

(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2017-502075

(P2017-502075A)

(43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-550953 (P2016-550953)	(71) 出願人	511085275
(86) (22) 出願日	平成26年11月4日 (2014.11.4)		ノクソン ファーマ エージェ
(85) 翻訳文提出日	平成28年6月16日 (2016.6.16)		ドイツ国, 1 0 5 8 9 ベルリン, マック
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/002945		スードーン-シュトラセ 8-1 0
(87) 国際公開番号	W02015/062743	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成27年5月7日 (2015.5.7)		弁理士 高岡 亮一
(31) 優先権主張番号	13005191.5	(74) 代理人	100121511
(32) 優先日	平成25年11月4日 (2013.11.4)		弁理士 小田 直
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100202751
(31) 優先権主張番号	14001242.8		弁理士 岩堀 明代
(32) 優先日	平成26年4月3日 (2014.4.3)	(74) 代理人	100191086
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 高橋 香元
		(72) 発明者	エウルバーク, ダーク
			ドイツ国, 1 0 2 4 7 ベルリン, ノイエ
			ウェルト 1 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎障害治療の手段および方法

(57) 【要約】

本発明は、疾患を治療および／または予防する方法に使用するための C C L 2 のアンタゴニストに関するものであり、この方法は対象にアンタゴニストを投与することを含み、対象には蛋白尿が認められる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患を治療および／または予防する方法に使用する C C L 2 のアンタゴニストであって、前記方法が、対象に前記アンタゴニストを投与することを含み、前記対象に蛋白尿が認められる、C C L 2 のアンタゴニスト。

【請求項 2】

前記疾患が腎疾患である、請求項 1 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 3】

前記疾患が腎障害である、請求項 1 ～ 2 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4】

前記疾患が糖尿病性腎症である、請求項 1 ～ 3 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 5】

前記疾患が糖尿病、好ましくは真性糖尿病、より好ましくは 2 型糖尿病である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 6】

前記疾患が、心血管疾患、原発性アミロイドーシス、続発性アミロイドーシス、巣状分節性糸球体硬化症、ループス腎炎、ファブリー病、糸球体腎炎、膜性腎症、肝腎症候群、I g A 腎症、クリオグロブリン血症、多発性骨髄腫、爪膝蓋骨症候群、遺伝性腎炎、結節性多発動脈炎、シェーンライン・ヘノッホ紫斑病、A N C A 関連血管炎、ネフローゼ症候群および急速進行性糸球体腎炎である、請求項 1 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 7】

前記心血管疾患が高血圧症である、請求項 6 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 8】

前記蛋白尿が A C R（尿中アルブミン／クレアチニン比）で表される、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 9】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 m g / g、好ましくは少なくとも 8 8 m g / g である、請求項 8 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 0】

前記対象の A C R が少なくとも 1 0 0 m g / g である、請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 1】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 0 m g / g、好ましくは少なくとも 3 0 3 m g / g、より好ましくは少なくとも 6 9 5 m g / g である、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 2】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 m g / g、好ましくは少なくとも 8 8 m g / g であり、前記対象の糸球体濾過量が少なくとも 9 0 m l / 分 / 1. 7 3 m² である、請求項 8 ～ 9 のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 3】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 m g / g、好ましくは少なくとも 8 8 m g / g であり、前記対象の糸球体濾過量が 6 0 ～ 8 9 m l / 分 / 1. 7 3 m² である、請求項 8 ～ 9 のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 4】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 m g / g、好ましくは少なくとも 8 8 m g / g であり、前記対象の糸球体濾過量が 4 5 ～ 5 9 m l / 分 / 1. 7 3 m² である、請求項 8 ～ 9 のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 1 5】

前記対象の A C R が少なくとも 3 0 m g / g、好ましくは少なくとも 8 8 m g / g であり、前記対象の糸球体濾過量が 3 0 ～ 4 4 m l / 分 / 1. 7 3 m² である、請求項 8 ～ 9

10

20

30

40

50

のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 16】

前記対象の ACR が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $15 \sim 29 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～9 のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 17】

前記対象の ACR が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が 15 ml/分/1.73 m^2 未満である、請求項 8～9 のいずれか、好ましくは請求項 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 18】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が少なくとも 90 ml/分/1.73 m^2 である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 19】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $60 \sim 89 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 20】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $45 \sim 59 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 21】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $30 \sim 44 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 22】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $15 \sim 29 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 23】

前記対象の ACR が少なくとも 100 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が 15 ml/分/1.73 m^2 未満である、請求項 8～10 のいずれか、好ましくは請求項 10 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 24】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が少なくとも 90 ml/分/1.73 m^2 である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 25】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg/g 、好ましくは少なくとも 303 mg/g 、より好ましくは少なくとも 695 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $60 \sim 89 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 26】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg/g 、好ましくは少なくとも 303 mg/g 、より好ましくは少なくとも 695 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $45 \sim 59 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 27】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg/g 、好ましくは少なくとも 303 mg/g 、より好ましくは少なくとも 695 mg/g であり、前記対象の糸球体濾過量が $30 \sim 4$

