1-6xR-013、257-E1-6xR-014、257-E1-6xR-015、257-E1-6xR-016、257-E1-6xR-017、257-E1-6xR-018 および 257-E1-7xR-023 の第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆G3' であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' CZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3 であり、式中、

20

d) Z₁ は存在せず、Z₂ は S であり、Z₃ は V であり、Z₄ は G であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は S であり、Z₇ は B であり、Z₈ は R であり、Z₉ は C であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は S であり、Z₁₂ は存在せず、または

e) Z₁ は存在せず、Z₂ は S であり、Z₃ は V であり、Z₄ は G であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は S であり、Z₇ は B であり、Z₈ は R であり、Z₉ は C であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、または

f) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は V であり、Z₄ は G であり、Z₅ は Y であり、Z₆ は S であり、Z₇ は B であり、Z₈ は R であり、Z₉ は C であり、Z₁₀ は B であり、Z₁₁ は S であり、Z₁₂ は存在せず、

30

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸分子は、第1の末端のストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

h) 257-E1-6xR-008: 5' GCGCGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CTGCGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

i) 257-E1-6xR-010: 5' GCGCGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CCGCGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

40

j) 257-E1-6xR-011: 5' GGGCCG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CGGCCC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

k) 257-E1-6xR-012: 5' GCGCCG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CGGCCG3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

l) 257-E1-6xR-013: 5' GAGCGG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' CCGCTC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

m) 257-E1-6xR-016: 5' GCGTGG3' (第1の末端のヌクレオチ

50

ドストレッチ) および 5' C C A C G C 3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

n) 2 5 7-E 1-6 x R-0 1 8: 5' G C G T C G 3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' C G A C G C 3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)。

【0252】

グルカゴン結合核酸分子 2 5 7-E 1-6 x R-0 0 4、2 5 7-E 1-6 x R-0 1 9 および 2 5 7-E 1-6 x R-0 2 0 の第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G 3' であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' であり、式中、

10

d) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、または

e) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ はVであり、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、または

f) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ はBであり、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

20

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸は、第1の末端のストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

c) 2 5 7-E 1-6 x R-0 1 9: 5' G G C G G 3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' C C G C C 3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

d) 2 5 7-E 1-6 x R-0 2 0: 5' C G C G G 3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' C C G C G 3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)。

【0253】

グルカゴン結合核酸分子 2 5 7-E 1-6 x R-0 2 9 および 2 5 7-E 1-0 0 5 の第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ G 3' であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' C Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3' であり、式中、

30

d) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、または

e) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ はGであり、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、または

f) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ はYであり、Z₆ はGであり、Z₇ はYであり、Z₈ はRであり、Z₉ はCであり、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、

40

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸分子は、第1の末端のストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

2 5 7-E 1-6 x R-0 2 9: 5' G C G G 3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5' C C G C 3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)。

【0254】

グルカゴン結合核酸分子 2 5 7-E 1-6 x R-0 3 0、2 5 7-E 1-6 x R-0 3 1 および 2 5 7-E 1-7 x R-0 3 7 の第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレ

50

ッチに関する一般式は、 $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G 3'$ であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ であり、式中、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はSであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はSであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸分子は、第1の末端のストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

$257-E1-6xR-030:5' GCG 3'$ （第1の末端のヌクレオチドストレッチ）および $5' CGC 3'$ （第2の末端のヌクレオチドストレッチ）。

【0255】

グルカゴン結合核酸分子 $257-E1-6xR-032$ および $257-E1-6xR-033$ の第1の末端のヌクレオチドストレッチならびに第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G 3'$ であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' CZ_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ であり、式中、

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はGであり、 Z_7 はCであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない（ $257-E1-6xR-032$ を参照）か、または

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない（ $257-E1-6xR-033$ を参照）。

【0256】

グルカゴン結合核酸分子の官能性を証明するために、 $257-E1-6xR-001$ 、 $257-E1-6xR-030$ および $257-E1-7xR-037$ をシュピーゲルマーとして合成した。ペグ化のために、シュピーゲルマー $257-E1-6xR-030$ および $257-E1-7xR-037$ を、その5'末端にアミノ基を伴って合成した。アミノ修飾されたシュピーゲルマー $257-E1-6xR-030-5'$ アミノ〔配列番号158〕および $257-E1-7xR-037-5'$ アミノ〔配列番号159〕に、40kDaのペグ部分をカップリングさせて、グルカゴン結合シュピーゲルマー $257-E1-6xR-030-5'-PEG(NOX-G15)$ とも称される〔配列番号91〕および $257-E1-7xR-037-5'-PEG(NOX-G16)$ とも称される〔配列番号92〕をもたらした。シュピーゲルマーの合成およびペグ化は、実施例2に記載する。

【0257】

グルカゴン結合シュピーゲルマー $257-E1-6xR-001$ 、 $257-E1-7xR-037$ 、 $NOX-G15$ および $NOX-G16$ は、 $2\sim 3\text{ nM}$ の IC_{50} で、グルカゴンのその受容体に対する機能をインビトロで阻害／拮抗することが可能であった（図17： $NOX-G15$ および $NOX-G16$ 、図20A： $257-E1-6xR-001$ 、 $257-E1-7xR-0037$ 、 $NOX-G15$ および $NOX-G16$ 、インビトロアッセイのプロトコールに関しては、実施例5を参照）。

【0258】

実施例8に示されるように、グルカゴン結合シュピーゲルマー $NOX-G15$ は、1型

DMおよび2型DMの動物実験におけるグルコース負荷試験で有効であった（図23および図24）。

【0259】

さらに、実施例6に示されるように、グルカゴン結合シュピーゲルマー257-E1-6xR-001、257-E1-7xR-0037、NOX-G15およびNOX-G16の結合選択性を決定した（図19および図20）。

【0260】

1. 2 B型のグルカゴン結合核酸分子

図4～図6で表されるように、B型のグルカゴン結合核酸分子は、潜在的なグルカゴン結合モチーフを規定する1つの中央のヌクレオチドストレッチを含む。

10

【0261】

一般に、B型のグルカゴン結合核酸分子は、5'末端および3'末端に、末端のヌクレオチドストレッチ：第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含む。第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、互いにハイブリダイズすることができ、ここで、ハイブリダイゼーション時に、二重鎖構造が形成される。しかしながら、かかるハイブリダイゼーションは、分子中で必ずしも付与されるとは限らない。

【0262】

B型のグルカゴン結合核酸分子の3つのヌクレオチドストレッチである第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、下記の通りに5'→3'方向で配置される：第1の末端のヌクレオチドストレッチ中央のヌクレオチドストレッチ第2の末端のヌクレオチドストレッチ。しかしながら、あるいは、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチは、下記の通りに互いに5'→3'方向で配列される：第2の末端のヌクレオチドストレッチ中央のヌクレオチドストレッチ第1の末端のヌクレオチドストレッチ。

20

【0263】

規定されるストレッチの配列は、グルカゴンへの結合親和性に影響を及ぼすB型のグルカゴン結合核酸分子間で異なり得る。B型の種々のグルカゴン結合核酸分子の結合分析に基づいて、以下で記載されるような中央のヌクレオチドストレッチおよびそれらのヌクレオチド配列は、個々に、より好ましくはそれらの全体で、ヒトグルカゴンへの結合に必須である。

30

【0264】

本発明によるB型のグルカゴン結合核酸分子を図4～図6に示す。それらは全て、グルカゴンを結合するそれらの能力に関して、アプタマーおよび／またはシュピーゲルマーとして試験した。グルカゴンに対するその結合親和性に関して特徴付けられるB型の第1のグルカゴン結合核酸分子は、デオキシリボヌクレオチドで構成される核酸分子259-H6-001であった。核酸分子259-H6-001の平衡結合定数 K_D は、直接的ブルダウン結合アッセイによりアプタマーとして決定された（ $K_{D_アプタマー} = 33 \text{ nM}$ 、図4）。

40

【0265】

グルカゴン結合核酸分子259-D5-001、259-B7-001、259-B8-001、259-A5-001、259-C8-001、259-E5-001、259-E7-001および259-F5-001（同様に、2'-デオキシリボヌクレオチドで構成される）を、グルカゴン結合核酸259-H6-001に対して比較的競合ブルダウンアッセイでアプタマーとして試験した。グルカゴン結合核酸分子259-C8-001は、259-H6-001と類似の結合親和性を示し、ここで、両分子が、5'-AGGAAGGTGTAAGGTTCGGTTGGATTCA-3' [配列番号212]の配列を有する中央の32個のヌクレオチドのストレッチを含む。グルカゴン結合核酸分子259-D5-001および259-B7-001は、中央のヌクレオチドスト

50

レッチの配列においてわずかな変化を有し、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001と比較して、より弱い結合親和性を示した。同様に、グルカゴン結合核酸分子259-B8-001、259-A5-001および259-E5-001は、中央のヌクレオチドストレッチの配列においてわずかな変化を有し、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001と比較してはるかに弱い結合親和性を示した。グルカゴン結合核酸259-F5-001および259-E7-001は、各々がグルカゴン結合核酸分子259-H6-001の中央のストレッチに関する中央の29個のヌクレオチドのストレッチを含み、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001と比較して、より弱くはるかに弱い結合親和性を示した(図4)。259-F5-001(5'-AGAAAGGTTGGTAAGTTTCGGTTGGATCTG-'3)[配列番号198]および259-E7-001(5'-AGAAAGGTCGGTAAGTTTTCGGTAGGATCTG-'3)[配列番号199]の中央のストレッチは、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001(第1のサブストレッチ:5'-AAGGTTGGTA-'3[配列番号213]、第2のサブストレッチ:5'-AGGTTTCGGTTGGAT-'3[配列番号214])、259-F5-001(第1のサブストレッチ:5'-AAGGTTGGTA-'3[配列番号213]、第2のサブストレッチ:5'-AGTTTTCGGTTGGAT-'3[配列番号215])、259-E7-001(第1のサブストレッチ:5'-AAGGTCGGTA-'3[配列番号216]、第2のサブストレッチ:5'-AGTTTTCGGTAGGAT-'3[配列番号217])の中央のストレッチ中のサブストレッチに関する2つのサブストレッチを含む。

10

20

【0266】

グルカゴン結合核酸259-H6-001の誘導体259-H6-002、259-H6-005、259-H6-003および259-H6-004は、2'-デオキシリボヌクレオチドで構成され、7個、6個、5個または3個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、ここで、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001は、各々が9個のヌクレオチドを有する第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチを含む。グルカゴン結合核酸分子259-H6-001の誘導体259-H6-002および259-H6-005は、比較的競合プルダウンアッセイにおいて、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001と類似の結合親和性を示した。グルカゴン結合核酸分子259-H6-001の誘導体259-H6-003および259-H6-004は、比較的競合プルダウンアッセイにおいて、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001と比較して、低減された結合親和性を示した(図5)。したがって、グルカゴン結合核酸分子259-H6-001の第1および第2の末端のヌクレオチドストレッチの3個を上回るヌクレオチドの欠失は、グルカゴンに対して低減された結合親和性をもたらした。

30

【0267】

グルカゴン結合核酸分子259-E7-001および259-F5-001に関して示されるように、中央の29個のヌクレオチドのストレッチを有するグルカゴン結合核酸分子は、グルカゴンに結合することができる。グルカゴン結合核酸分子259-H6-006、259-H6-007および259-H6-008は、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002(これは、中央の32個のヌクレオチドのストレッチを有する)の誘導体であり、全てが、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の同じ第1および第2の末端のストレッチ、ならびにグルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のストレッチとほぼ同一である中央のヌクレオチドストレッチを含む。グルカゴン結合核酸分子259-H6-002に関して上述するように、中央のストレッチ内の1個または2個のヌクレオチドの欠失に起因して、中央のストレッチは、31個または30個のヌクレオチドで構成される:259-H6-006:中央のヌクレオチドストレッチ:5'-AGGAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA-'3[配列番号218]、259-H6-007:中央のヌクレオチドストレッチ:5'-AGGAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA-'3[配列番号219]、259-H

40

50

6-008：中央のヌクレオチドストレッチ：5'-AGGAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA-3〔配列番号220〕。グルカゴン結合核酸分子259-H6-002に対する比較的競合プルダウンアッセイでは、259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチの1個（259-H6-006および259-H6-007を参照）または2個（259-H6-008を参照）のヌクレオチドの欠失が、結合親和性の低減をもたらすことが示された（図5）。

【0268】

しかしながら、グルカゴン結合核酸分子259-D5-001、259-H6-001、259-B7-001、259-B8-001、259-A5-001、259-C8-001、259-E5-001、259-E7-001、259-F5-001、259-H6-002、259-H6-005、259-H6-003、259-H6-004、259-H6-006、259-H6-007および259-H6-008の中央のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、これらのグルカゴン結合核酸分子は、

5'-AKGARAKGTTGSYAWAGRTTCGGTTGGATTCA-3（259-D5-001、259-H6-001、259-B7-001、259-B8-001、259-A5-001、259-C8-001、259-E5-001）〔配列番号221〕、

5'-AGAAAGGTTGGTAAGTTTCGGTTGGATCTG-3（259-F5-001）〔配列番号198〕、

5'-AGAAAGGTCGGTAAGTTTCGGTAGGATCTG-3（259-E7-001）〔配列番号199〕、

5'-AGGAAGGTTGGTAAGAGGTTTCGGTTGGATTCA-3（259-H6-006）〔配列番号218〕、

5'-AGGAAGAGGTTGGTAAGAGGTTTCGGTTGGATTCA-3（259-H6-007）〔配列番号219〕、

5'-AGGAAGGTTGGTAAGAGGTTTCGGTTGGATTCA-3（259-H6-008）〔配列番号220〕

からなる群から選択される29個、30個、31個または32個のヌクレオチドで構成される中央のヌクレオチドストレッチを含む。

【0269】

グルカゴン結合核酸分子259-H6-001および259-C8-001は、グルカゴンに対して最良の結合親和性を示し、中央のストレッチに関して以下の配列：5'-AGGAAGGTTGGTAAGAGGTTTCGGTTGGATTCA-3〔配列番号212〕を含む。

【0270】

本発明者等は驚くべきことに、比較的競合プルダウンアッセイで、または表面プラズモン共鳴分析により、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の結合親和性は、中央のヌクレオチドストレッチの配列内で2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることにより改善されることを示した。2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドは、図29および図30A～図30Bに示されており、ここで実施例1、2および相当する図面において、以下の略記を使用した：Gは、2'-デオキシグアノシン（5'-リン酸）であり、Cは、2'-デオキシシチジン（5'-リン酸）であり、Aは、2'-デオキシアデノシン（5'-リン酸）であり、Tは、2'-デオキシチミジン（5'-リン酸）であり、rGは、グアノシン（5'-リン酸）であり、rUは、ウリジン（5'-リン酸）であり、rAは、アデノシン（5'-リン酸）である。特に、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにおいて最大5個の2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることで、最大22倍を上回って、グルカゴンの改善された結合親和性をもたらした。より詳細には、本発明者等は驚くべきことに、

a) グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにお

いて6位、17位または29位で、1個の2'-デオキシリボヌクレオチドを1個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の結合親和性と比較して、グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと（図6A、図6Bおよび図6Cを参照、259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-005-R12、259-H6-009-R12、259-H6-010-R12、259-H6-011-R12、259-H6-012-R12、259-H6-013-R12、259-H6-014-R12、259-H6-015-R12、259-H6-016-R12）、

b) グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにおいて6位および17位または6位および29位または17位および29位で、2個の2'-デオキシリボヌクレオチドを2個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の結合親和性と比較して、グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと（図6Aを参照、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R24/36）、

c) グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにおいて6位、17位および29で、3個の2'-デオキシリボヌクレオチドを3個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の結合親和性と比較して、グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと（図6Aおよび図6Cを参照、259-H6-002-R13/24/36および259-H6-014-R12/23/35）、および

d) グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにおいて6位、17位、23位、29位および32位で、5個の2'-デオキシリボヌクレオチドを5個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴン結合核酸分子259-H6-002の結合親和性と比較して、グルカゴンに対して改善された結合親和性をもたらすこと（図6Cを参照、259-H6-014-R12/23/29/35/38）を見出した。

【0271】

B型のグルカゴン結合核酸分子の中央のヌクレオチドストレッチのいくつかの位置で、2'-デオキシリボヌクレオチドをリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴンに対して改善された結合がもたらされることを示すデータに基づいて、グルカゴン結合核酸分子259-D5-001、259-H6-001、259-B7-001、259-B8-001、259-A5-001、259-C8-001、259-E5-001の中央のストレッチを下記一般式で要約することができる：

5'-AKGAR_{n₁}KGTTGSYAWAn₂RTTCGn₃TTGGAn₄TCn₅-'3 [配列番号197] (式中、n₁はAまたはrAであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はTまたはrUであり、n₅はAまたはrAであり、G、A、T、C、K、Y、S、WおよびRは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、rG、rAおよびrUはリボヌクレオチドである)。