10

20

30

40

50

4 ml / 分 / 1.73 m² である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 28】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg / g、好ましくは少なくとも 303 mg / g、より好ましくは少なくとも 695 mg / g であり、前記対象の糸球体濾過量が 15～29 ml / 分 / 1.73 m² である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 29】

前記対象の ACR が少なくとも 300 mg / g、好ましくは少なくとも 303 mg / g、より好ましくは少なくとも 695 mg / g であり、前記対象の糸球体濾過量が 15 ml / 分 / 1.73 m² 未満である、請求項 8～11 のいずれか、好ましくは請求項 11 に記載のアンタゴニスト。

10

【請求項 30】

前記対象の HbA1c 値が 7.95 % 超である、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 31】

前記対象の HbA1c 値が少なくとも 6.0 %、好ましくは少なくとも 6.1 %、より好ましくは少なくとも 7.95 % である、請求項 30 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 32】

前記対象の HbA1c 値が 6.0～11 %、好ましくは 6.0 %～10.4 % である、請求項 30～31 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

20

【請求項 33】

前記対象が、以下の特徴：

(i) 前記対象が、米国糖尿病協会 (ADA) の定義に従って 2 型糖尿病であると診断されていること；

(ii) 前記対象が、高血圧症、高血糖症および／または脂質異常症をコントロールする安定治療を受けていること；ならびに

(iii) 前記対象が、アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) および／またはアンジオテンシン II 受容体遮断薬 (ARB) による安定治療を受けていること

のうち少なくとも 1 つの特徴を有する、請求項 1～32 のいずれか、好ましくは請求項 9～32 のいずれか、より好ましくは請求項 10～32 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

30

【請求項 34】

前記対象が特徴 (i)、(ii) および (iii) のうち少なくとも 2 つの特徴を有し、好ましくは、前記対象が特徴 (i) および (ii) を有する、請求項 33 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 35】

前記対象が特徴 (i)、(ii) および (iii) を有する、請求項 33～34 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 36】

40

前記対象が、以下の特徴：

(i) 前記対象が 1 型糖尿病に罹患していないこと；

(ii) 前記対象の eGFR が 25 ml / 分・1.73 m² 以下でないこと；ならびに

(iii) 前記アンタゴニストの投与開始前の 3 か月間に、前記対象に心血管事象が全く認められてないこと；

(iv) 前記対象が、コントロールされていない高血圧症に罹患しておらず、好ましくは、前記対象の血圧の上限値が 180 / 110 mmHg であること；

(v) 前記対象が、前記アンタゴニストの投与開始前の 3 か月間に、透析を受けていないこと；

(vi) 前記アンタゴニストの投与開始前の 3 か月間に、前記対象に急性腎傷害が全く

50

認められていないこと；

(v i i) 前記対象に重篤な浮腫、下肢潰瘍および感染症が全く認められないこと；

(v i i i) 前記対象が、チアゾリジンジオン類の薬物および免疫抑制薬からなる群より選択される薬物を使用していないこと；

(i x) 前記対象が、局所使用または吸入によるステロイド療法を除くステロイド療法を受けていないこと；ならびに

(x) 前記対象が、非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D)、2 型シクロオキシゲナーゼ (C O X - 2) 阻害薬、2 剤以上の利尿薬および／またはアリスキレンを慢性的に使用していないこと

のうち少なくとも 1 つの特徴を有する、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか、好ましくは請求項 9 ～ 3 5 のいずれか、より好ましくは請求項 1 0 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスト。

【請求項 3 7】

前記対象が、特徴 (i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v) および (v i) のうち少なくとも 1 つの特徴を有する、請求項 3 6 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 3 8】

前記アンタゴニストが C C L 2 ・ C C R 2 系のアンタゴニストである、請求項 1 ～ 3 7 のいずれか 1 つに記載のアンタゴニスト。

【請求項 3 9】

前記アンタゴニストが、S p i e g e l m e r およびアプタマーからなる群より選択される核酸分子であり、好ましくは、前記 S p i e g e l m e r が抗 C C L 2 S p i e g e l m e r であり、前記アプタマーが抗 C C L 2 アプタマーである、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか 1 つ、特に請求項 3 8 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 0】

前記核酸分子が修飾を含み、前記修飾が好ましくは高分子量部分であり、かつ／または前記修飾が好ましくは、動物またはヒトの体内、好ましくはヒトの体内での滞留時間の点で、請求項 3 9 に記載の核酸分子の特徴を修飾することを可能にする、請求項 3 9 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 1】

前記修飾が、H E S 部分および P E G 部分を含む群から選択される、請求項 4 0 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 2】

前記修飾が、直鎖 P E G または分岐鎖 P E G からなる P E G 部分であり、前記 P E G 部分の分子量が、好ましくは約 2 0 ～ 1 2 0 k D、より好ましくは約 3 0 ～ 8 0 k D、最も好ましくは約 4 0 k D である、請求項 4 1 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 3】

前記修飾が H E S 部分であり、好ましくは前記 H E S 部分の分子量が約 1 0 ～ 2 0 0 k D、より好ましくは約 3 0 ～ 1 7 0 k D、最も好ましくは約 1 5 0 k D である、請求項 4 1 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 4】

前記修飾が、リンカーを介して前記核酸と結合している、請求項 4 0 ～ 4 3 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 5】

前記修飾が、前記核酸分子の 5 ' 末端ヌクレオチドおよび／または 3 ' 末端ヌクレオチドならびに／あるいは前記核酸分子の 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と結合している、請求項 4 0 ～ 4 4 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 6】

前記核酸分子が S p i e g e l m e r である、請求項 1 ～ 4 5 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 4 7】

10

20

30

40

50

2 型M C P－1 結合核酸分子、3 型M C P－1 結合核酸分子、4 型M C P－1 結合核酸分子、1 A 型M C P－1 結合核酸分子、1 B 型M C P－1 結合核酸分子および5 型M C P－1 結合核酸分子を含む群から選択される核酸分子である、請求項4 6 に記載のアンタゴニストであって、

前記2 型M C P－1 結合核酸分子が、5'→3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

前記第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A C G C A、C G C A およびG C A を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記中央ヌクレオチドストレッチが、C S U C C C U C A C C G G U G C A A G U G A A G C C G Y G G C U C のヌクレオチド配列を含み、

前記第二の末端ヌクレオチドストレッチが、U G C G U、U G C G およびU G C を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記3 型M C P－1 結合核酸分子が、5'→3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチドストレッチ、第六の中央ヌクレオチドストレッチ、第七の中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

前記第一の末端ヌクレオチドストレッチが、G U R C U G C、G K S Y G C、K B B S C およびB N G C を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記第一の中央ヌクレオチドストレッチが、G K M G U のヌクレオチド配列を含み、

前記第二の中央ヌクレオチドストレッチが、K R R A R のヌクレオチド配列を含み、

前記第三の中央ヌクレオチドストレッチが、A C K M C のヌクレオチド配列を含み、

前記第四の中央ヌクレオチドストレッチが、C U R Y G A、C U W A U G A、C W R M G A C W およびU G C C A G U G を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記第五の中央ヌクレオチドストレッチが、G G Y およびC W G C を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記第六の中央ヌクレオチドストレッチが、Y A G A、C K A A U およびC C U U U A U を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記第七の中央ヌクレオチドストレッチが、G C Y R およびG C W G を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、ならびに

前記第二の末端ヌクレオチドストレッチが、G C A G C A C、G C R S M C、G S V V M およびG C N V を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記4 型M C P－1 結合核酸分子が、5'→3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

前記第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A G C G U G D U、G C G C G A G、C S K S U U、G U G U U およびU G U U を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記中央ヌクレオチドストレッチが、A G N D R D G B K G G U R G Y A R G U A A A G、A G G U G G G U G G U A G U A A G U A A A G およびC A G G U G G G U G G U A G A A U G U A A A G A を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記第二の末端ヌクレオチドストレッチが、G N C A S G C U、C U C G C G U C、G R S M S G、G R C A C およびG G C A を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

前記1 A 型M C P－1 結合核酸分子が、5'→3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

前記第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A G C R U G のヌクレオチド配列を含み、