【0272】

グルカゴン結合核酸分子259-H6-001、259-C8-001、259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-005-R12、259-H6-009-R12、259-H6-010-R12、259-H6-011-R12、259-H6-012-R12、259-H6-013-R12、259-H6-014-R12、259-H6-015-R12、259-H6-016-R12、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R24/36、259-H6-002-R13/24/36、259-H6-014-R12/23/35および259-H6-014-R12/23/35/38は、B型の他のグルカゴン結合核酸分子よりもグルカゴンに対して、より良好な結合親和性を示し、中央のストレッチに関して以下の配列：5'-AGGAAn₁GGTTGGTAAAn₂GTTTCGn₃TTGGAn₄TCn₅3' [

配列番号 203] を共有し、式中、 n_1 は、A または r A であり、 n_2 は、G または r G であり、 n_3 は、G または r G であり、 n_4 は、T または r U であり、 n_5 は、A または r A であり、G、A、T および C は、2'-デオキシヌクレオチドであり、r G、r A および r U は、リボヌクレオチドである。

【0273】

グルカゴン結合核酸分子 259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R13/24/36、259-H6-014-R12/23/35、259-H6-014-R12/23/29/35/38 は、グルカゴンに対して最良の結合親和性を示し、中央のヌクレオチドストレッチに関して以下の配列を含む：

a) 259-H6-002-R13 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAAGGTTCTGGTTGGATTCA3' [配列番号 204] (式中、G、A、T および C は、2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r A はリボヌクレオチドである)、

b) 259-H6-002-R24 : 5' AGGA A AGGTTGGTAAArGGTTCTGGTTGGATTCA3' [配列番号 205] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r G はリボヌクレオチドである)、

c) 259-H6-002-R36 : 5' AGGA A AGGTTGGTAAAGGTTCTGGTTGGArUTC A3' [配列番号 206] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r U はリボヌクレオチドである)、

d) 259-H6-002-R13/24 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAArGGTTCTGGTTGGATTCA3' [配列番号 207] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r G および r A はリボヌクレオチドである)、

e) 259-H6-002-R13/36 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAAGGTTCTGGTTGGArUTC G3' [配列番号 208] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r A および r U はリボヌクレオチドである)、

f) 259-H6-002-R24/36 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAAGGTTCTGGTTGGArUTC A3' [配列番号 209] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r G および r U はリボヌクレオチドである)、

g) 259-H6-002-R13/24/36 および 259-H6-014-R12/23/35 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAArGGTTCTGGTTGGArUTC A3' [配列番号 210] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r G、r A および r U はリボヌクレオチドである)、

h) 259-H6-014-R12/23/29/35/38 : 5' AGGA A r AGGTTGGTAAArGGTTCTGrGTTGGArUTC r A3' [配列番号 211] (式中、G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、r G、r A および r U はリボヌクレオチドである)。

【0274】

B型のグルカゴン結合核酸分子の第1および第2の末端のストレッチは、3個(259-H6-004を参照)、5個(259-H6-003を参照)、6個(例えば、259-H6-005、259-H6-005-R12、259-H6-009-R12、259-H6-010-R12、259-H6-011-R12、259-H6-012-R12)、7個(例えば、259-H6-002およびその誘導体(例えば、259-H6-002-R13、259-H6-002-R13/24/36))または9個(例えば、259-H6-001)のヌクレオチドを含み(図4~図6)、ここで、ストレッチは任意選択で、互いにハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション時に、二重鎖構造が形成される。この二重鎖構造は、1個~9個の塩基対で構成され得る。しかしながら、かかる

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションは、分子中で必ずしも付与されるとは限らない。

【0275】

試験したB型のグルカゴン結合核酸分子全ての第1の末端のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第1の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 SAK3'$ であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、 $5' CKVZ_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}3'$ であり、式中、 Z_1 はCであるかまたは存在せず、 Z_2 はGであるかまたは存在せず、 Z_3 はRであるかまたは存在せず、 Z_4 はBであるかまたは存在せず、 Z_5 はBであるかまたは存在せず、 Z_6 はSであるかまたは存在せず、 Z_7 はSであるかまたは存在せず、 Z_8 はVであるかまたは存在せず、 Z_9 はNであるかまたは存在せず、 Z_{10} はKであるかまたは存在せず、 Z_{11} はMであるかまたは存在せず、 Z_{12} はSであるかまたは存在せず、式中、

第1の好ましい実施形態では、

d) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} はSであるか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はNであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} はSであるか、または

f) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在せず、

第2の好ましい実施形態では、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在せず、

第3の好ましい実施形態では、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

第4の好ましい実施形態では、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBで

あり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

第 5 の好ましい実施形態では、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、 Z_{13} は存在せず、

10

第 6 の好ましい実施形態では、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

f) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は S であり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、 Z_{13} は存在せず、

20

第 7 の好ましい実施形態では、

Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0276】

グルカゴン結合核酸分子 259-F5-001 および 59-E7 の第 1 の末端のヌクレオチドストレッチは、5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A T 3' のヌクレオチド配列を含み、グルカゴン結合核酸分子 259-F5-001 の第 2 の末端のヌクレオチドストレッチは、5' C G A $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、式中、 Z_1 は C であり、 Z_2 は G であり、 Z_3 は A であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は C であり、 Z_8 は G であり、 Z_9 は A であり、 Z_{10} は G であり、 Z_{11} は A であり、 Z_{12} は C である。さらに、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチの 3' 末端に、さらなる「G」が存在する。

30

【0277】

グルカゴン結合核酸分子 259-D5-001、259-H6-001、259-B7-001、259-B8-001、259-A5-001、259-C8-001 および 259-E5-001 の第 1 の末端のヌクレオチドストレッチおよび第 2 の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A G 3' であり、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5' C T C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' であり、式中、

40

d) Z_1 は C であり、 Z_2 は G であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は C であり、 Z_{12} は G であり、または

e) Z_1 は存在せず、 Z_2 は G であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は C であり、 Z_{12} は G であり、または

f) Z_1 は C であり、 Z_2 は G であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T で

50

あり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は C であり、 Z_{12} は存在せず、

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸は、第 1 の末端のストレッチおよび第 2 の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

259-H6-001:5'CGACTCGAG3' (第 1 の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTCGAGTCG3' (第 2 の末端のヌクレオチドストレッチ)、
259-C8-0015'CGGCTCGAG3' (第 1 の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTCGAGTCG3' (第 2 の末端のヌクレオチドストレッチ)。

【0278】

グルカゴン結合核酸分子 259-H6-002、259-H6-006、259-H6-007、259-H6-008、259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R24/36 および 259-H6-002-R13/24/36 は、5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆GAG3' の配列を有する第 1 の末端のヌクレオチドストレッチ、および 5'CTCZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3' の配列を有する第 2 の末端のヌクレオチドストレッチを含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は A であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は A であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない。

【0279】

グルカゴン結合核酸 259-H6-005、259-H6-005-R12、259-H6-009-R12、259-H6-010-R12、259-H6-011-R12、259-H6-012-R12、259-H6-013-R12、259-H6-014-R12、259-H6-015-R12、259-H6-016-R12、259-H6-014-R12/23/35 および 259-H6-014-R12/23/29/35/38 の第 1 の末端のヌクレオチドストレッチおよび第 2 の末端のヌクレオチドストレッチを組み合わせると、第 1 の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAG3' であり、第 2 の末端のヌクレオチドストレッチに関する一般式は、5'CTSZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3' であり、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

ここで、グルカゴンに対して最良の結合親和性を有するグルカゴン結合核酸は、第 1 の末端のストレッチおよび第 2 の末端のヌクレオチドストレッチの下記組合せを含む：

c) 259-H6-005-R12:5'GTCGAG3' (第 1 の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTCGAC3' (第 2 の末端のヌクレオチドストレッチ)、または

d) 259-H6-010-R12:5'TGCGAG3' (第 1 の末端のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドストレッチ) および 5'CTCGCA3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、
または

e) 259-H6-012-R12: 5'GGCCAG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTGGCC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、
または

f) 259-H6-014-R12: 5'GCCGAG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTCGGC3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)、
または

g) 259-H6-015-R12: 5'CTCGAG3' (第1の末端のヌクレオチドストレッチ) および 5'CTCGAG3' (第2の末端のヌクレオチドストレッチ)。

10

【0280】

グルカゴン結合核酸分子 259-H6-003 の第1の末端のヌクレオチドストレッチは、5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆GAG3' のヌクレオチド配列を含み、グルカゴン結合核酸分子 259-H6-003 の第2の末端のヌクレオチドストレッチは、5'CTCZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3' のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ はTであり、Z₆ はCであり、Z₇ はGであり、Z₈ はAであり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

b) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ はTであり、Z₆ はCであり、Z₇ はGであり、Z₈ は存在せず、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しないか、または

20

c) Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は存在せず、Z₆ はCであり、Z₇ はGであり、Z₈ はAであり、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在せず、好ましくは、第1の末端のヌクレオチドストレッチが 5'-TCGAG-3' であり、第2の末端のヌクレオチドストレッチが 5'-CTCGA-3' である。

【0281】

グルカゴン結合核酸分子 259-H6-004 の第1の末端のヌクレオチドストレッチは、5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆GAG3' のヌクレオチド配列を含み、グルカゴン結合核酸分子 259-H6-004 の第2の末端のヌクレオチドストレッチは、5'CTCZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3' のヌクレオチド配列を含み、式中、Z₁ は存在せず、Z₂ は存在せず、Z₃ は存在せず、Z₄ は存在せず、Z₅ は存在せず、Z₆ は存在せず、Z₇ は存在せず、Z₈ は存在せず、Z₉ は存在せず、Z₁₀ は存在せず、Z₁₁ は存在せず、Z₁₂ は存在しない。

30

【0282】

表面プラズモン共鳴測定により結合親和性を決定するために、および／またはB型のグルカゴン結合核酸分子の官能性を証明するために、分子 259-H6-002、259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R13/24/36、259-H6-002-R24/36、259-H6-014-R12、259-H6-014-R12/23/35 および 259-H6-014-R12/23/29/35/38 をシュピーゲルマーとして合成し、ここで、シュピーゲルマー 259-H6-002、259-H6-002-R13 および 259-H6-014-R12/23/35 を、5'末端にアミノ基を伴って合成した。アミノ修飾されたシュピーゲルマー 259-259-H6-002-5'-アミノ [配列番号155]、H6-002-R13-5'-アミノ [配列番号156] および 259-H6-014-R12/23/35-5'-アミノ [配列番号157] に、40 kDa のペグ部分をカップリングさせて、グルカゴン結合シュピーゲルマー 259-H6-002-5'-PEG (NOX-G12 と称される) [配列番号88]、259-H6-002-R13-5'-PEG (NOX-G13 と称される) [配列番号89]、および 259-H6-0

40

50

14-R12/23/35-5'-PEG (NOX-G14とも称される) [配列番号90] をもたらした。シュピーゲルマーの合成およびペグ化は、実施例2に記載される。

【0283】

グルカゴン結合シュピーゲルマー259-H6-002、259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36、259-H6-002-R13/24、259-H6-002-R13/36、259-H6-002-R13/24/36、259-H6-002-R24/36、259-H6-014-R12、259-H6-014-R12/23/35、NOX-G13およびNOX-G14の平衡結合定数 K_D は、表面プラズモン共鳴測定により決定した(図6C、259-H6-014-R12/23/29/35/38、10、11、12、13、プロトコールは実施例4を参照)。

【0284】

グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G13およびNOX-G14は、4.7~6.0nMの IC_{50} で、グルカゴンのその受容体へ機能をインビトロで阻害/拮抗することが可能であった(図20A、インビトロ機能性アッセイのプロトコールに関しては、実施例5を参照)。

【0285】

図10に示されるような表面プラズモン共鳴測定のデータにより、グルカゴン結合分子259-H6-002の中央のヌクレオチドストレッチにおいて1個の2'デオキシリボヌクレオチドを1個のリボヌクレオチドで置き換えることで、改善された結合親和性がもたらされたことが確認される(259-H6-002-R13、259-H6-002-R24、259-H6-002-R36に関して示される)。図12に示されるような表面プラズモン共鳴測定のデータにより、グルカゴン結合分子259-H6-002-R13の中央のヌクレオチドストレッチにおいてさらなる1個または2個の2'デオキシリボヌクレオチドを1個または2個のリボヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴンに対して、さらに改善された結合親和性がもたらされることが明らかとなる(259-H6-002-R13、259-H6-002-R13__R24、259-H6-002-R13__R36および259-H6-002-R13__R24__R36)に関して示される)。この効果はまた、インビトロ機能性アッセイにおいて、シュピーゲルマー259-H6-002、259-H6-002-R13および259-H6-002-R13-R24-R36に関しても示された(図6、プロトコールに関しては、実施例5を参照)。

【0286】

さらに、実施例6で示されるように、グルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G13およびNOX-G14の結合選択性を決定した(図19および図20)。

【0287】

1.3 タイプC型のグルカゴン結合核酸分子

さらに、「A型」および「B型」のグルカゴン結合モチーフを共有しないさらに5個のグルカゴン結合核酸を特定し、本明細書中では「C型」と称する。それらは、直接的プルダウン結合アッセイおよび/または比較的競合プルダウン結合アッセイを使用して、アプタマーとして分析した(図7および図8)。

【0288】

驚くべきことに、本発明者等は、グルカゴン結合核酸分子NOX-G11stab12の結合親和性が、NOX-G11stab12の配列において1個のリボヌクレオチドを2'-デオキシリボヌクレオチドで置き換えることにより改善されることを、プラズモン共鳴測定により示した。2'-デオキシリボヌクレオチドおよびヌクレオチドは、図29および図30A~図30Bに示されており、ここで実施例1.3および相当する図面において、以下の略記を使用した: Gは、グアノシン(5'-リン酸)であり、Cは、シチジン5'-リン酸であり、Aは、アデノシン(5'-リン酸)であり、Uは、ウリジン(5'-リン酸)であり、dGは、2'-デオキシグアノシン(5'-リン酸)であり、dCは、2'-デオキシシチジン(5'-リン酸)であり、dAは、2'-デオキシアデノシ

10

20

30

40

50

ン（5'ーリン酸）であり、dTは、2'デオキシチミジン（5'ーリン酸）である。特に、グルカゴン結合核酸分子NOX-G11stab12において5位、7位、15位、16位、19位、20位、21位、22位、23位、24位、25位、26位、27位、46位または48位で1個のリボヌクレオチドを2'ーデオキシヌクレオチドで置き換えることで、グルカゴンに対して改善された結合をもたらした（図25Aおよび図25B）。図26では、プラズモン共鳴測定により決定されるようなNOX-G11stab12、NOX-G11-D07、NOX-G11-D16、NOX-G11-D19、NOX-G11-D21およびNOX-G11-D22の結合曲線が示される。

【0289】

図1～図8で示される配列のいずれも、本発明による核酸分子であり、それらの切断型を包含するだけでなく、それらの伸長型も包含するが、但し、それぞれ、このようにして切断および伸長された核酸分子は、依然として標的に結合することが可能であることが理解される。

【実施例2】

【0290】

<アプタマーおよびシュピーゲルマーの合成ならびに誘導体化>

[小規模合成]

本発明の核酸分子を、それぞれアプタマー（D-RNA核酸またはD-DNA修飾D-RNA核酸）およびシュピーゲルマー（L-RNA核酸またはL-DNA修飾L-RNA核酸）として、標準的な環外アミン保護基を用いた2'TBDMS-RNAおよびDNAホスホルアミダイト化学を使用して、ABI394合成機（Applied Biosystems、Foster City、CA、USA）で固相合成により生産した（DamhaおよびOgilvie、1993）。オリゴヌクレオチドのRNA部分に関して、DおよびL-立体配置のオリゴヌクレオチドrA（N-Bz）-、rC（N-Ac）-、rG（N-ibu）-およびrU-ホスホルアミダイトが使用された一方で、DNA部分に関しては、DおよびL-立体配置のdA（N-Bz）-、dC（N-Ac）-、dG（N-ibu）-およびdTが適用された。ホスホルアミダイトは全て、ChemGenes、Wilmington、MAから購入した。合成および脱保護後に、アプタマーおよびシュピーゲルマーをゲル電気泳動で精製した。

【0291】

[大規模合成および修飾]

シュピーゲルマーを、標準的な環外アミン保護基を用いた2'TBDMS-RNAおよびDNAホスホルアミダイト化学を使用して、Aktapilot100合成機（GE Healthcare、Freiburg）で固相合成により生産した（DamhaおよびOgilvie、1993）。L-rA（N-Bz）-、L-rC（N-Ac）-、L-rG（N-ibu）-、L-rU-、L-dA（N-Bz）-、L-dC（N-Ac）-、L-dG（N-ibu）-およびL-dT-ホスホルアミダイトは、ChemGenes、Wilmington、MAから購入した。5'アミノ修飾機は、American International Chemicals Inc.（Framingham、MA、USA）から購入した。未修飾または5'ーアミノ修飾シュピーゲルマーの合成は、L-リボA、L-リボC、L-リボG、L-リボU、L-2'デオキシA、L-2'デオキシC、L-2'デオキシGまたはL-2'デオキシT修飾CPG（孔径1000Å）（Link Technology、Glasgow、UK）で開始させた。RNAおよびDNAホスホルアミダイトのカップリング（1サイクル当たり15分）に関して、アセトニトリル中の0.3Mベンジルチオテトラゾール（CMS-Chemicals、Abingdon、UK）、および2当量のアセトニトリル中のそれぞれの0.2Mホスホルアミダイト溶液を使用した。酸化-キャッピングサイクルを使用した。さらに、オリゴヌクレオチド合成用の標準的な溶媒および試薬は、Biosolve（Valkenswaard、NL）から購入した。シュピーゲルマーは、合成DMT-ONであった。脱保護後、それを、Source15RPC媒体（Amersham）を使用した分取用R