前記第一の中央ヌクレオチドストレッチが、C C C G G W のヌクレオチド配列を含み

10

20

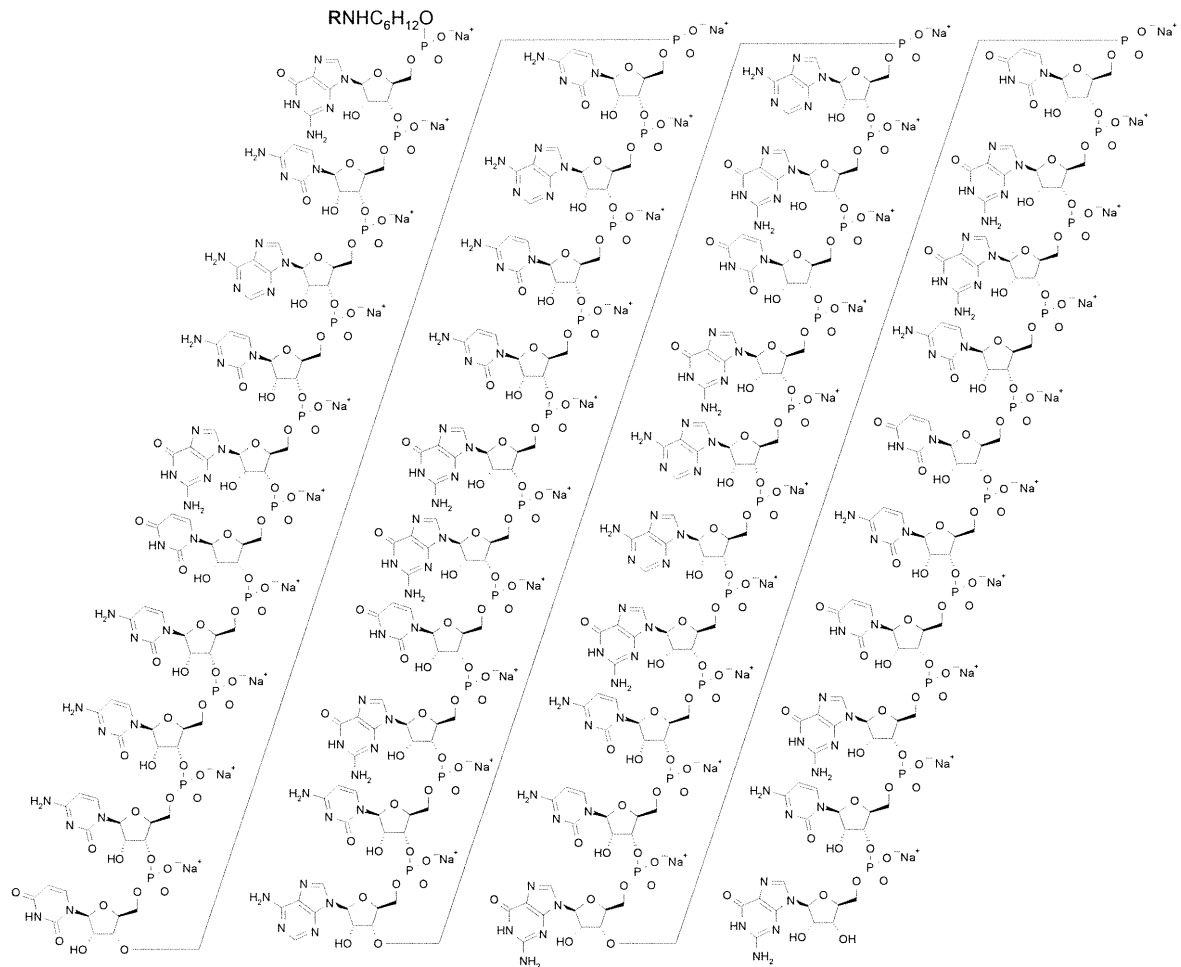
30

40

50

- 、
前記第二の中央ヌクレオチドストレッチが、G U Rのヌクレオチド配列を含み、
前記第三の中央ヌクレオチドストレッチが、R Y Aのヌクレオチド配列を含み、
前記第四の中央ヌクレオチドストレッチが、G G G G R C G C G A Y Cのヌクレオチド配列を含み、
前記第五の中央ヌクレオチドストレッチが、U G C A A U A A U GまたはU R Y A W U U Gのヌクレオチド配列を含み、
前記第二の末端ヌクレオチドストレッチが、C R Y G C Uのヌクレオチド配列を含み、
、
前記1 B型M C P-1結合核酸分子が、5'→3'方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、
前記第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A G Y R U Gのヌクレオチド配列を含み、
、
前記第一の中央ヌクレオチドストレッチが、C C A G C UまたはC C A G Yのヌクレオチド配列を含み、
前記第二の中央ヌクレオチドストレッチが、G U Gのヌクレオチド配列を含み、
前記第三の中央ヌクレオチドストレッチが、A U Gのヌクレオチド配列を含み、
前記第四の中央ヌクレオチドストレッチが、G G G G G C G C G A C Cのヌクレオチド配列を含み、
前記第五の中央ヌクレオチドストレッチが、C A U U U U AまたはC A U U U Aのヌクレオチド配列を含み、
前記第二の末端ヌクレオチドストレッチが、C A Y R C Uのヌクレオチド配列を含み、
、
前記5型M C P-1結合核酸分子が、配列番号87～115のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列を含む、
アンタゴニスト。
【請求項48】
前記2型M C P-1結合核酸分子が、配列番号37、配列番号116、配列番号117および配列番号228に記載の核酸配列を含む、請求項47に記載のアンタゴニスト。
【請求項49】
前記3型M C P-1結合核酸分子が、配列番号56、配列番号57～61、配列番号67～71および配列番号73に記載の核酸配列を含む群から選択される核酸配列を含む、請求項47に記載のアンタゴニスト。
【請求項50】
前記4型M C P-1結合核酸分子が、配列番号80および配列番号81に記載の核酸配列を含む、請求項47に記載のアンタゴニスト。
【請求項51】
前記1 A型M C P-1結合核酸分子が、配列番号21に記載の核酸配列を含む、請求項47に記載のアンタゴニスト。
【請求項52】
前記1 B型M C P-1結合核酸分子が、配列番号28および配列番号27に記載の核酸配列を含む、請求項47に記載のアンタゴニスト。
【請求項53】
以下の化合物：