P-HPLC (Wincott 他、1995) により精製した。5' DMT 基を 80% 酢酸で除去した (室温で 30 分)。5' アミノ修飾シュピーゲルマーの場合、5' MMT 基を 80% 酢酸で除去した (室温で 90 分)。続いて、2 M の NaOAc 水溶液を添加して、シュピーゲルマーを、5 K 再生セルロース膜 (Millipore、Bedford、MA) を使用した接線流濾過により脱塩させた。

【0292】

[シュピーゲルマーのペグ化]

シュピーゲルマーのインビボでの血漿残留時間を延長させるために、40 kDa のポリエチレングリコール (PEG) 部分を、シュピーゲルマーの 5' 末端で共有結合的にカップリングした。

10

【0293】

ペグ化に関して (ペグ化の方法の技術的な詳細に関しては、欧州特許出願公開第 1306382 号を参照)、精製した 5' -アミノ修飾シュピーゲルマーを、 H_2O (2.5 ml)、DMF (5 ml) および緩衝液 A (5 ml、クエン酸・ H_2O [7 g]、ホウ酸 [3.54 g]、リン酸 [2.26 ml] および 1 M NaOH [343 ml] を混合すること、ならびに最終容量が 1 になるように水を添加することにより調製、 $pH = 8.4$ は、1 M HCl で調節した) の混合物中に溶解させた。

【0294】

シュピーゲルマー溶液の pH は、1 M NaOH で 8.4 にした。次に、40 kDa の PEG-NHS エステル (Jenken Technology、Allen、TX、USA) を、最大収率 75~85% に到達するまで、0.25 当量の 6 回分で 30 分毎に、37°C で添加した。反応混合物の pH は、PEG-NHS エステルの添加中、1 M NaOH で 8~8.5 に保たれた。

20

【0295】

反応混合物を、尿素溶液 (8 M) 4 ml、および緩衝液 B (H_2O 中の 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) 4 ml とブレンドして、95°C へ 15 分間加熱した。次に、ペグ化されたシュピーゲルマーは、アセトニトリル勾配 (緩衝液 B、緩衝液 C: アセトニトリル中の 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) を使用して、Source 15 RPC 媒体 (Amersham) を用いた RP-HPLC により精製した。過剰の PEG は 5% 緩衝液 C で溶出し、ペグ化されたシュピーゲルマーは、10~15% 緩衝液 C で溶出した。95% を上回る純度 (HPLC で評価される場合) を有する生成物分画を合わせて、3 M NaOAc 40 ml と混合させた。ペグ化されたシュピーゲルマーを、接線流濾過 (5 K 再生セルロース膜、Millipore、Bedford、MA) により脱塩させた。

30

【実施例 3】

【0296】

< グルカゴンに対する結合親和性の決定 (プルダウンアッセイ) >

グルカゴンへの結合分析用に、グルカゴン結合核酸分子を、D-ヌクレオチドで構成されるアプタマーとして、または L-ヌクレオチドで構成されるシュピーゲルマーとして合成した。アプタマーの結合分析は、D-アミノ酸で構成されるビオチン化ヒト D-グルカゴンを用いて行った。シュピーゲルマーの結合分析は、L-アミノ酸で構成されるビオチン化ヒト L-グルカゴンを用いて行った。

40

【0297】

[直接的プルダウンアッセイ]

[γ - ^{32}P] 標識された ATP (Hartmann Analytic、Braunschweig、Germany) を使用して T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (インビトロゲン、Karlsruhe、Germany) により、アプタマーを 5' リン酸標識した。シュピーゲルマーの 5' 末端にある D 立体配置の 2 つのさらなるアデノシン残基もまた、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによるシュピーゲルマーの放射能標識を可能にした。標識された核酸の比放射能は、200,000~800,000 cpm/pmol であった。変性および再生 (1' 94°C、氷/ H_2O) 後に、低濃度で平衡に達するように、

50

それぞれ様々な量のビオチン化ヒトDまたはL-グルカゴンと一緒に、選択緩衝液（20 mMのTris-HCl、pH 7.4、137 mMのNaCl、5 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、1 mMのCaCl₂、0.1% [w/vol]のTween-20、0.1% [w/vol]のCHAPS）中で2～6時間、37℃で100～700 pM濃度で、標識された核酸をインキュベートした。使用されるプラスチック製品の表面または固定化マトリックスへの結合パートナーの非特異的吸着を防止するために、選択緩衝液に、100 μg/mlのヒト血清アルブミン（Sigma-Aldrich、Steinheim、Germany）および10 μg/mlの酵母RNA（Ambion、Austin、USA）を補充した。アプタマー結合に関するビオチン化D-グルカゴンの濃度範囲は、0.64 nM～10 μMに設定されたのに対して、シュピーゲルマー結合に関するビオチン化L-グルカゴンの濃度範囲は、0.32 nM～5 μMに設定された。総反応容量は50 μLであった。ビオチン化グルカゴン、および核酸とビオチン化グルカゴンとの複合体を、選択緩衝液で予め平衡化させた高容量ニュートラアビジンアガロース粒子（Thermo Scientific、Rockford、USA）4 μl上に固定化した。粒子をサーモミキサー中でそれぞれの温度で20分間、懸濁状態に保った。上清の除去および適当な洗浄後に、固定化放射能をシンチレーションカウンターで定量化した。結合のパーセントをビオチン化グルカゴンの濃度に対してプロットして、1:1の化学量論を仮定してソフトウェアアルゴリズム（GRAFIT、Erithacus Software、Surrey、U.K.）により解離定数を得た。

10

【0298】

20

〔グルカゴン結合核酸の順位に関する競合プルダウンアッセイ〕

種々のアプタマーまたはシュピーゲルマーのグルカゴンへの結合を比較するために、競合順位アッセイを実施した。この目的で、利用可能な最も密接（affine）なアプタマーまたはシュピーゲルマーのいずれかを放射能標識して（上記を参照）、それぞれ、グルカゴン結合アプタマーまたはシュピーゲルマー用の参照として機能を果たした。変性および再生後に、高容量ニュートラアビジンアガロース粒子（Thermo Scientific、Rockford、USA）1.5 μl上の固定化および競合なしの洗浄後に、ビオチン化グルカゴンへのおよそ5～10%結合をもたらす条件で、選択緩衝液50または100 μl中でビオチン化グルカゴンとともに37℃で、標識された核酸をインキュベートした。過剰の変性および再生した非標識アプタマー変異体を、平行結合反応に対して標識された参照アプタマーと一緒に、種々の濃度（例えば、50、500および5000 nM）で添加した。変性および再生した非標識シュピーゲルマー誘導体は、平行結合反応において参照シュピーゲルマーと一緒に1、10および100 nMの濃度で適用させた。試験されるべき核酸は、標的結合に関して参照核酸と競合し、したがってそれらの結合特性に依存して結合シグナルを減少させた。続いて、このアッセイで最も活性であることがわかったアプタマーまたはシュピーゲルマーはそれぞれ、他のグルカゴン結合核酸分子の比較的分析に関する新たな参照として機能を果たすことができた。各結合曲線の標識されたシュピーゲルマーの結合を正規化した（100%に対して、競合なしでの結合を設定した）。

30

【0299】

40

〔親和性および選択性の決定のための競合プルダウンアッセイ〕

比較順位実験に加えて、競合プルダウンアッセイもまた、グルカゴン結合核酸の親和性定数を決定するために実施した。この目的で、D-グルカゴン結合アプタマーまたはL-グルカゴン結合シュピーゲルマーのいずれかは、上述するように放射能標識されて、参照として機能を果たした。変性および再生後に、標識された参照核酸および競合相手分子の例えば0.128～2000 nMの範囲の5倍希釈物のセットを、選択緩衝液0.1または0.2 ml中で37℃で2～4時間、一定量のビオチン化グルカゴンとともにインキュベートした。選択したタンパク質濃度は、最低競合相手濃度で、放射能標識した参照分子のおよそ5～10%の最終結合を引き起こすべきである。誘導体核酸配列の結合定数を測定するために、過剰の適当な変性および再生した非標識アプタマーまたはシュピーゲルマ

50

一変異体が競合相手として機能を果たしたのに対して、シュピーゲルマーに関しては、未修飾およびペグ化型を試験した。別のアッセイアプローチでは、種々の濃度での非ビオチン化グルカゴンは、アプタマーまたはシュピーゲルマー結合に関してビオチン化グルカゴンに対して競合した。さらに、グルカゴン結合シュピーゲルマーの選択性は、ビオチン化グルカゴンに対して競合するのに使用されるヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) およびグルコース依存性インスリン分泌性ポリペプチド (GIP) により検討した。高容量ニュートラアビジンアガロスマトリックス1.5 μ l 上のビオチン化グルカゴンおよび結合核酸の固定化、洗浄およびシンチレーション計数 (上記を参照) 後に、結合放射能標識シュピーゲルマーの正規化されたパーセントを、競合相手分子の相当する濃度に対してプロットした。得られた解離定数は、GraFitソフトウェアを用いて算出した。

10

【実施例4】

【0300】

＜グルカゴン結合シュピーゲルマーのピアコア測定＞

〔ピアコアアッセイ設定〕

ビオチン化ヒトL-グルカゴン (グルカゴン_{1~29}-AE EAc-AE EAc-ビオチン、BACHEM、Switzerlandによるカスタム合成) を、カルボキシメチル化 (略記: CM) デキストランコーティングしたセンサチップ上に固定化した。このセンサチップは、0.4 M EDC (H_2O 中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド、GE、BR-1000-50) および0.1 M NHS (H_2O 中のN-ヒドロキシスクシンイミド、GE、BR-1000-50) の1:1混合物を使用して、可溶性ニュートラアビジン (Sigma Aldrich、Germany) の共有結合的固定化により調製した。同じセンサチップ上の参照フローセルをビオチンでブロックした。

20

【0301】

〔一般的な動力学的評価〕

グルカゴン結合シュピーゲルマーを、100 μ Mのストック濃度 (UV測定により定量化) になるように水中に溶解させて、水浴またはサーモミキサー中で最大95℃へ30秒間加熱して、氷上で瞬間 (snap) 冷却して、均質な溶解溶液を保証した。動力学的パラメータおよび解離定数は、実行緩衝液中に希釈させた1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、1.95、0.98および0 nMの濃度での一連のシュピーゲルマー注入により評価した。全て実験において、分析は、30 μ l/分の流速で240~360の結合時間および240~360秒の解離時間を規定するKinjectコマンドを使用して37℃で実施した。アッセイは二重参照であったのに対して、FC1は、(ブロックされた) 表面对照 (各シュピーゲルマー濃度のバルク寄与) として機能を果たし、分析物を伴わない一連の緩衝液注入は、緩衝液自体のバルク寄与を決定した。データ解析および解離定数 (K_D) の算出は、修飾ラングミア1:1化学量論的フィッティングアルゴリズムを使用して、BIAevaluation 3.1.1ソフトウェア (BIAcore AB、Uppsala、Sweden) を用いて行った。

30

【0302】

データ解析および解離定数 (K_D) の算出は、一定RIおよび 1×10^7 [RU/M*s] の質量移行係数ktを用いて、修飾ラングミア1:1化学量論的フィッティングアルゴリズムを使用して、BIAevaluation 3.1.1ソフトウェア (BIAcore AB、Uppsala、Sweden) を用いて行った。結果は、ka [1/M*s] 対kd [1/s] としてプロットした。

40

【0303】

〔グルカゴン結合シュピーゲルマーの選択性を決定するための競合ピアコアアッセイ〕

ビオチン化ヒトグルカゴンの固定化は、上述するように実施した。分析されるべきシュピーゲルマーは、競合相手として一連の濃度 (2000~1000~500~250~0 nM) の様々なグルカゴン関連遊離ペプチド (すなわち、グルカゴン、オキシントモジュ

50

リン、GLP-1（7～37）、GLP-2（1～33）、GIPおよびプレプロ-VIP（81～122）と一緒に、または対照として競合相手なしで、固定濃度（ここでは、125 nM）で注入した。競合相手なしの固定化L-グルカゴンへのシュピーゲルマー結合（対照）を100%に正規化した。シュピーゲルマーがグルカゴンまたは関連ペプチド（競合相手ペプチド）と同時に注入されると、固定化グルカゴンへのシュピーゲルマー結合は、可溶性競合相手に対する結合が起こる場合には低減される（2000 nMの競合相手ペプチドに関してのみ応答が示された）。注入の360秒後の応答ユニット[RU]を決定し、対照（=100%）に対して正規化して、プロットした。

【実施例5】

【0304】

＜グルカゴン結合シュピーゲルマーによるグルカゴン誘導性cAMP生産の阻害＞

グルカゴンに対するヒト受容体を発現する、安定にトランスフェクトされた細胞株は、ヒトグルカゴン受容体をコードする配列（NCBIアクセッションNM_000160）をpCR3.1ベクター（インビトロゲン）へクローニングさせることにより生成させた。無血清培地（UltraCHO、Lonza）中で成長するように適応されたCHO細胞をグルカゴン受容体プラスミドにトランスフェクトして、安定にトランスフェクトされた細胞をゲネチシンによる処置により選択した。

【0305】

阻害実験用に、グルカゴン受容体を発現するCHO細胞を、 $4 \sim 6 \times 10^4$ 個/ウェルの密度で96ウェルプレート（細胞培養物で処置、平坦な底部）上に播種して、100ユニット/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンおよび0.5 mg/mlのゲネチシンを含有するUltraCHO培地中で、37℃、5%CO₂で一晩培養した。刺激の20分前に、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）の溶液を最終濃度が1 mMになるように添加した。

【0306】

刺激溶液（グルカゴン+様々な濃度のシュピーゲルマー）は、ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）+1 mg/mlのBSA中で構成され、37℃で30分間インキュベートした。細胞への添加の直前に、IBMXを、最終濃度が1 mMになるように添加した。刺激のため、培地を細胞から除去して、刺激溶液（グルカゴン+シュピーゲルマー）を添加した。37℃で30分間のインキュベーション後、溶液を除去して、cAMPスクリーン（Screen）（商標）システムキット（Applied Biosystems）の構成成分である溶解緩衝液中に、細胞を溶解させた。このキットは、供給業者の指示書に従ってcAMP含有量の決定に使用した。

【実施例6】

【0307】

＜グルカゴン結合シュピーゲルマーによるGIP誘導性cAMP生産の阻害＞

グルカゴン結合シュピーゲルマーが同様に、グルカゴン依存性インスリン分泌性ポリペプチド（GIP）の作用を阻止することができるかどうかを検討するために、RIN-m5Fラットインスリノーマ細胞（ATCC、CRL-11605）を、 1×10^5 個/ウェルの密度で96ウェルプレート（細胞培養物で処置、平坦な底部）上に播種して、10%ウシ胎児血清、100ユニット/mlのペニシリンおよび100 μ g/mlのストレプトマイシンを含有するPRMI1640培地中で、37℃、5%CO₂で一晩培養した。刺激の20分前に、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）の溶液を最終濃度が1 mMになるように添加した。

【0308】

刺激溶液（GIP+様々な濃度のシュピーゲルマー）は、ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）+1 mg/mlのBSA中で構成され、37℃で30分間インキュベートした。細胞への添加の直前に、IBMXを、最終濃度が1 mMになるように添加した。刺激のため、培地を細胞から除去して、刺激溶液（GIP+シュピーゲルマー）を添加した。37℃で30分間のインキュベーション後、溶液を除去して、cAMPスクリーン（Screen）

10

20

30

40

50

en) (商標) システムキット (Applied Biosystems) の構成成分である溶解緩衝液中に、細胞を溶解させた。このキットは、供給業者の指示書に従って cAMP 含有量の決定に使用した。