【化 1】

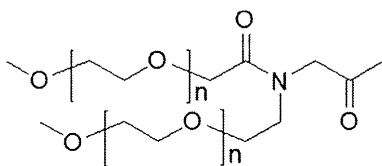


10

20

であり、式中、R が

【化 2】



30

であり、 n が 400 ~ 500、好ましくは 420 ~ 470、より好ましくは 450 である、

請求項 47 ~ 48 のいずれか 1 つに記載のアンタゴニスト。

【請求項 54】

アプタマーである、請求項 1 ~ 45 のいずれか 1 つに記載のアンタゴニスト。

【請求項 55】

タンパク質である、請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 つに記載のアンタゴニスト。

40

【請求項 56】

前記タンパク質が、抗体、アンチカリン、DARPin、Affilin（登録商標）分子およびカンチリン（cantyrin）からなる群より選択される、請求項 55 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 57】

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体からなる群より選択される抗体である、請求項 56 に記載のアンタゴニスト。

【請求項 58】

前記抗体が抗 CCL2 抗体、好ましくはモノクローナル抗 CCL2 抗体である、請求項

50

56に記載のアンタゴニスト。

【請求項59】

アンチカリンである、請求項56に記載のアンタゴニスト。

【請求項60】

前記アンチカリンが抗CCl₂アンチカリンである、請求項57に記載のアンタゴニスト。

【請求項61】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記アンタゴニストの投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い、請求項1～60のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

10

【請求項62】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、前記アンタゴニストの投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い、請求項61に記載のアンタゴニスト。

【請求項63】

疾患を治療する方法であって、請求項1～62のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められるアンタゴニストを対象に投与することを含み、前記対象に、請求項1～62のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる、方法。

20

【請求項64】

請求項1～63のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められるCCl₂のアンタゴニストの薬剤製造への使用であって、前記薬剤が、対象の疾患の治療および／または予防のためのものであり、前記対象に、請求項1～62のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる、使用。

【請求項65】

対象が、請求項1～64のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められるCCl₂のアンタゴニストによる治療に感受性であるかどうかを判定する方法であって、前記対象に請求項1～64のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められるかどうかを判定することを含み、前記対象に請求項1～64のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる場合、前記対象は、請求項1～64のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれか1つで定められるCCl₂のアンタゴニストによる治療に感受性であるとする、方法。

30

【請求項66】

対象の腎臓の糸球体濾過を*in situ*で改善する方法であって、請求項1～65のいずれか1つ、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められるアンタゴニストを前記対象に投与することを含み、前記対象に、請求項1～65のいずれか1つ、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、方法。

【請求項67】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、前記アンタゴニストの投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、糸球体濾過の改善が得られたとする、請求項66に記載の方法。

40

【請求項68】

対象の腎臓を*in situ*で修復する方法であって、請求項1～67のいずれか1つ、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められるアンタゴニストを前記対象に投与することを含み、前記対象に、請求項1～67のいずれか1つ、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、方法。

50

【請求項 69】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、前記アンタゴニストの投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、腎臓が修復されたと見なす、請求項68に記載の方法。

【請求項 70】

対象の腎臓の糸球体濾過を改善するための薬剤製造への請求項1～69のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められるCCL2のアンタゴニストの使用。

【請求項 71】

対象の腎臓を *in situ* で修復するための薬剤製造への請求項1～70のいずれか、好ましくは請求項1～62のいずれかで定められるCCL2のアンタゴニストの使用。

【請求項 72】

前記対象が、請求項1～62のいずれかで定められる対象である、請求項70～71のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 73】

前記対象に、請求項1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、請求項70～72のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 74】

糸球体濾過量が、請求項1～62のいずれかの通りに定められる、請求項70～73のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 75】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、前記アンタゴニストの投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、糸球体濾過が改善されたとする、請求項70および72～74に記載の使用。

【請求項 76】

前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後に前記対象が示す蛋白尿のレベルが、前記対象への前記アンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、投与前に前記対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、前記対象の腎臓が *in situ* で修復されたとする、請求項71～74のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、疾患を治療および／または予防する方法に使用するケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2（略記CCL2）のアンタゴニスト、アンタゴニストの投与を含む疾患の治療方法、薬剤製造へのアンタゴニストの使用、対象がアンタゴニストによる治療に感受性があるかどうかを判定する方法、対象の腎臓の糸球体濾過を *in situ* で改善する方法、対象の腎臓を *in situ* で修復する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

真性糖尿病は、インスリン分泌の欠陥、インスリン作用に対する耐性または両者の組合せによって引き起こされ高血糖症を特徴とする、慢性代謝障害である（Kahn, 1998）。このようなインスリンの分泌または作用の欠陥に重要な徴候としてほかに、脂質およびタンパク質の代謝の変化がある。真性糖尿病患者のほとんどは、進行性インスリン抵抗性とベータ細胞不全とが組み合わさった複雑な病態生理を示す2型糖尿病である（Shoelsonら, 2006）。真性糖尿病があると心血管疾患のリスクが高くなり、糖尿病患者集団では心血管疾患が罹病および死亡の主要な原因となっている。後期の合併症