【実施例 7】

【0309】

＜グルカゴン結合シュピーゲルマー選択性の決定＞

グルカゴン前駆体は、8つの鎖、すなわちグリセンチン、グリセンチン関連ポリペプチド (GRP P)、オキシントモジュリン (OXY/OXM)、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1)、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1 [7~37])、グルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1 [7~36]) およびグルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2) に切断される (図 21 を参照)。また、BLAST 検索により、グルカゴン配列関連ペプチドとして、グルコース依存性インスリン分泌性ペプチド (GIP) および腸管ペプチド PHV-42 (プレプロ血管作動性腸管ペプチド/プレプロ-VIP [81~122]) も特定された。A 型 (例えば、シュピーゲルマー 257-E1-6xR-001、257-E1-7xR-037、257-E1-6xR-030-5'-PEG (NOX-G15 と称される) および 257-E1-7xR-037-5'-PEG (NOX-G16 と称される))、ならびに B 型 (例えば、259-H6-02-R13-5'-PEG (NOX-G13 と称される) および 259-H6-014-R12/23/35-5'-PEG (NOX-G14 と称される)) のグルカゴン結合核酸分子の選択性は、遊離グルカゴン、オキシントモジュリン、GLP-1 [7~37]、GLP-2 [1~33]、GIP およびプレプロ-VIP [81~122] を用いた競合結合アッセイ方式で、プルダウンアッセイ (実施例 3 を参照) および/またはビアコア測定 (実施例 4 を参照) により決定した。細胞ベースのアッセイ (実施例 5 および実施例 6) を使用して、グルカゴン、オキシントモジュリン、GLP-1 および GIP に対する A 型のグルカゴン結合核酸分子の結合を確認した。

【0310】

プルダウンアッセイ (実施例 3 を参照) および/またはビアコア測定で、A 型および B 型のグルカゴン結合核酸分子は、グルカゴンおよびオキシントモジュリンに対して匹敵する結合を示し、細胞ベースのアッセイでは、グルカゴン誘導性およびオキシントモジュリン誘導性 cAMP 形成を阻害した。これらのデータにより、グルカゴンの C 末端は、A 型および B 型のグルカゴン結合核酸分子のグルカゴン結合に必須ではないことが示される。グルカゴン配列関連ペプチド GLP-1 [7~37]、GLP-2 [1~33] およびプレプロ-VIP [81~122] は、A 型および B 型のグルカゴン結合核酸分子により認識されなかった。驚くべきことに、B 型のグルカゴン結合核酸分子 259-H6-002-R13-5'-PEG (NOX-G13 と称される) および 259-H6-014-R12/23/35-5'-PEG (NOX-G14 と称される) は、GIP への結合を示し、細胞ベースのアッセイでは、GIP 誘導性 cAMP 形成を阻害した (図 18、図 19、図 20)。

【実施例 8】

【0311】

＜1 型および 2 型糖尿病動物実験におけるグルコース負荷に対するグルカゴン結合シュピーゲルマーの効果＞

＜8.1 1 型糖尿病動物実験におけるグルコース負荷に対するグルカゴン結合シュピーゲルマーの効果＞

【方法】

雄 BALB/c マウスを 20~24 g で入手して、実験を開始する前の 1 週間、標準的な条件で収容した。

【0312】

最近公開されたデータ (Lee, Wang 他, 2011) によれば、1 型糖尿病 (略記, DM1) は、試験日の 3 週前に第 1 のストレプトゾトシン (略記, STZ) 注入 (10

10

20

30

40

50

0 mg/kg (体重))、および実験の2週前に第2の注入(80 mg/kg (体重))により誘導された。1型糖尿病の表現型達成を確認するために、空腹時グルコースレベルおよび体重を、腹腔内グルコース負荷試験(略記: ipGTT)の1日前に測定した。初期体重と比較した場合に25%を上回る体重損失を伴う動物、および200 mg/dL未満、または500 mg/dL超の空腹時血中グルコースレベルを伴う動物を排除した。

【0313】

実験日に、下記手順を行った:

実験の開始の2.5時間前(時間:-95分)にマウスを絶食させた。

時間: 行動

-95分: 基本血漿グルコースの決定

-90分: NOX-G15 (1 mg/kg および 10 mg/kg) またはグルカゴン受容体アンタゴニスト des-His¹-Glu⁹-グルカゴン (2 mg/kg および 4 mg/kg) またはビヒクル(注入量のH₂O)の腹腔内注入

-5分: 血中グルコースの決定

0分: グルコースの腹腔内注入 (2 g/kg)

20分: 血中グルコースの決定

40分: 血中グルコースの決定

70分: 血中グルコースの決定

100分: 血中グルコースの決定

【0314】

[結果]

STZ処置したマウスは、2.5時間の絶食間隔後に300~400 mg/dLの基本グルコースレベルの強力な上昇を示した。腹腔内グルコース注入の20分後に、グルコースレベルは、ビヒクル処置群において最高のピークに達した。陽性対照として使用されたペプチド性受容体アンタゴニスト(Dallas-Yang, Shen他、2004)は、グルコース負荷前の高い用量群でグルコース濃度の低下を示した。両方の群が、ビヒクル群よりも低いピークに達した。同様に、両方のシュピーゲルマー用量群が、ビヒクルよりも低いピークグルコース濃度を有した。上述の効果はまた、シュピーゲルマーで処置した群において経時的な血中グルコースに関して有意に低い曲線下面積(略記: AUC)をもたらした(図23)。

【0315】

<8.2 2型糖尿病動物実験におけるグルコース負荷に対するグルカゴン結合シュピーゲルマーNOX-G15の効果>

ヒトで観察される後期2型糖尿病(略記: DM2)症状を模倣して、食事性肥満マウスを低用量のストレプトゾトシンで処置することができる(Luo, Quan他、1998、Strowski, Li他、2004)。

【0316】

[方法]

雄BALB/cマウスを20~24 gで入手した。10週の高脂肪食(略記: HFD)の摂食によりインスリン耐性を誘導させた。さらに、HFDの8週後に、STZの用量(100 mg/kg (体重))を投与して、後期DM2生理学を模倣する部分的β細胞不全を誘導した(Baribault 2010)。糖尿病は、絶食血中グルコースレベルおよび体重を測定することにより確認した。200 mg/dL未満、または300 mg/dL超の血中グルコースレベルを伴うマウスを排除した。同様に、HFDにも関わらずストレプトゾトピン注入前に、および注入の1週後に安定な重量プロファイルを有さないマウスも排除した。

【0317】

実験日に、下記手順を行った:

実験の開始の2.5時間前(時間:-120分)にマウスを絶食させた。

時間: 行動

- － 1 2 0 分： 基本血中グルコースの決定
- － 9 0 分： NOX-G 1 5 (1 m g / k g および 1 0 m g / k g) またはグル
カゴン受容体アンタゴニスト d e s - H i s ¹ - G l u ⁹ - グルカゴン (4 m g / k g)
またはビヒクル (注入量の H ₂ O) の腹腔内注入
- － 5 分： 血中グルコースの決定
- 0 分： グルコースの腹腔内注入 (2 g / k g)
- 2 0 分： 血中グルコースの決定
- 4 0 分： 血中グルコースの決定
- 7 0 分： 血中グルコースの決定
- 1 0 0 分： 血中グルコースの決定
- 1 2 0 分： 血中グルコースの決定

10

【 0 3 1 8 】

[結果]

DM2 マウスは、2. 5 時間の絶食間隔後に 1 7 0 m g / d L の基本グルコースレベルの上昇を示した。腹腔内グルコース注入の 4 0 分後に、グルコースレベルは、ビヒクル処置群において最高のピークに達した。陽性対照として使用されたペプチド性受容体アンタゴニスト (D a l l a s - Y a n g , S h e n 他、2 0 0 4) は、わずかに低いグルコース濃度を示し、またより迅速な正常化を示した。両方のシュピーゲルマー用量群は、ビヒクルおよびグルカゴン受容体アンタゴニストよりも低いピークグルコース濃度およびより迅速な正常化を有した。上述の効果はまた、シュピーゲルマーで処置した群において経時的な血中グルコースに関して有意に低い曲線下面積 (略記 . A U C) をもたらした (図 2 4 を参照) 。

20

【 0 3 1 9 】

< 8. 3 1 型糖尿病動物実験におけるグルコース負荷に対するグルカゴン結合シュピーゲルマー NOX-G 1 6 の効果 >

[方法]

雄 B A L B / c マウスを 2 0 ~ 2 4 g で入手して、実験を開始する前の 1 週間、標準的な条件で収容した。

【 0 3 2 0 】

最近公開されたデータ (L e e , W a n g 他、2 0 1 1) によれば、1 型糖尿病 (略記 . D M 1) は、試験日の 3 週前に第 1 のストレプトゾトシン (略記 . S T Z) 注入 (1 0 0 m g / k g (体重)) 、および実験の 2 週前に第 2 の注入 (8 0 m g / k g (体重)) により誘導された。1 型糖尿病の表現型達成を確証するために、空腹時グルコースレベルおよび体重を、腹腔内グルコース負荷試験 (略記 . i p G T T) の 1 日前に測定した。初期体重と比較した場合に 2 5 % を上回る体重損失を伴う動物、および 2 0 0 m g / d L 未満、または 5 0 0 m g / d L 超の空腹時血中グルコースレベルを伴う動物を排除した。処置群 1 つ当たり 2 0 匹のマウスが存在した。

30

【 0 3 2 1 】

実験日に、下記手順を行った：

- 時間： 行動
- － 4 8 0 分： 食物除去
- － 1 2 5 分： 基本血中グルコースの決定
- － 1 2 0 分： NOX-G 1 6 (0 . 1 m g / k g および 1 m g / k g) またはビ
ヒクル (0 . 9 % 生理食塩水) の腹腔内注入
- － 5 分： 血中グルコースの決定 (シュピーゲルマーのみの効果)
- 0 分： グルコースの腹腔内注入 (2 g / k g)
- 1 5 分： 血中グルコースの決定
- 3 0 分： 血中グルコースの決定
- 4 5 分： 血中グルコースの決定
- 6 0 分： 血中グルコースの決定

40

50

90分： 血中グルコースの決定

【0322】

処置は、9日間毎日、およそ午前9時に行った。i P G T Tは、1日目、3日目および7日目に実施した。

【0323】

〔結果〕

S T Z 処置したマウスは、2時間の絶食間隔後に300～400mg/dLの基本グルコースレベルの強力な上昇を示した。腹腔内グルコース注入の20分後に、グルコースレベルは、ビヒクル処置群において最高のピークに達した。両方のシュピーゲルマー用量群は、ビヒクルよりも低いピークグルコース濃度を有した。上述の効果はまた、1mg/kgのシュピーゲルマーで処置した群において経時的な血中グルコースに関して有意に低い曲線下面積（略記．AUC）をもたらした（図27）。これにより、NOX-G16の反復用量の血糖効果作用を7日間にわたって維持することができることが示され、内分泌ホルモンまたは他のシグナル伝達物質およびそれらの受容体の上方または下方制御によりシュピーゲルマー効果をくつがえすことが起きないことを示す。

10

【0324】

9日目に、NOX-G16を絶食の4時間後に投与した。さらに2時間後に採血した。線維芽細胞増殖因子21（FGF-21）レベル（これらは、糖尿病で増大される）。は、両方のシュピーゲルマー用量群で有意に低減され、したがってNOX-G16の反復投与が、疾患の長期転帰に対して有益な効果を有し得るという証拠を提供する。

20

【0325】

<参考文献>

本明細書中に引用される文書の完全な書誌データは、断らない場合には、下記の通りであり、ここで、上記参考文献の開示は、参照により本明細書に援用される。

【表 2 A】

- Altschul S.F., Gish W., et al. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- Altschul S.F., Madden T.L., et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.
- Amori, R. E., J. Lau, et al. (2007). "Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis." *JAMA* 298(2): 194-206. 10
- Asmar, M. (2011). "New physiological effects of the incretin hormones GLP-1 and GIP." *Dan Med Bull* 58(2): B4248.
- Baribault, H. (2010). "Mouse models of type II diabetes mellitus in drug discovery." *Methods Mol Biol* 602: 135-55.
- Brand, C. L., B. Rolin, et al. (1994). "Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats." *Diabetologia* 37(10): 985-93.
- Conarello, S. L., G. Jiang, et al. (2007). "Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia." *Diabetologia* 50(1): 142-50. 20
- Dallas-Yang, Q., X. Shen, et al. (2004). "Hepatic glucagon receptor binding and glucose-lowering in vivo by peptidyl and non-peptidyl glucagon receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* 501(1-3): 225-34.
- Damha M.J. and Ogilvie K.K. (1993). "Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method." *Methods Mol Biol* 20:81-114
- EMA (2010) "European Medicines Agency recommends suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim; Anti-diabetes medication to be taken off the market." Press Release Volume, 2 DOI: 30
- FDA (2011) "FDA Drug Safety Communication: Updated Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) to Restrict Access to Rosiglitazone-containing Medicines including Avandia, Avandamet, and Avandary." Safety Announcement Volume, DOI:
- Gin, H. and V. Rigalleau (2000). "Post-prandial hyperglycemia. post-prandial hyperglycemia and diabetes." *Diabetes Metab* 26(4): 265-72.
- Griffing, G.T., Odeke, S., et al. "Hyperglucagonemia", 40
<http://emedicine.medscape.com/article/121575-overview>

【表 2 B】

- Irwin, N. and P. R. Flatt (2009). "Evidence for beneficial effects of compromised gastric inhibitory polypeptide action in obesity-related diabetes and possible therapeutic implications." *Diabetologia* 52(9): 1724-31.
- Jiang, G. and B. B. Zhang (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4): E671-8.
- Klussmann S. (2006). *The Aptamer Handbook – Functional Oligonucleotides and their Applications*. Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2 10
- Kusser W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 74(1): 27-38.
- Lee, Y., M. Y. Wang, et al. (2011). "Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice." *Diabetes* 60(2): 391-7.
- Liang, Y., M. C. Osborne, et al. (2004). "Reduction in glucagon receptor expression by an antisense oligonucleotide ameliorates diabetic syndrome in db/db mice." *Diabetes* 53(2): 410-7. 20
- Luo, J., J. Quan, et al. (1998). "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Metabolism* 47(6): 663-8.
- Mairal T., Ozalp V.C., Lozano Sánchez P., et al. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 390(4):989-1007
- McClean, P. L., N. Irwin, et al. (2007). "GIP receptor antagonism reverses obesity, in-sulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(6): E1746-55. 30
- McGinnis S., Madden T.L. et al. (2004) BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.
- Miyawaki, K., Y. Yamada, et al. (1999). "Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14843-7.
- Miyawaki, K., Y. Yamada, et al. (2002). "Inhibition of gastric inhibitory polypeptide sig-naling prevents obesity." *Nat Med* 8(7): 738-42. 40
- Needleman and Wunsch (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.

【表 2 C】

- Nissen, S. E. and K. Wolski (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* 356(24): 2457-71.
- Ohneda, A., K. Watanabe, et al. (1978). "Abnormal response of pancreatic glucagon to glycemic changes in diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* 46(3): 504-10.
- Pearson and Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 10
- Petersen, K. F. and J. T. Sullivan (2001). "Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans." *Diabetologia* 44(11): 2018-24.
- Smith and Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Sorensen, H., C. L. Brand, et al. (2006). "Immunoneutralization of endogenous glucagon reduces hepatic glucose output and improves long-term glycemic control in diabetic ob/ob mice." *Diabetes* 55(10): 2843-8. 20
- Sorensen, H., M. S. Winzell, et al. (2006). "Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function." *Diabetes* 55(12): 3463-9.
- Strowski, M. Z., Z. Li, et al. (2004). "Small-molecule insulin mimetic reduces hyperglycemia and obesity in a nongenetic mouse model of type 2 diabetes." *Endocrinology* 145(11): 5259-68.
- Venkatesan N., Kim S.J., et al. (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. *Curr Med Chem* 10(19): 1973-91. 30
- Wahid M., Naveed, A.K., et al. (2007) "Hyperglucagonemia – a potent threat which can worsen the diabetes mellitus" *Annals of King Edward Medical University Lahore Pakistan* 13(4): 247-251.
- Wincott F., DiRenzo A., et al. (1995) "Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes." *Nucleic Acids Res.* 23(14):2677-84.

40

【 0 3 2 6 】

本明細書、特許請求の範囲および／または図面に開示される本発明の特徴は、別個およびそれらの任意の組合せで、その様々な形態で本発明を実現するための材料であり得る。

。

A型のグルカゴン結合核酸分子:257-E1-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列	5' → 3'	Comp (APM)
257-E1-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC	=	=
257-E1-002	45	CAGTCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC	<	<
257-E1-003	45	CAGTCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC	<	<
257-E1-004	43	AGTCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC	<	<
257-E1-005	41	GTCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC	<	<

nt.: スクレオチドの数
 G, C, TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボスクレオチドである
 □で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

Comp(APM): アプタマー(D-核酸)の解離定数 K_D 。示される配列を有する分子を、参照としての257-E1-001に対するブルダウン結合アッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した
 =参照と類似の結合親和性、<参照よりも弱い結合親和性

APM: アプタマー

図 2A

A型のグルカゴン結合核酸分子

化合物	nt.	配列	5' → 3'	Comp (APM)	PD (APM) K_D [nM]	PD (SPM) K_D [nM]	CHO_OR IC_{50} [nM]
257-A1-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<	143		
257-D4-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<<			
257-F4-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<			
257-B3-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<<			
257-D3-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<<			
257-E4-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		=	124		
257-B1-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		=	137	179	500-1000
257-C4-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<<			
257-C1-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<			
257-H2-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCGCATCTGC		<			

nt.: スクレオチドの数
 G, C, TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボスクレオチドである

APM: アプタマー

□で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

図 1

【図 2 A】

【図 1 - 1】

A型のグルカゴン結合核酸分子:257-E1-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列	5' → 3'	Comp (SPM) K_D [nM]	ピアコフ SPM K_D [nM]	CHO_OR IC_{50} [nM]
257-E1-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		187		
257-E1-R9-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		+		
257-E1-R15-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		33.5		
257-E1-R18-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		+		
257-E1-R19-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		+		
257-E1-R29-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		64		
257-E1-R30-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		111		
257-E1-R15/29-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		18.7*		
257-E1-R29/30-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		48.8**		
257-E1-R15/29/30-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		20**		
257-E1-R18/29/30-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		35**		
257-E1-R15/18/29/30-001	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		**		
257-E1-6XR-001 (=257-E1-R9/15/18/19/29/30-001)	47	GCATCTGCGGAAATGGGAGGCGTAGGTGGAGGAAATCTGAGCTACTGC		6.4***	4.82	2.8-3.1

図 2B

【図 1 - 2】

Comp(APM):示される配列を有する分子を、参照としての257-E1-001に対するブルダウン結合アッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として試験した
 =257-E1-001と類似の結合親和性、<257-E1-001よりも弱い結合親和性、<<257-E1-001よりもはるかに弱い結合親和性
 PD(APM):アプタマー(D-核酸)の解離定数 K_D 。示される配列を有する分子を、バイオセンシブルなグルカゴンへの直接的結合または非バイオセンシブルなグルカゴンとの結合を使用したブルダウンアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した
 PD(SPM):バイオセンシブルなグルカゴンとの結合を使用したブルダウンアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した
 CHO_OR:最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてジュビゲルマーとして試験した

図 1 続き

【図 2 B - 1】

【図 2 B - 2】

nt.ヌクレオチドの数

□で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

rGおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである G、C、TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(SPM): 示される配列を有する分子を、参照としての257-E1-R15/29-001'、257-E1-R15/29-001'', または257-E1-6XR-001'''に対するブルダウン結合結合アッセイにおいてシユビ-グルマー(核)として試験した(ここで繰つかの分子に関して、解離定数(K_d)を決定した)

+参照よりも良好な結合親和性、=参照と類似の結合親和性

Biacore(SPM): シユビ-グルマー(核)の解離定数K_d。示される配列を有する分子を、ピオチン化(核)グルカゴンへの直接的結合を使用し、ピオコアで表面プラズモン共鳴として測定されるシユビ-グルマー(核)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビ-グルマーとして試験した

SPM: シユビ-グルマー

図 2B 続き

【図 3 A】

A型のグルカゴン結合核酸分子:257-E1-6XR-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (SPM) K _d [nM]	ピオコア (SPM) K _d [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
257-E1-6XR-001	47	GCAGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	6.4	4.82	2.8-3.1
257-E1-6XR-003	45	GAATGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	8.4		
257-E1-6XR-004	43	AGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	1.9		
257-E1-6XR-005	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<		
257-E1-6XR-006	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	10		
257-E1-6XR-007	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<		
257-E1-6XR-008	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	=		
257-E1-6XR-009	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	7.8	4.81	2.1
257-E1-6XR-010	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	5.9		3.3

nt.ヌクレオチドの数

□で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

rGおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである、 G、C、TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(SPM): 示される配列を有する分子を、参照257-E1-6XR-001'に対するブルダウン結合結合アッセイにおいてシユビ-グルマー(核)として試験した(ここで繰つかの分子に関して、解離定数(K_d)を決定した)

+参照よりも良好な結合親和性、=参照と類似の結合親和性

Biacore(SPM): シユビ-グルマー(核)の解離定数K_d。示される配列を有する分子を、ピオチン化(核)グルカゴンへの直接的結合を使用し、ピオコアで表面プラズモン共鳴として測定されるシユビ-グルマー(核)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビ-グルマーとして試験した

図 3A

【図 3 B】

A型のグルカゴン結合核酸分子:257-E1-6XR-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (SPM) K _d [nM]
257-E1-6XR-001	47	GCAGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	=
257-E1-6XR-011	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	+
257-E1-6XR-012	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	=
257-E1-6XR-013	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	=
257-E1-6XR-014	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<
257-E1-6XR-015	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<
257-E1-6XR-016	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	6.2
257-E1-6XR-017	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<
257-E1-6XR-018	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	=

nt.ヌクレオチドの数

□で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

rGおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである G、C、TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドである

SPM: シユビ-グルマー

Comp(SPM): 示される配列を有する分子を、参照257-E1-6XR-001'に対するブルダウン結合結合アッセイにおいてシユビ-グルマー(核)として試験した

+参照よりも良好な結合親和性、=参照と類似の結合親和性、<参照よりも弱い結合親和性

図 3B

【図 3 C】

A型のグルカゴン結合核酸分子:257-E1-6XR-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (SPM) K _d [nM]	ピオコア (SPM) K _d [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
257-E1-6XR-001	47	GCAGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	6.4*	4.82	2.8-3.1
257-E1-6XR-019	43	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	7.7*	3.89	2.0-3.6
257-E1-6XR-020	43	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	6.3*		
257-E1-6XR-029	41	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	8.9*	4.61	2.97
257-E1-6XR-030	39	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	9.6*	5.02	1.6-4.6
257-E1-6XR-031	39	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<*		
257-E1-6XR-032	37	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<*		
257-E1-6XR-033	35	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	<*		
257-E1-7XR-023	45	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	4.4*		
257-E1-7XR-037	39	GGGTGGGCGAAATGCGGATGCGCTAGGTGGATAGGAATCTGAGCTACTGC	5.6**	1.88	1.7-2.5

nt.ヌクレオチドの数

□で繰取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

rG、AおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである G、C、TおよびAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(SPM): 示される配列を有する分子を、参照としての257-E1-6XR-001'または257-E1-7XR-037'に対するブルダウン結合結合アッセイにおいてシユビ-グルマー(核)として試験した(ここで繰つかの分子に関して、解離定数(K_d)を決定した)

+参照よりも良好な結合親和性、=参照よりも弱い結合親和性

Biacore(SPM): シユビ-グルマー(核)の解離定数K_d。示される配列を有する分子を、ピオチン化(核)グルカゴンへの直接的結合を使用し、ピオコアで表面プラズモン共鳴として測定されるシユビ-グルマー(核)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビ-グルマーとして試験した

図 3C

【図 4】

B型のグルカゴン結合核酸分子

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (APM)	PD (APM) K ₀ [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
259-H6-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<		
259-H6-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	=	33	300-400
259-H7-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<		
259-H8-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<<		
259-A5-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<<		
259-C8-001	50	CGGCTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	=		
259-E5-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<<		
259-E7-001	48	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<<		
259-F5-001	48	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	<	180	

nt.:ヌクレオチドの数

APM: アプタマー

□で線取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

G、C、TおよびAのいずれかは2-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(APM): 示される配列を有する分子を、259-H6-001に対するブルダウん結合アッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

=259-H6-001と類似の結合親和性、<259-H6-001よりも弱い結合親和性、<<259-H6-001よりもはるかに弱い結合親和性

PD(APM): アプタマー(D-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化D-グルカゴンへの直接的結合または非ピオチン化D-グルカゴンとの結合を使用したブルダウんアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビーグラーマーとして試験した

図 4

【図 5】

B型のグルカゴン結合核酸分子:259-H6-001およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (APM)	PD (APM) K ₀ [nM]	ピオコア (SPM) K ₀ [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
259-H6-001	50	CGACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTCG	=	33		300-400
259-H6-002	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	=	57	12.3	176
259-H6-005	44	GTCCAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	=			
259-H6-003	42	TCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<			
259-H6-004	38	GAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<			
259-H6-006	45	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<<			
259-H6-007	45	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<<			
259-H6-008	44	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<<			

nt.:ヌクレオチドの数

APM: アプタマー SPM: シュビーグラーマー

□で線取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

G、C、TおよびAのいずれかは2-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(APM): 示される配列を有する分子を、それぞれ参照259-H6-001および259-H6-002に対するブルダウん結合アッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

=参照と類似の結合親和性、<参照よりも弱い結合親和性、<<参照よりもはるかに弱い結合親和性

PD(APM): アプタマー(D-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化D-グルカゴンへの直接的結合または非ピオチン化D-グルカゴンとの結合を使用したブルダウんアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

Biocore(SPM): シュビーグラーマー(L-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化L-グルカゴンへの直接的結合を使用して、ピオコアで表面プラズモン共振として測定されるシユビーグラーマー(L-核酸)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビーグラーマーとして試験した

図 5

【図 6 A】

B型のグルカゴン結合核酸分子:259-H6-002およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	PD (APM) K ₀ [nM]	ピオコア (SPM) K ₀ [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
259-H6-002	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	57	12.3	176
259-H6-002-R13	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	9	1.8	12.5
259-H6-002-R24	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		3.8	
259-H6-002-R36	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		5.1	
259-H6-002-R13/24	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		1.5	
259-H6-002-R13/36	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		1.8	
259-H6-002-R24/36	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		7.6	
259-H6-002-R13/24/36	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		0.8	6.2

nt.:ヌクレオチドの数

APM: アプタマー SPM: シュビーグラーマー

□で線取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

G、C、TおよびAのいずれかは2-デオキシリボヌクレオチドである

PD(SPM): アプタマー(D-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化D-グルカゴンへの直接的結合または非ピオチン化D-グルカゴンとの結合を使用したブルダウんアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

Biocore(SPM): シュビーグラーマー(L-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化L-グルカゴンへの直接的結合を使用して、ピオコアで表面プラズモン共振として測定されるシユビーグラーマー(L-核酸)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビーグラーマーとして試験した

図 6A

【図 6 B】

B型のグルカゴン結合核酸分子:259-H6-002およびその誘導体

化合物	nt.	配列: 5'→3'	Comp (APM)	PD (APM) K ₀ [nM]	ピオコア (SPM) K ₀ [nM]	CHO GR IC ₅₀ [nM]
259-H6-002	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC		57	12.3	176
259-H6-002-R13	46	ACTCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	=	9	1.8	12.5
259-H6-005-R12	44	GTCCAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	+			
259-H6-009-R12	44	TCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<			
259-H6-010-R12	44	TCCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	=			
259-H6-011-R12	44	GCCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	<			
259-H6-012-R12	44	GCCGAGGGAAGGTTGGTAAAGGTTCCGTTGGATTCTCTCGAGTC	=			

nt.:ヌクレオチドの数

APM: アプタマー SPM: シュビーグラーマー

□で線取られたヌクレオチドは、グルカゴン結合モチーフを表す

G、C、TおよびAのいずれかは2-デオキシリボヌクレオチドである

Comp(APM): 示される配列を有する分子を、参照259-H6-002-R13に対するブルダウん結合アッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

=参照と類似の結合親和性、+参照よりも良好な結合親和性、<参照よりも弱い結合親和性

PD(APM): アプタマー(D-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化D-グルカゴンへの直接的結合または非ピオチン化D-グルカゴンとの結合を使用したブルダウんアッセイにおいてアプタマー(D-核酸)として測定した

Biocore(SPM): シュビーグラーマー(L-核酸)の解離定数K₀。示される配列を有する分子を、ピオチン化L-グルカゴンへの直接的結合を使用して、ピオコアで表面プラズモン共振として測定されるシユビーグラーマー(L-核酸)として試験した

CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。示される配列を有する分子を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いてシユビーグラーマーとして試験した