10

20

30

40

50

としてほかにも、糖尿病性腎症（略記DN）が挙げられ、西洋ではこの合併症が末期腎疾患（略記ESRD）の主要な原因として他を圧倒し続けている（Giuntirà, 2010）。2型糖尿病が蔓延し、1型糖尿病の発症率および有病率が着実に増大していることを考えると、この問題は今後もさらに大きな公衆衛生問題になるものと思われ、食事および生活習慣の変化から、今や開発途上国にも急速に広まりつつある。現在用いられている予防および治療の戦略はESRDへの進行をわずかに遅らせる程度のものにとどまっており、未だこの世界規模の健康問題に実質的に影響を及ぼすには至っていないものと思われる。有望なDNの治療標的の幅を広げる新たな概念が大いに必要とされている。DNの発症および進行の全段階にいくつかの炎症過程が関与していることを示す強固な証拠が1型および2型糖尿病患者から集められている（MoraおよびNavarro, 2004; MoraおよびNavarro, 2005; Saraheimら, 2003）。このような過程を阻害する戦略は、この重要な疾患の臨床治療の発展に有益な変化をもたらすものと考えられる。

10

【0003】

例外はあるものの、有核細胞の大部分は、炎症性サイトカインによる活性化または様々な微生物分子による自然免疫受容体の刺激に応答して、単球走化性タンパク質-1（略記MCP-1）としても知られるCCL2を発現する（Brownら, 1994; RollinsおよびPober, 1991; Struyfら, 1998; Tsouら, 2007; Tsuboiら, 2002）。CCL2は、免疫細胞および非免疫細胞を誘引し活性化する小型の分泌型ヘパリン結合タンパク質であり、単球/マクロファージ、好塩基球、活性化T細胞およびNK細胞の強力な誘引物質としても知られている。CCL2は、結合相手を選ばないケモカイン系の中では例外的に、受容体を用いる際に高い特異性を示し、ケモカイン受容体CCR2とのみ高い親和性で結合する（Dawsonら, 2003）。

20

【0004】

CCL2が真性糖尿病、特に糖尿病性腎症に重要な役割を果たしていることを示す証拠が集まりつつある（Giuntirà, 2010; Ota, 2013）。現在利用できるデータから、炎症性単球が骨髄から真性糖尿病、特に糖尿病性腎症に関与する末梢循環血中に遊出するにはCCL2とCCR2の相互作用が必要であることが示唆される。健常なヒト被験者では、CCL2を注入すると単球数が増加することがわかっている（Mayrら, 2009）。骨髄からの単球遊出の阻害は、他の生理学的シグナルでは埋め合わせができないCCL2・CCR2系アンタゴニストの作用機序に極めて重要な側面となる。

30

【0005】

慢性疾患としての真性糖尿病ならびに末期腎疾患（略記ESRD）および糖尿病性腎症（略記DN）を含めたその後期合併症の重要性を考えると、真性糖尿病ならびに上記の後期合併症、特にESDRおよびDNを治療する手段が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記のことを踏まえ、本発明の土台となる課題は、真性糖尿病、特に2型糖尿病を治療および/または予防する手段を提供することである。

40

【0007】

本発明の土台となるさらなる課題は、末期腎疾患（略記ESRD）に至り得る慢性腎疾患および糖尿病性腎症（略記DN）を含めた、真性糖尿病、特に2型糖尿病の後期合併症を治療および/または予防する手段を提供することである。

【0008】

本発明の土台となる課題は、真性糖尿病、特に2型糖尿病を治療および/または予防する方法を提供することである。

【0009】

本発明の土台となるさらなる課題は、ESRDに至り得る慢性腎疾患および糖尿病性腎症を含めた、真性糖尿病、特に2型糖尿病の後期合併症を治療および/または予防する方

50

法を提供することである。

【0010】

本発明の土台となるもう1つの課題は、対象がCCL2のアンタゴニストによる治療に感受性であるかどうかを判定する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記のものをはじめとする本発明の土台となる課題は、添付される独立クレームの主題によって解決される。好ましい実施形態は、添付される従属クレームから得られる。

【0012】

より具体的には、上記のものをはじめとする本発明の土台となる課題はほかにも、以下の実施形態によって解決される。

10

【0013】

実施形態1：疾患を治療および／または予防する方法に使用するCCL2のアンタゴニストであって、この方法が、対象にアンタゴニストを投与することを含み、対象に蛋白尿が認められる、CCL2のアンタゴニスト。

【0014】

実施形態2：疾患が腎疾患である、実施形態1に記載のアンタゴニスト。

【0015】

実施形態3：疾患が腎障害である、実施形態1～2に記載のアンタゴニスト。

【0016】

実施形態4：疾患が糖尿病性腎症である、実施形態1～3に記載のアンタゴニスト。

20

【0017】

実施形態5：疾患が糖尿病、好ましくは真性糖尿病、より好ましくは2型糖尿病である、実施形態1～4のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0018】