図 6B

【図 10】

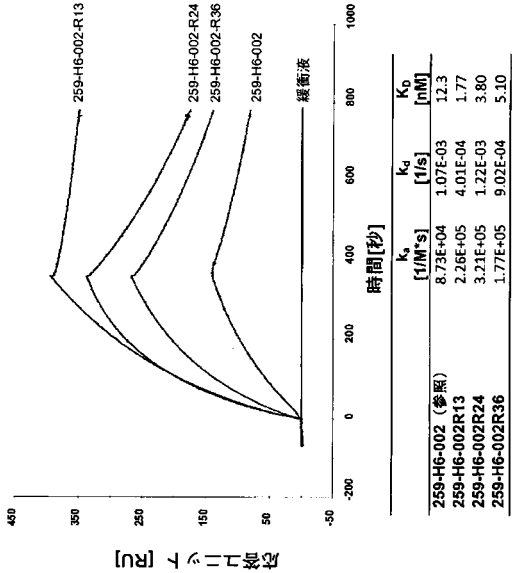


図 10

【図 11】

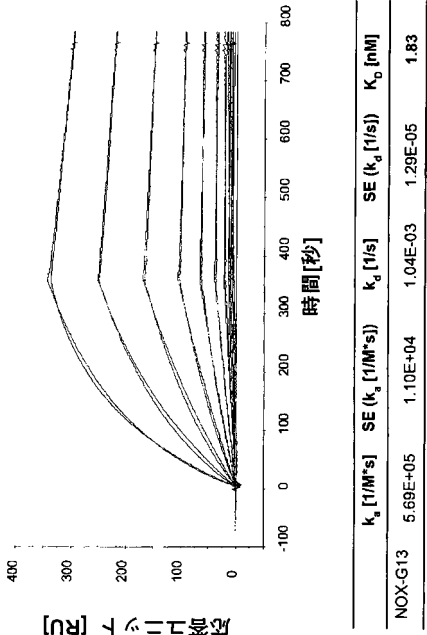


図 11

【図 12】

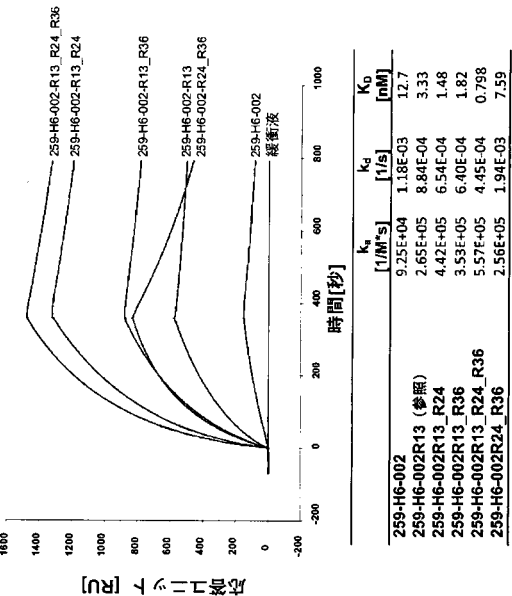


図 12

【図 13】

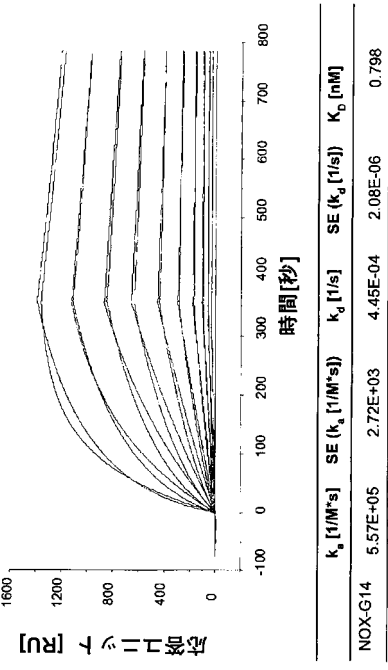


図 13

【図 1 4】

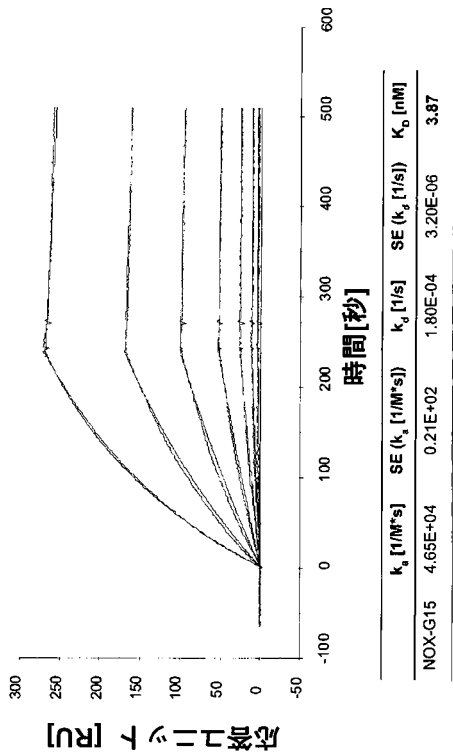


図 14

【図 1 5】

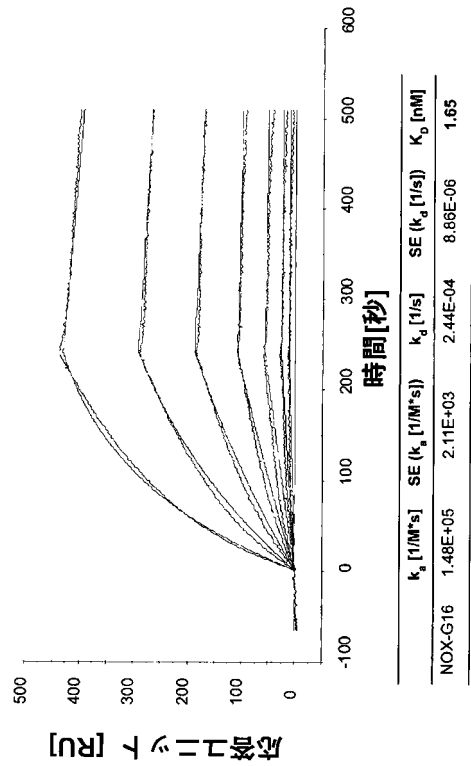


図 15

【図 1 6】

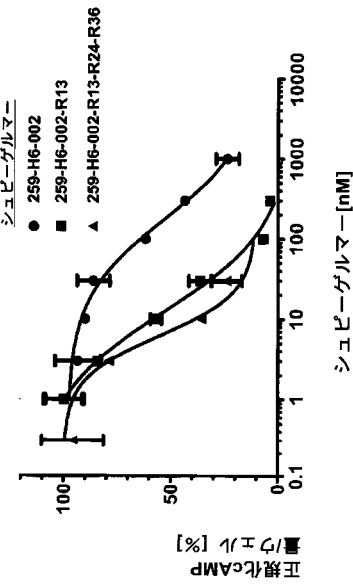


図 16

【図 1 7】

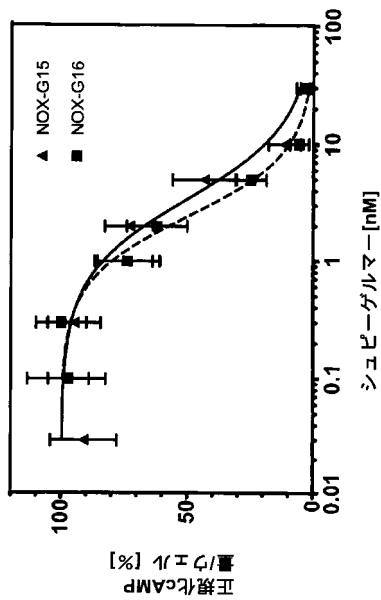


図 17

【図 18】

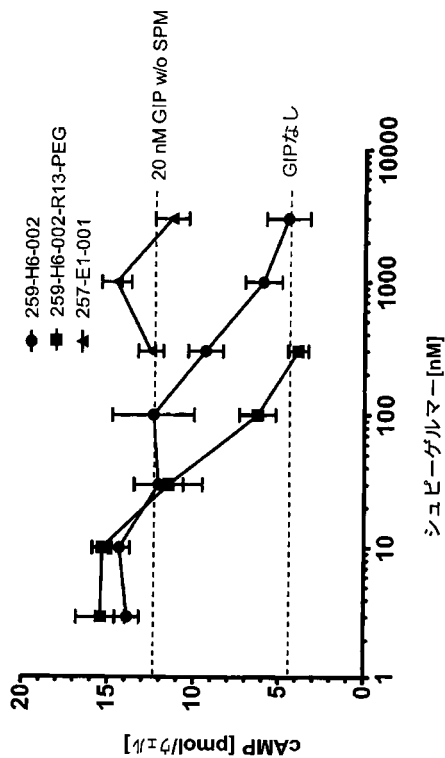


図 18

【図 19 A】

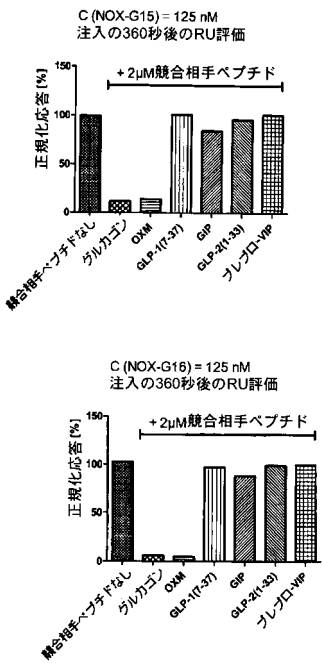


図 19A

【図 19 B】

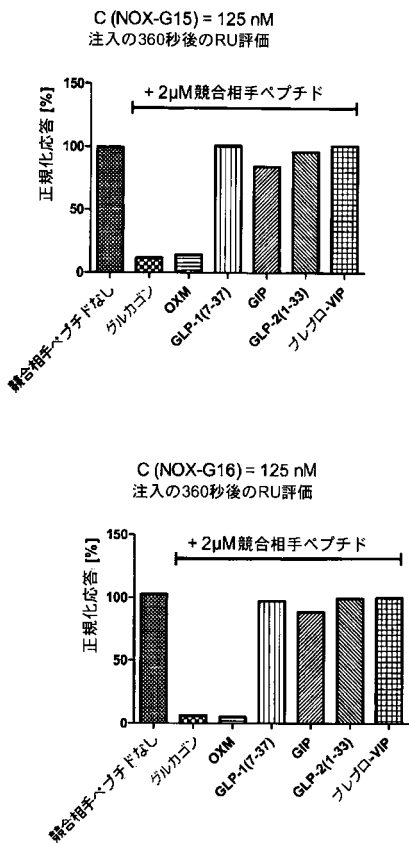


図 19B

【図 20 A】

化合物	グルカゴン		グルカゴン依存性 インスリン分泌性ペプチド (GIP)	
	Comp K _d [nM]	ピオコア (SPM) IC ₅₀ [nM]	Comp (SPM) K _d [nM]	ピオコア (SPM) IC ₅₀ [nM]
257-E1-6XR-001	5.4*	n	n.c.*	n.c.
257-E1-7XR-037	4.2*	2	n.c.*	n.c.
257-E1-6XR-030-5'-PEG (NOX-G15)	7.5**	3.4	n.c.	>300
257-E1-7XR-037-5'-PEG (NOX-G16)	3.5***	2.4	n.c.	>300
259-H6-002-E13-5'-PEG (NOX-G13)	n	4.7	n	-60
259-H6-014-E12/23/35-5'-PEG (NOX-G14)	n	6.0	n	-40

Comp(SPM): シュビーグルマー(L-核糖)を、それぞれ、非ピオチン化ペプチド、または参照分子257-E1-6XR-030*および257-E1-7XR-037*に対するブルダウ融合結合アッセイにおいて試験した(ここで幾つかの分子に関して、解離定数(K_d)を決定した)
Bioactive(SPM): シュビーグルマー(L-核糖)を、通常の非ピオチン化グルカゴンまたはGIPにより融合されるピオチン化L-グルカゴンへの結合を使用して、ピオコアで試験した
CHO-GR: シュビーグルマー(L-核糖)を、グルカゴン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いて試験した
RIN-m5F: シュビーグルマーを、GIP誘導性cAMPを阻害するようにRIN-m5F細胞で試験した
n.c.: 結合ブルダウアッセイにおいて、またはピオコアではピオチン化グルカゴンに同じ親和性を示す
*: シュビーグルマーは、ピオコアでは非ピオチン化グルカゴンに同じ親和性を示す

図 20A

グルカゴン種アラインメント

ヒト
ラット
マウス
リスザル
フタ
モルモット
ウサギ
ハムスター
チンチラ
イヌ
ヒツジ
トリ
ウシ

HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT

図 22

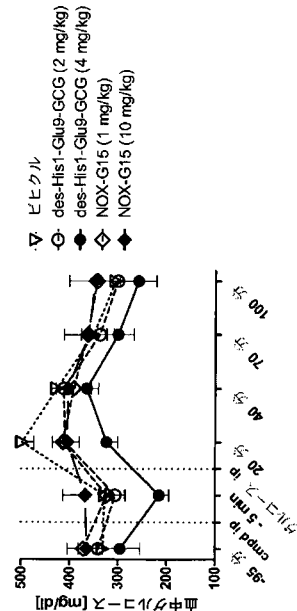


図 23A

【図 2 2 2】

化合物	グルカゴン様ペプチド (GLP-1)				GLP-2	オキシントモジュリン (OXM)		プレプロ血管作動性 (プレプロVIP) (81-122)
	Comp (SPM)	ヒアコア (SPM)	CHO GR _{comp}	ヒアコア (SPM)		ヒアコア (SPM)	CHO GR _{IC₅₀} (nM)	
257-E1-6XR-001	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
257-E1-7XR-037	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
257-E1-6XR-G30-5'-PEG (NOX-G15)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
257-E1-7XR-G37-5'-PEG (NOX-G16)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
259-H6-002-R13-5'-PEG (NOX-G13)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
259-H6-014-R12/23/35-5'-PEG (NOX-G14)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Comp(SPM): シュビーグルマー(L-核糖)を、非ヒオチン化ペプチドGLP-1に対するフルダゲン結合アッセイにおいて試験した
Biacore(SPM): シュビーグルマー(L-核糖)を、過剰の非ヒオチン化GLP-1、GLP-2、OXMまたはプレプロVIP(81~122)により結合されるヒオチン化グルカゴンへの結合を使用して、ヒアコアで試験した
CHO GR: 最大半量の阻害濃度(IC50)。シュビーグルマー(L-核糖)を、オキシントモジュリン誘導性cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いて試験した
CHO GR_{comp}: シュビーグルマーを、グルカゴン様物質cAMP形成を阻害するようにヒトグルカゴン受容体で安定にトランスフェクトされたCHO細胞を用いて試験されたのに対して、過剰のGLP-1またはプレプロVIP(81~122)は、シュビーグルマー結合に関してグルカゴンと結合して、グルカゴン誘導性cAMP形成の阻害を消滅させた
n.c.: 結合フルダゲンアッセイにおいて、またはヒアコアではヒオチン化グルカゴンへのシュビーグルマー結合の阻害なし、グルカゴン誘導性cAMP形成に対するシュビーグルマー作用の阻害なし
**シュビーグルマーは、ヒアコアでは非ヒオチン化グルカゴンに同じ親和性を示す

図 20B

以下の8つの鎖へ切断されるグルカゴン前駆物質

1. グリセニン
2. グリセニン関連ポリペプチド、省略名=GRPP
3. オキシントモジュリン、省略名=OXY、省略名=OXM
4. グルカゴン
5. グルカゴン様ペプチド 1、省略名=GLP-1
6. グルカゴン様ペプチド 1(7-37)、省略名=GLP-1(7-37)
7. グルカゴン様ペプチド 1(7-36)、省略名=GLP-1(7-36)
8. グルカゴン様ペプチド 2、省略名=GLP-2

グリセニン RSLQDTEKSRFSASQADPLSDPDQMNEDXHSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNTKRNNTA
GRPP RSLQDTEKSRFSASQADPLSDPDQMNED
OXY/OXM HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNTKRNNTA
グルカゴン HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLNT
GLP-1 HDEFERHAGTFTSDYSKYLEGQAA-KEFTAMLVKGRG
GLP-1(7-37) HDEFERHAGTFTSDYSKYLEGQAA-KEFTAMLVKGRG
GLP-1(7-36) HDEFERHAGTFTSDYSKYLEGQAA-KEFTAMLVKGRG
GLP-2 HDEFERHAGTFTSDYSKYLEGQAA-KEFTAMLVKGRG
GIP HDEFERHAGTFTSDYSKYLEGQAA-KEFTAMLVKGRG
腸管ペプチド YARGTFISDYSLMDKTHQ-QDFVNWLLAQKGGKNNWKNHTQ
プレプロVIP (81-122) HADGVFTSDFSKLLQQLSA-KKYLESLMGKRVSSNSIDPVPV
腸管ペプチド PHW-42/ PHW-27 HADGVFTSDFSKLLQQLSA-KKYLESLMGKRVSSNSIDPVPV

図 21

【図 2 3 A】

【図 2 0 B】

【図 2 1】

【図 2 3 B】

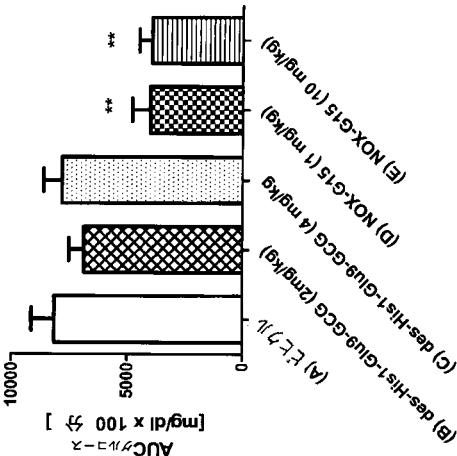


図 23B

【図 2 4 A】

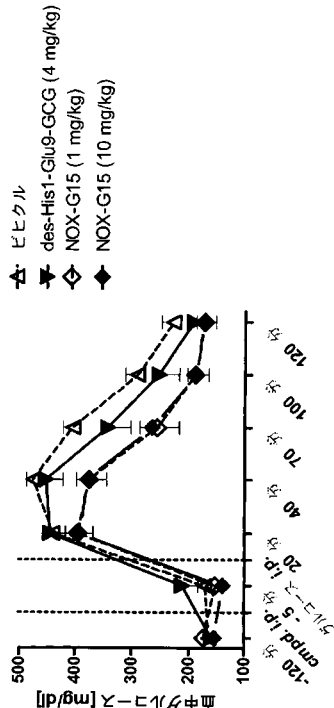


図 24A

【図 2 4 B】

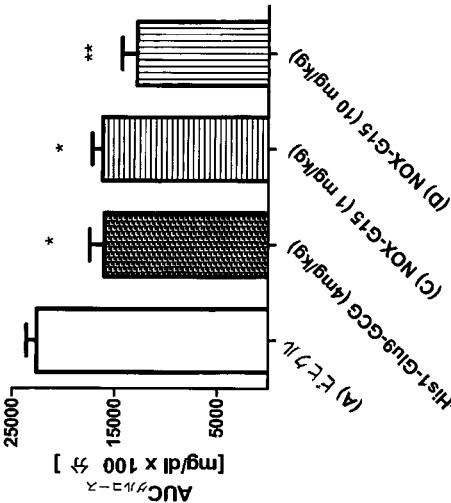


図 24B

【図 2 5 A】

化合物	配列: 5' ->3'	K ₀ (SPM) [nM]
NOX-G11-1stabl2	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	55.7
NOX-G11-D05	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	18.1
NOX-G11-D07	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	12.2
NOX-G11-D15	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	22.0
NOX-G11-D16	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	17.3
NOX-G11-D19	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	15.5
NOX-G11-D20	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	29.4
NOX-G11-D21	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	11.2
NOX-G11-D22	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	14.6
NOX-G11-D23	CAGACGGUGUGUGGUAAGUAGCACCUCGCGAUUCGCUAAAAAGUGCCACACGUCUG	27.4

dG, dC, dTおよびUのいずれかは2-デオキシリボヌクレオチドである。G, A, CおよびUのいずれかはリボヌクレオチドである。シュベールマーの解離定数K₀を、固定化ヒトグルカゴンへの直接結合を測定して、ヒトコアで表面プラズモン共鳴として測定した。SPM: シュベールマー

図 25A

【図 25 B】

化合物	配列: 5' ->3'	K _D (SPM) [nM]
NOX-G11stab12	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	55.7
NOX-G11-D24	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	22.5
NOX-G11-D25	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	27.2
NOX-G11-D26	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	22.0
NOX-G11-D27	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	25.3
NOX-G11-D46	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	23.9
NOX-G11-D48	CAGACGUGUGUGGUGAUGACACGUGCGAUUCCGUAUAAAAGUCCACACGUCUG	33.8

dG, dC, dTおよびdAのいずれかは2'-デオキシリボスクレオチドである G, A, CおよびUのいずれかはリボスクレオチドである
 シュビーグレルマーの解離定数K_Dを、固定化ヒトグルカゴンへの直接的結合を使用して、ピアコアで表面プラズモン共鳴として測定した
 SPM: シュビーグレルマー