実施形態6：疾患が、心血管疾患、原発性および続発性アミロイドーシス、巣状分節性糸球体硬化症、ループス腎炎、ファブリー病、糸球体腎炎、膜性腎症、肝腎症候群、IgA腎症、クリオグロブリン血症、多発性骨髄腫、爪膝蓋骨症候群、遺伝性腎炎、結節性多発動脈炎、シェーンライン・ヘノッホ紫斑病、ANCA関連血管炎、ネフローゼ症候群および急速進行性糸球体腎炎である、実施形態1に記載のアンタゴニスト。

30

【0019】

実施形態7：心血管疾患が高血圧症である、実施形態6に記載のアンタゴニスト。

【0020】

実施形態8：蛋白尿がACR（尿中アルブミン／クレアチニン比）で表される、実施形態1～7のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0021】

実施形態9：対象のACRが少なくとも30mg/g、好ましくは少なくとも88mg/gである、実施形態8に記載のアンタゴニスト。

【0022】

実施形態10：対象のACRが少なくとも100mg/gである、実施形態9に記載のアンタゴニスト。

40

【0023】

実施形態11：対象のACRが少なくとも300mg/g、好ましくは少なくとも303mg/g、より好ましくは少なくとも695mg/gである、実施形態8～10のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0024】

実施形態12：対象のACRが少なくとも30mg/g、好ましくは少なくとも88mg/gであり、対象の糸球体濾過量が少なくとも90ml/分/1.73m²である、実施形態8～9のいずれか、好ましくは実施形態9に記載のアンタゴニスト。

【0025】

50

実施形態 13：対象の A C R が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $60 \sim 89 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～9 のいずれか、好ましくは実施形態 9 に記載のアンタゴニスト。

【0026】

実施形態 14：対象の A C R が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $45 \sim 59 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～9 のいずれか、好ましくは実施形態 9 に記載のアンタゴニスト。

【0027】

実施形態 15：対象の A C R が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $30 \sim 44 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～9 のいずれか、好ましくは実施形態 9 に記載のアンタゴニスト。

10

【0028】

実施形態 16：対象の A C R が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $15 \sim 29 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～9 のいずれか、好ましくは実施形態 9 に記載のアンタゴニスト。

【0029】

実施形態 17：対象の A C R が少なくとも 30 mg/g 、好ましくは少なくとも 88 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が 15 ml/分/1.73 m^2 未満である、実施形態 8～9 のいずれか、好ましくは実施形態 9 に記載のアンタゴニスト。

【0030】

実施形態 18：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が少なくとも 90 ml/分/1.73 m^2 である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

20

【0031】

実施形態 19：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $60 \sim 89 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

【0032】

実施形態 20：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $45 \sim 59 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

30

【0033】

実施形態 21：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $30 \sim 44 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

【0034】

実施形態 22：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が $15 \sim 29 \text{ ml/分/1.73 m}^2$ である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

【0035】

実施形態 23：対象の A C R が少なくとも 100 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が 15 ml/分/1.73 m^2 未満である、実施形態 8～10 のいずれか、好ましくは実施形態 10 に記載のアンタゴニスト。

40

【0036】

実施形態 24：対象の A C R が少なくとも 300 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が少なくとも 90 ml/分/1.73 m^2 である、実施形態 8～11 のいずれか、好ましくは実施形態 11 に記載のアンタゴニスト。

【0037】

実施形態 25：対象の A C R が少なくとも 300 mg/g 、好ましくは少なくとも 303 mg/g 、より好ましくは少なくとも 695 mg/g であり、対象の糸球体濾過量が 6

50

0～89 ml/分/1.73 m²である、実施形態8～11のいずれか、好ましくは実施形態11に記載のアンタゴニスト。

【0038】

実施形態26：対象のACRが少なくとも300 mg/g、好ましくは少なくとも303 mg/g、より好ましくは少なくとも695 mg/gであり、対象の糸球体濾過量が45～59 ml/分/1.73 m²である、実施形態8～11のいずれか、好ましくは実施形態11に記載のアンタゴニスト。

【0039】

実施形態27：対象のACRが少なくとも300 mg/g、好ましくは少なくとも303 mg/g、より好ましくは少なくとも695 mg/gであり、対象の糸球体濾過量が30～44 ml/分/1.73 m²である、実施形態8～11のいずれか、好ましくは実施形態11に記載のアンタゴニスト。

【0040】

実施形態28：対象のACRが少なくとも300 mg/g、好ましくは少なくとも303 mg/g、より好ましくは少なくとも695 mg/gであり、対象の糸球体濾過量が15～29 ml/分/1.73 m²である、実施形態8～11のいずれか、好ましくは実施形態11に記載のアンタゴニスト。

【0041】

実施形態29：対象のACRが少なくとも300 mg/g、好ましくは少なくとも303 mg/g、より好ましくは少なくとも695 mg/gであり、対象の糸球体濾過量が15 ml/分/1.73 m²未満である、実施形態8～11のいずれか、好ましくは実施形態11に記載のアンタゴニスト。

【0042】

実施形態30：対象のHbA1c値が7.95%超である、実施形態1～29のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0043】