図 25B

【図 26】

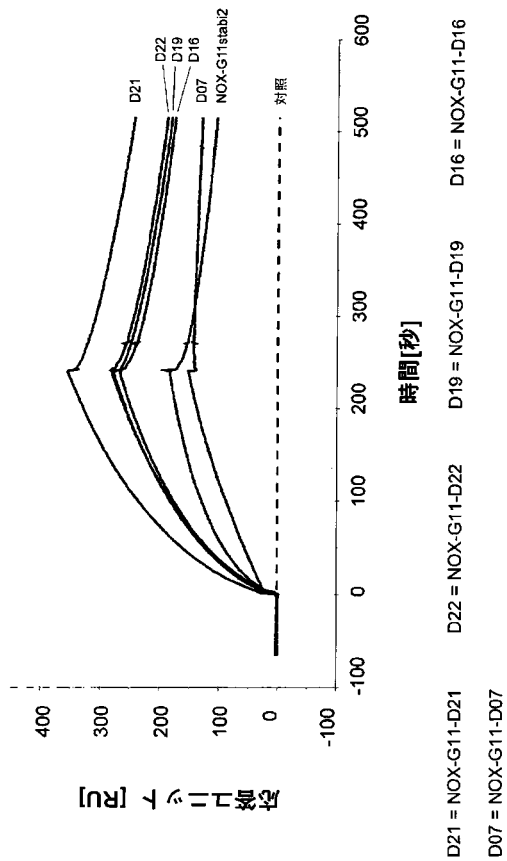


図 26

【図 27 A】

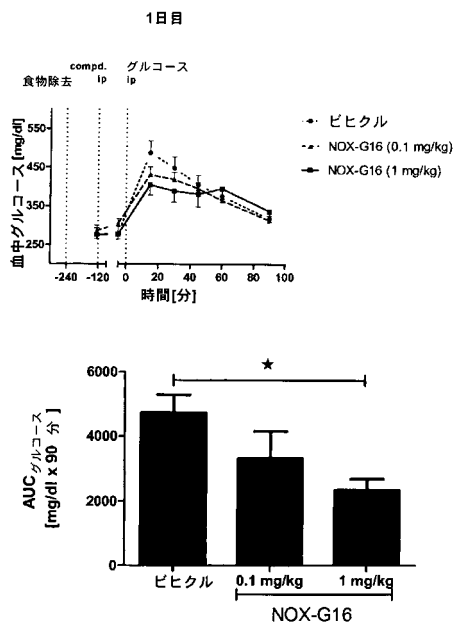


図 27A

【図 27 B】

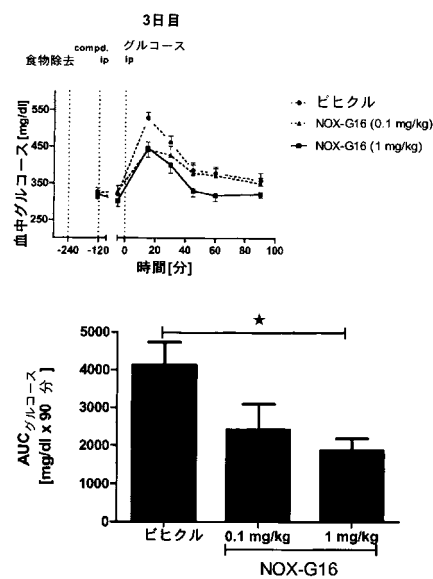


図 27B

【図 27 C】

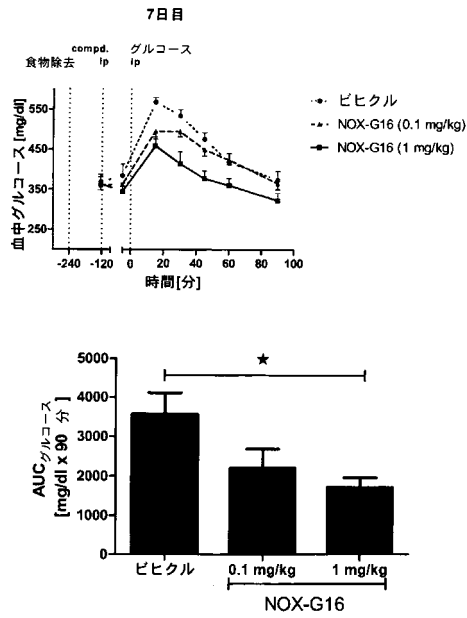


図 27C

【図 28】

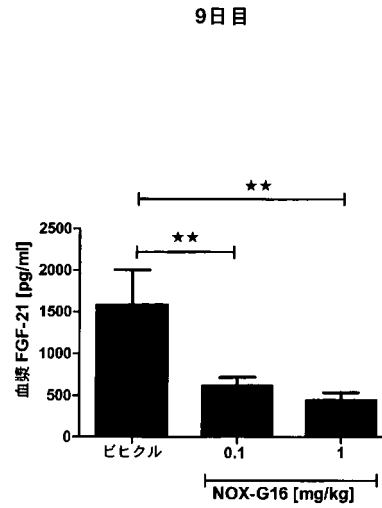
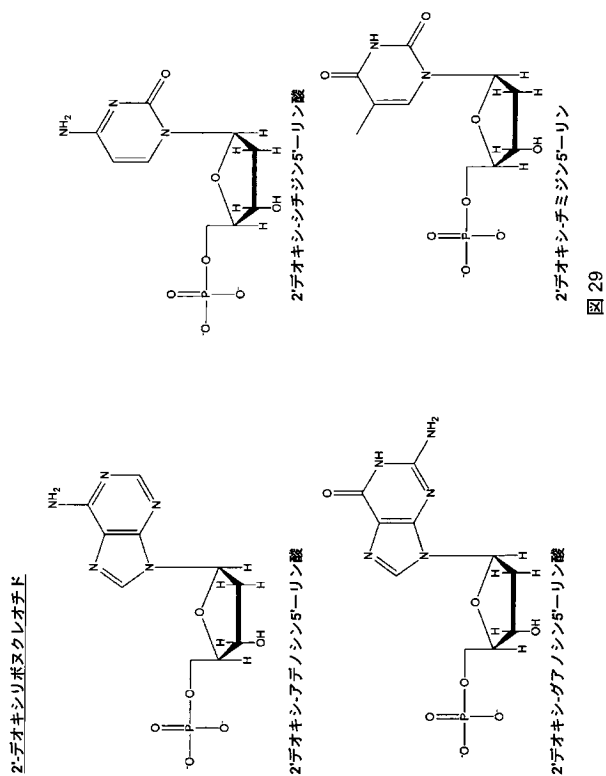
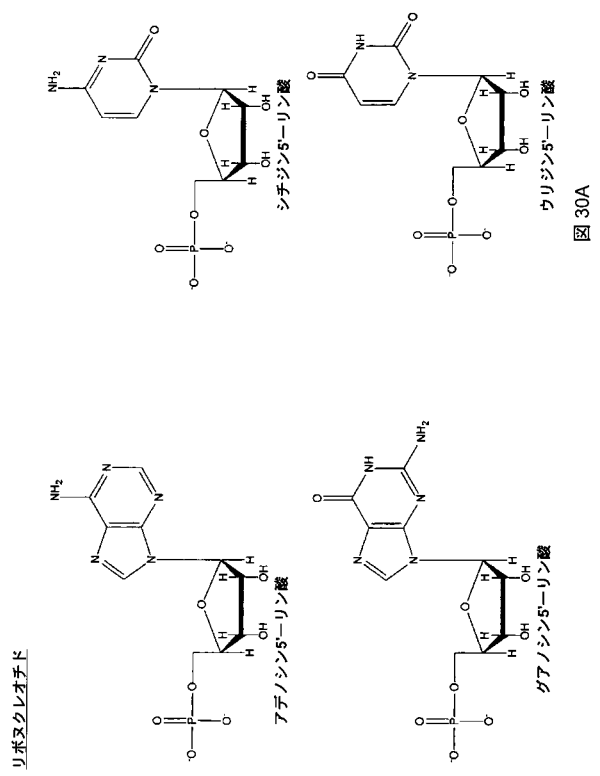


図 28

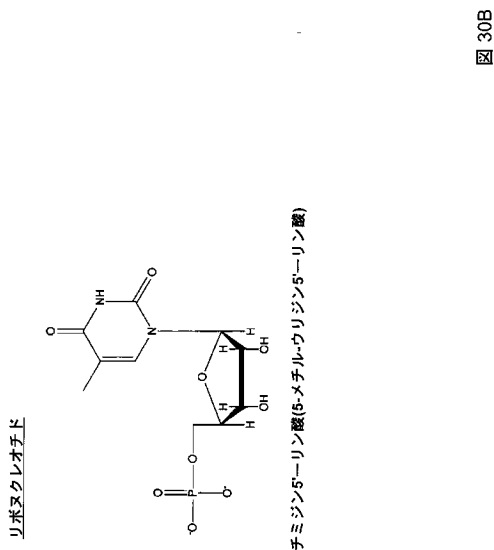
【図 29】



【図 30 A】



【図 30 B】



【配列表】

2014533098000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成26年6月26日(2014.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

グルカゴンに結合することが可能なL-核酸分子であって、A型のL-核酸分子、B型のL-核酸分子およびC型のL-核酸分子からなる群から選択され、

前記A型のL-核酸分子が中央のヌクレオチドストレッチを含み、前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' B n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A K G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T R R R 3' [配列番号173] のヌクレオチド配列を含み、

式中、n₁はGまたはr Gであり、n₂はGまたはr Gであり、n₃はGまたはr Gであり、n₄はGまたはr Gであり、n₅はYまたはr Tであり、n₆はAまたはr Aであり、n₇はAまたはr Aであり、

G、A、T、C、B、K、YおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Tのいずれかはリボヌクレオチドであり、

前記B型のL-核酸分子が中央のひと続きの29～32ヌクレオチドを含み、前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' - A K G A R n₁ K G T T G S Y A W A n₂ R T T C G n₃ T T G G A n₄ T C n₅ - ' 3 [配列番号 197]、

5' - A G A A G G T T G G T A A G T T T C G G T T G G A T C T G - ' 3 [配列番号 198]、

5' - A G A A G G T C G G T A A G T T T C G G T A G G A T C T G - ' 3 [配列番号 199]、

5' - A G G A A G G T T G G T A A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 200]、

5' - A G G A A A G G T T G G T A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 201] および

5' - A G G A A G G T T G G T A A G G T T C G G T T G G A T T C A - ' 3 [配列番号 202]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

式中、n₁はAまたはrAであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はTまたはrUであり、n₅はAまたはrAであり、

G、A、T、C、K、Y、S、WおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

rG、rAおよびrUのいずれかはリボヌクレオチドであり、

前記C型のL-核酸分子は、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

前記C型のL-核酸分子は、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含むL-核酸分子と少なくとも85%の同一性を有するか、または

前記C型のL-核酸分子は、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号97および配列番号102の群から選択されるヌクレオチド配列を含むL-核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも85%である、L-核酸分子。

【請求項2】

前記A型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' B n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A R 3' [配列番号 174] のヌクレオチド配列を含み、

式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGであり、n₄はGまたはrGであり、n₅はTまたはrTであり、n₆はAまたはrAであり、n₇はAまたはrAであり、

G、A、T、C、BおよびRのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

rG、rAおよびrTのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項1に記載のL-核酸分子。

【請求項3】

前記A型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 175]、

5' T n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A A 3' [配列番号 176]、

5' C n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 177]、および

5' G n₁ A A A T G n₂ G A n₃ n₄ G C T A G G n₅ G G n₆ n₇ G G A A T C T G A G 3' [配列番号 178]、

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

式中、n₁はGまたはrGであり、n₂はGまたはrGであり、n₃はGまたはrGで

あり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r T のいずれかは リボヌクレオチド である、請求項 1 または 2 に記載の L-核酸分子。

【請求項 4】

前記 A 型の L-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' G n_1 A A A T G n_2 G A n_3 n_4 G C T A G G n_5 G G n_6 n_7 G G A A T C T G A G 3' [配列番号 178] のヌクレオチド配列を含み、

式中、 n_1 は G または r G であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r T のいずれかは リボヌクレオチド である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 5】

前記 A 型の L-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' C n_1 A A A T G n_2 G A n_3 n_4 G C T A G G n_5 G G n_6 n_7 G G A A T C T G A G 3' [配列番号 177] のヌクレオチド配列を含み、

式中、 n_1 は G または r G であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は G または r G であり、 n_5 は T または r T であり、 n_6 は A または r A であり、 n_7 は A または r A であり、

G、A、T および C は 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r A および r T は リボヌクレオチド である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 6】

前記 A 型の L-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドおよび リボヌクレオチド からなる、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 7】

前記 A 型の L-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5' G r G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 179]、

5' G G A A A T G r G G A G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 180]、

5' G G A A A T G G G A r G G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 181]、

5' G G A A A T G G G A G r G G C T A G G T G G A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 182]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 183]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 184]；

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 185]、

5' G G A A A T G G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 186]、

5' G G A A A T G r G G A G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3' [配列番号 187]、

5' G G A A A T G G G A r G G G C T A G G T G G r A r A G G A A T C T G A G 3'

’ [配列番号188]、

5' GrGAAATGrGGArGGGCTAGGTGGrArAGGAATCTGA
G3' [配列番号189]、

5' GrGAAATGrGGArGrGGCTAGGTGGrArAGGAATCTG
AG3' [配列番号190] および

5' GrGAAATGrGGArGrGGCTAGGrTGGrArAGGAATCT
GAG3' [配列番号191]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

式中、G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

rG、rAおよびrTのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項1～6のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項8】

前記A型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項1～5のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項9】

前記A型のL-核酸分子が、5'→3'方向に、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは1～7ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは1～7ヌクレオチドを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項10】

前記A型のL-核酸分子が、5'→3'方向に、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第1の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは1～7ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは1～7ヌクレオチドを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項11】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

Z₁はGであるかまたは存在せず、Z₂はSであるかまたは存在せず、Z₃はVであるかまたは存在せず、Z₄はBであるかまたは存在せず、Z₅はBであるかまたは存在せず、Z₆はVであるかまたは存在せず、Z₇はBであるかまたは存在せず、Z₈はVであるかまたは存在せず、Z₉はVであるかまたは存在せず、Z₁₀はBであるかまたは存在せず、Z₁₁はSであるかまたは存在せず、Z₁₂はCであるかまたは存在しない、請求項9または10に記載のL-核酸分子。

【請求項12】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ V 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z₁はGであり、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBであり、Z₆はVであり、Z₇はBであり、Z₈はVであり、Z₉はVであり、Z₁₀はBであり、Z₁₁はSであり、Z₁₂はCであるか、または

b) Z₁は存在せず、Z₂はSであり、Z₃はVであり、Z₄はBであり、Z₅はBで

あり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は C であるか、または

c) Z_1 は G であり、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、

a) Z_1 は G であり、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は C であるか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は C であるか、または

c) Z_1 は G であり、 Z_2 は C であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は R であり、 Z_7 は Y であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は Y であり、 Z_{11} は G であり、 Z_{12} は存在しない、

請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 13】

a) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A C T G A 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A G T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' T C A C T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T A C T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G C T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C A G T G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G C C A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' T C G G C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 12 に記載の L-核酸分子。

【請求項 14】

前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B

であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は S であり、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は G であり、 Z_5 は Y であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は R であり、 Z_9 は C であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は S であり、 Z_{12} は存在しない、

請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 15】

a) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T G C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C G C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G G G C C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G G C C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G C C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G G C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G A G C G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C G C T C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G T G G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C C A C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

g) 前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C G T C G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C G A C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 14 に記載の L-核酸分子。

【請求項 16】

前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ V 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は B であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は V であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存

在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ 'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はVであり、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 はVであり、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} はBであり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項9～11のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項17】

a) 前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $G G C G G 3$ 'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C C G C C 3$ 'のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C G C G G 3$ 'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C C G C G 3$ 'のヌクレオチド配列を含む、

請求項16に記載のL-核酸分子。

【請求項18】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $B Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ 'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はVであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3$ 'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 はGであり、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存

在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はYであり、 Z_6 はGであり、 Z_7 はYであり、 Z_8 はRであり、 Z_9 はCであり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、
請求項9～11のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項19】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C C G C 3'のヌクレオチド配列を含む、
請求項18に記載のL-核酸分子。

【請求項20】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はBであり、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はVであり、 Z_7 はBであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はSであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はSであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はSであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項9～11のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項21】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' G C G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G C 3'のヌクレオチド配列を含む、
請求項20に記載のL-核酸分子。

【請求項22】

前記A型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 V$ 3'のヌクレオチド配列を含み、前記A型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' B $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は V であり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は B であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

d) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G$ 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 A 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} C$ 3' のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は G であり、 Z_7 は C であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 2 3】

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L-核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、または

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 6 および配列番号 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L-核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 85% である、請求項 1～5 および 8～22 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 2 4】

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 2 3、配列番号 4 3、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 1 5 8 および配列番号 1 5 9 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 2 3、配列番号 4 3、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 1 5 8 および配列番号 1 5 9 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L-核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有するか、または

前記 A 型の L-核酸分子が、配列番号 4 3、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 1 5 8 および配列番号 1 5 9 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L-核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 85% である、請求項 1～7 および 9～22 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 2 5】

前記 B 型の L-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、
5' $AGGAAn_1GGTTGGTAAAn_2GTTTCGn_3TTGGAn_4TCn_5$ 3'
[配列番号 2 0 3] のヌクレオチド配列を含み、式中、

n_1 は A または r A であり、 n_2 は G または r G であり、 n_3 は G または r G であり、 n_4 は T または r U であり、 n_5 は A または r A であり、

G、A、T および C のいずれかは 2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Uのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項1に記載のL-核酸分子。

【請求項26】

前記B型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドからなる、請求項1または25に記載のL-核酸分子。

【請求項27】

前記B型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号204]、

5'AGGAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号205]、

5'AGGAAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGArUTCA3' [配列番号206]、

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGATTCA3' [配列番号207]、

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGArUTC3' [配列番号208]、

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGArUTCA3' [配列番号209]、

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGGTTGGArUTCA3' [配列番号210] および

5'AGGAARAGGTTGGTAAGGTTTCGrGTTGGArUTCRA3' [配列番号211]、

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、式中、

G、A、TおよびCのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

r G、r Aおよびr Uのいずれかはリボヌクレオチドである、請求項25または26に記載のL-核酸分子。

【請求項28】

前記B型のL-核酸分子の前記中央のヌクレオチドストレッチが、2'-デオキシリボヌクレオチドからなる、請求項1または25に記載のL-核酸分子。

【請求項29】

前記B型のL-核酸分子の前記L-核酸分子が、5'→3'方向に、第1の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第2の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む、請求項1および25～28のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項30】

前記B型のL-核酸分子の前記L-核酸分子が、5'→3'方向に、第2の末端のヌクレオチドストレッチ、前記中央のヌクレオチドストレッチおよび第1の末端のヌクレオチドストレッチを含み、

前記第1の末端のヌクレオチドストレッチは3～9ヌクレオチドを含み、

前記第2の末端のヌクレオチドストレッチは3～10ヌクレオチドを含む、請求項1および25～28のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項31】

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5'Z₁Z₂Z₃Z₄Z₅Z₆SAK3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5'CKVZ₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

Z_1 はCであるかまたは存在せず、 Z_2 はGであるかまたは存在せず、 Z_3 はRであるかまたは存在せず、 Z_4 はBであるかまたは存在せず、 Z_5 はBであるかまたは存在せず、 Z_6 はSであるかまたは存在せず、 Z_7 はSであるかまたは存在せず、 Z_8 はVであるかまたは存在せず、 Z_9 はVであるかまたは存在せず、 Z_{10} はKであるかまたは存在せず、 Z_{11} はMであるかまたは存在せず、 Z_{12} はSであるかまたは存在しない、請求項29または30に記載のL-核酸分子。

【請求項32】

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} はSであるか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} はSであるか、または

c) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はBであり、 Z_5 はBであり、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 はNであり、 Z_{10} はKであり、 Z_{11} はMであり、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} はCであり、 Z_{12} はGであるか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} はCであり、 Z_{12} はGであるか、または

c) Z_1 はCであり、 Z_2 はGであり、 Z_3 はRであり、 Z_4 はCであり、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 はGであり、 Z_{10} はTであり、 Z_{11} はCであり、 Z_{12} は存在しない、

請求項29～31のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項33】

a) 前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G A C T C G A G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T C G A G T C G 3'のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' C G G C T C G A G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C T C G A G T C G 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項32に記載のL-核酸分子。

【請求項34】

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3'のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は G であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は K であり、 Z_{11} は M であり、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は G であり、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は K であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は K であり、 Z_{11} は M であり、 Z_{12} は存在しない、

請求項 29～31 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 35】

前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は K であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は R であり、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は K であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は A であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は A であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は A であり、 Z_4 は C であり、 Z_5 は T であり、 Z_6 は C であり、 Z_7 は G であり、 Z_8 は A であり、 Z_9 は G であり、 Z_{10} は T であり、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項 29～31 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 36】

前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B で

あり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は N であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T S $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は V であり、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は B であり、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は S であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項 29～31 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 37】

a) 前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' T G C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G C A 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G G C C A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T G G C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' G C C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C T C G A G 3' のヌクレオチド配列を含む、

請求項 36 に記載の L-核酸分子。

【請求項 38】

前記 B 型の L-核酸分子の前記第 1 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6$ S A K 3' のヌクレオチド配列を含み、前記 B 型の L-核酸分子の前記第 2 の末端のヌクレオチドストレッチが 5' C K V $Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12}$ 3' のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は V であり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は B であり、 Z_6 は S であり、 Z_7 は S であり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存

在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 はVであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在せず、

好ましくは、前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G A G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C T C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 はTであり、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はCであり、 Z_7 はGであり、 Z_8 はAであり、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項29～31のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項39】

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 S A K 3'$ のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C K V Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、

式中、

a) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

b) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 はSであり、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

c) Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 はSであり、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、

請求項29～31のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項40】

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 S A K 3'$ のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C K V Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、

式中、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しないか、または

前記B型のL-核酸分子の前記第1の末端のヌクレオチドストレッチが5' $Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 G A G 3'$ のヌクレオチド配列を含み、前記B型のL-核酸分子の前記第2の末端のヌクレオチドストレッチが5' $C T C Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} 3'$ のヌクレオチド配列を含み、

式中、 Z_1 は存在せず、 Z_2 は存在せず、 Z_3 は存在せず、 Z_4 は存在せず、 Z_5 は存在せず、 Z_6 は存在せず、 Z_7 は存在せず、 Z_8 は存在せず、 Z_9 は存在せず、 Z_{10} は存在せず、 Z_{11} は存在せず、 Z_{12} は存在しない、請求項29～31のいずれか1項に記載のL-核酸分子。

【請求項 4 1】

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 5 0、配列番号 5 4、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 8 8 および配列番号 1 5 5 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 5 0、配列番号 5 4、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 8 8 および配列番号 1 5 5 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L－核酸分子と少なくとも 8 5 % の同一性を有するか、または

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 5 0、配列番号 5 4、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 8 8 および配列番号 1 5 5 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L－核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 8 5 % である、請求項 1、2 5～2 7 および 2 9～4 0 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 2】

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 7 1、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 1 5 6 および配列番号 1 5 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 7 1、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 1 5 6 および配列番号 1 5 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L－核酸分子と少なくとも 8 5 % の同一性を有するか、または

前記 B 型の L－核酸分子が、配列番号 7 1、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 1 5 6 および配列番号 1 5 7 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む L－核酸分子と相同的であり、相同性は少なくとも 8 5 % である、請求項 1、2 5～2 7 および 2 9～4 0 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 3】

前記核酸分子がグルカゴンによって仲介される活性のアンタゴニストである、請求項 1～4 2 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 4】

前記 L－核酸分子が G I P に結合することが可能である、請求項 1～4 3 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 5】

G I P によって仲介される活性のアンタゴニストである、請求項 1～4 4 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 6】

前記 L－核酸分子が修飾基を含み、前記修飾基を含む前記 L－核酸分子の生物体からの排泄速度は、前記修飾基を含まない L－核酸分子と比較して低減される、請求項 1～4 5 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 7】

前記 L－核酸分子が修飾基を含み、前記修飾基を含む前記 L－核酸分子が、前記修飾基を含まない L－核酸分子と比較して生物体内において増加した保持時間を有する、請求項 1～4 5 のいずれか 1 項に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 8】

前記修飾基が生分解性および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは、前記修飾基が、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分枝ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ（2－ヒドロキシエチル）－L－グルタミンを含む群から選択される、請求項 4 6 または 4 7 に記載の L－核酸分子。

【請求項 4 9】

前記修飾基が、直鎖ポリエチレングリコールまたは分枝ポリエチレングリコールからなるポリエチレングリコールであり、前記ポリエチレングリコールの分子量は、好ましくは約 2 0, 0 0 0～約 1 2 0, 0 0 0 D a、より好ましくは約 3 0, 0 0 0～約 8 0, 0 0 0 D a、最も好ましくは約 4 0, 0 0 0 D a である、請求項 4 8 に記載の L－核酸分子。

【請求項 50】

前記修飾基がヒドロキシエチルデンブレンであり、前記ヒドロキシエチルデンブレンの分子量は、約 50 kDa～約 1000 kDa、より好ましくは約 100 kDa～約 700 kDa、最も好ましくは 300 kDa～500 kDa である、請求項 48 に記載の L-核酸分子。

【請求項 51】

前記修飾基が、リンカーを介して前記 L-核酸分子に結合しており、好ましくは、前記リンカーは生分解性リンカーである、請求項 46～50 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 52】

前記修飾基が、前記 L-核酸分子の 5' 末端ヌクレオチドおよび／もしくは 3' 末端ヌクレオチドに、ならびに／または前記 L-核酸分子の 5' 末端ヌクレオチドと前記 L-核酸分子の 3' 末端ヌクレオチドの間の前記 L-核酸分子のヌクレオチドに結合している、請求項 46～50 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 53】

前記生物体が動物またはヒト生体、好ましくはヒト生体である、請求項 46～52 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 54】

疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のための方法に使用される、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子。

【請求項 55】

前記疾患または障害が、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される、請求項 54 に記載の L-核酸分子。

【請求項 56】

前記糖尿病が、1 型糖尿病、2 型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される、請求項 55 に記載の L-核酸分子。

【請求項 57】

前記糖尿病合併症または糖尿病状態が、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能の存在下での静脈血栓、および神経精神医学的徴候の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である、請求項 56 に記載の L-核酸分子。

【請求項 58】

請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子および任意選択的にさらなる構成要素を含み、前記さらなる構成要素は、薬学的に許容される添加剤、薬学的に許容される担体および薬学的に活性な薬剤を含む群から選択される、医薬組成物。

【請求項 59】

請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子および薬学的に許容される担体を含む、請求項 58 に記載の医薬組成物。

【請求項 60】

医薬の製造のための、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の使用。

【請求項 61】

前記医薬がヒト医療用、または獣医医療用である、請求項 60 に記載の使用。

【請求項 62】

診断手段の製造のための、請求項 1～53 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の使用

。

【請求項 6 3】

前記医薬が、疾患または障害または高グルカゴン血症の処置および／または予防のためであり、前記疾患または障害が、糖尿病、糖尿病合併症および糖尿病状態を含む群から選択される、請求項 6 0 に記載の使用。

【請求項 6 4】

前記糖尿病が、1 型糖尿病、2 型糖尿病および妊娠性糖尿病を含む群から選択される、請求項 6 3 に記載の使用。

【請求項 6 5】

前記糖尿病合併症または糖尿病状態が、アテローム硬化症、冠状動脈疾患、糖尿病性足疾患、糖尿病網膜症、増殖性糖尿病網膜症、糖尿病性黄斑浮腫、糖尿病性硝子体網膜症、増殖性糖尿病性硝子体網膜症、糖尿病腎症、糖尿病神経障害、グルコース不耐性、心疾患、高血圧、高コレステロール、耐糖能異常、不能症、インスリン抵抗性、腎不全、メタボリックシンドローム、非アルコール性脂肪肝疾患、線維症が有るか無い非アルコール性脂肪肝炎、末梢血管疾患、低減したグルコース感受性、低減したインスリン感受性、肥満、肝脂肪変性、高血糖、糖尿病関連脈管炎、糖尿病ケトアシドーシス、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、体重減少壊死融解性移動性紅斑、貧血、正常な凝固機能および神経精神医学的徴候の存在下での静脈血栓の群から選択される糖尿病合併症または糖尿病状態である、請求項 6 3 に記載の使用。

【請求項 6 6】

請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子およびグルカゴンおよび／または G I P を含み、好ましくは結晶性複合体である複合体。

【請求項 6 7】

グルカゴンおよび／または G I P の検出のための、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の使用。

【請求項 6 8】

グルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストのスクリーニング方法であって、

グルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性の候補アンタゴニストを用意するステップと、

請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子を用意するステップと、

グルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を用意するステップと、

グルカゴンおよび／または G I P によって仲介される前記活性の前記候補アンタゴニストがグルカゴンおよび／または G I P によって仲介される活性のアンタゴニストであるかどうか判定するステップと

を含む方法。

【請求項 6 9】

請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子を含む、グルカゴンの検出のためのキット。

【請求項 7 0】

試料中の請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸の検出方法であって、

a) 請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブ、あるいは、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的である捕捉プローブ、および請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的である検出プローブを用意するステップと、

b) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、別々にまたは一緒に、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の L-核酸分子を含有する試料に加えるか、または請求項 1 ～ 5

3のいずれか1項に記載のL-核酸分子を含有すると推定される試料に加えるステップと、

c) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項1～53のいずれか1項に記載のL-核酸分子またはその一部と同時に、または任意の順序で逐次的に反応させるステップと、

d) 任意選択的に、前記捕捉プローブが、ステップa)で提供される請求項1～53のいずれか1項に記載のL-核酸分子とハイブリダイズするかどうか検出するステップと、

e) 請求項1～53のいずれか1項に記載のL-核酸分子および前記捕捉プローブおよび前記検出プローブからなる、ステップc)で形成される複合体を検出するステップを含む方法。

【請求項71】

前記検出プローブが検出手段を含み、および／または前記捕捉プローブが支持体、好ましくは固体支持体に固定化されている、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

ステップe)で前記複合体の一部である検出プローブだけが検出されるように、ステップc)で形成される前記複合体の一部でないあらゆる検出プローブが前記反応から除去される、請求項70または71に記載の方法。

【請求項73】

ステップe)が、前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項1～53のいずれか1項に記載のL-核酸分子またはその一部の存在下、および前記L-核酸分子またはその一部の非存在下でハイブリダイズさせたときの、前記検出手段によって生成されるシグナルを比較するステップを含む、請求項70～72のいずれか1項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/004421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/115 A61K31/7088
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, EMBASE, EMBL, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	John Ferguson: "Nucleic Aptamer against Fibrillation of Glucagon", 16 September 2011 (2011-09-16), pages 1-7, XP55049399, Retrieved from the Internet: URL: https://docs.google.com/document/d/1lpjLDiTbj15VsZB864P9m6EXQftvdjTUCcdpQV-A/edit?hl=en_US&pli=1 [retrieved on 2013-01-11] the whole document ----- -/--	1-79

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2013

Date of mailing of the international search report

22/01/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/004421

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOSHIDA W ET AL: "Selection of DNA aptamers against insulin and construction of an aptameric enzyme subunit for insulin sensing", BIOSSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 24, no. 5, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 1116-1120, XP025868490, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/J.BIOS.2008.06.016 [retrieved on 2008-06-18] figures 1,4 -----	1-79
A	VATER A ET AL: "TOWARD THIRD-GENERATION APTAMERS: SPIEGELMERS AND THEIR THERAPEUTIC PROSPECTS", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 6, no. 2, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 253-261, XP008031617, ISSN: 1367-6733 the whole document -----	1-79
A	J. I. BAGGER ET AL: "Glucagon antagonism as a potential therapeutic target in type 2 diabetes", DIABETES, OBESITY AND METABOLISM, vol. 13, no. 11, 28 September 2011 (2011-09-28), pages 965-971, XP55049444, ISSN: 1462-8902, DOI: 10.1111/j.1463-1326.2011.01427.x the whole document -----	1-79
A	HRUBY V J ET AL: "The design and biological activities of glucagon agonists and antagonists, and their use in examining the mechanisms of glucose action", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY. IMMUNOLOGY, ENDOCRINE AND METABOLICAGENTS, XX, XX, vol. 1, no. 3, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 199-215, XP009113655, ISSN: 1568-0134 the whole document -----	1-79
A	WO 01/83527 A2 (AMGEN INC [US]) 8 November 2001 (2001-11-08) the whole document ----- -/--	1-79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/004421

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PESTOURIE C ET AL: "Aptamers against extracellular targets for in vivo applications", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 87, no. 9-10, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 921-930, XP027603334, ISSN: 0300-9084 [retrieved on 2005-09-01] page 923 -----	1-79
A	HEMLING STEFFEN ET AL: "Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 101, no. 36, 7 September 2004 (2004-09-07), pages 13174-13179, XP002321448, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0404175101 the whole document -----	1-79
X,P	WO 2012/095303 A1 (NOXXON PHARMA AG [DE]; JAROSCH FLORIAN [DE]; KLUSSMANN SVEN [DE]; SELL) 19 July 2012 (2012-07-19) examples 4-6 -----	1-79

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/004421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0183527	A2	08-11-2001	AU 5579801 A 12-11-2001
			EP 1278772 A2 29-01-2003
			JP 2003531632 A 28-10-2003
			US 2003032588 A1 13-02-2003
			WO 0183527 A2 08-11-2001

WO 2012095303	A1	19-07-2012	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	4 H 0 4 5
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M

(31)優先権主張番号 PCT/EP2012/000089

(32)優先日 平成24年1月10日(2012.1.10)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74)代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74)代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72)発明者 プルシュケ, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国, 1 3 3 5 9 ベルリン, ヴリーツェナー・シュトラッセ 3 0

(72)発明者 ゼル, ジモーネ

ドイツ連邦共和国, 1 0 1 1 9 ベルリン, ブルンネンシュトラッセ 1 8 6

(72)発明者 ファーター, アクセル

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 7 ベルリン, ヒルマンシュトラッセ 1 8 6

(72)発明者 ブッフナー, クラウス

ドイツ連邦共和国, 1 4 1 9 7 ベルリン, アスマンスハウザー・シュトラッセ 3

(72)発明者 マーシュ, クリスティアン

ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 9 ベルリン, エルンストシュトラッセ 2 7

(72)発明者 クルースマン, スヴェン

ドイツ連邦共和国, 1 0 7 0 9 ベルリン, パウルスボルナー・シュトラッセ 8 3

F ターム(参考) 2G045 DA13 DA14 FB02
4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA09 HA12
4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR48 QR55 QS32
QS34 QX01
4C076 CC21 DD70A EE23A EE26A EE30A EE38A EE41A EE59
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA14 ZC35
4H045 AA10 BA54 CA40 DA30 EA50