実施形態31：対象のHbA1c値が少なくとも6.0%、好ましくは少なくとも6.1%、より好ましくは少なくとも7.95%である、実施形態30に記載のアンタゴニスト。

【0044】

実施形態32：対象のHbA1c値が6.0～11%、好ましくは6.0%～10.4%である、実施形態30～31のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0045】

実施形態33：対象が、以下の特徴：

(i) 対象が、米国糖尿病協会(ADA)の定義に従って2型糖尿病であると診断されていること；

(ii) 対象が、高血圧症、高血糖症および／または脂質異常症をコントロールする安定治療を受けていること；ならびに

(iii) 対象が、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEi)および／またはアンジオテンシンII受容体遮断薬(ARB)による安定治療を受けていること

のうち少なくとも1つの特徴を有する、実施形態1～32のいずれか、好ましくは実施形態9～32のいずれか、より好ましくは実施形態10～32のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0046】

実施形態34：対象が特徴(i)、(ii)および(iii)のうち少なくとも2つの特徴を有し、好ましくは、対象が特徴(i)および(ii)を有する、実施形態33に記載のアンタゴニスト。

【0047】

実施形態35：対象が特徴(i)、(ii)および(iii)を有する、実施形態33～34のいずれかに記載のアンタゴニスト。

10

20

30

40

50

【0048】

実施形態36：対象が、以下の特徴：

- (i) 対象が1型糖尿病に罹患していないこと；
 - (ii) 対象のeGFRが $25\text{ ml} / \text{分} / 1.73\text{ m}^2$ 以下でないこと；ならびに
 - (iii) アンタゴニストの投与開始前の3か月間に、対象に心血管事象が全く認められていないこと；
 - (iv) 対象が、コントロールされていない高血圧症に罹患しておらず、好ましくは、対象の血圧の上限値が $180 / 110\text{ mmHg}$ であること；
 - (v) 対象が、アンタゴニストの投与開始前の3か月間に、透析を受けていないこと；
 - (vi) アンタゴニストの投与開始前の3か月間に、対象に急性腎傷害が全く認められていないこと；
 - (vii) 対象に重篤な浮腫、下肢潰瘍および感染症が全く認められないこと；
 - (viii) 対象が、チアゾリジンジオン類の薬物および免疫抑制薬からなる群より選択される薬物を使用していないこと；
 - (ix) 対象が、局所使用または吸入によるステロイド療法を除くステロイド療法を受けていないこと；ならびに
 - (x) 対象が、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、2型シクロオキシゲナーゼ（COX-2）阻害薬、2剤以上の利尿薬および／またはアリスキレンを慢性的に使用していないこと
- のうち少なくとも1つの特徴を有する、実施形態1～35のいずれか、好ましくは実施形態9～35のいずれか、より好ましくは実施形態10～35のいずれかに記載のアンタゴニスト。

【0049】

実施形態37：対象が、特徴(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)および(vi)のうち少なくとも1つの特徴を有する、実施形態36に記載のアンタゴニスト。

【0050】

実施形態38：アンタゴニストがCCL2・CCR2系のアンタゴニストである、実施形態1～37のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

【0051】

実施形態39：アンタゴニストが、Spiegelmerおよびアプタマーからなる群より選択される核酸分子であり、好ましくは、Spiegelmerが抗CCL2 Spiegelmerであり、アプタマーが抗CCL2アプタマーである、実施形態1～38のいずれか1つ、特に実施形態38に記載のアンタゴニスト。

【0052】

実施形態40：核酸分子が修飾を含み、修飾が好ましくは高分子量部分であり、かつ／または修飾が好ましくは、動物またはヒトの体内、好ましくはヒトの体内での滞留時間の点で、実施形態39に記載の核酸分子の特徴を修飾することを可能にする、実施形態39に記載のアンタゴニスト。

【0053】

実施形態41：修飾が、HES部分およびPEG部分を含む群から選択される、実施形態40に記載のアンタゴニスト。

【0054】

実施形態42：修飾が、直鎖PEGまたは分岐鎖PEGからなるPEG部分であり、PEG部分の分子量が、好ましくは約20～120kD、より好ましくは約30～80kD、最も好ましくは約40kDである、実施形態41に記載のアンタゴニスト。

【0055】

実施形態43：修飾がHES部分であり、好ましくはHES部分の分子量が約10～200kD、より好ましくは約30～170kD、最も好ましくは約150kDである、実施形態41に記載のアンタゴニスト。

【0056】

実施形態 44：修飾が、リンカーを介して核酸と結合している、実施形態 40～43 に記載のアンタゴニスト。

【0057】

実施形態 45：修飾が、核酸分子の 5' 末端ヌクレオチドおよび／または 3' 末端ヌクレオチドならびに／あるいは核酸分子の 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と結合している、実施形態 40～44 に記載のアンタゴニスト。

【0058】

実施形態 46：核酸分子が Spiegelmer である、実施形態 1～45 に記載のアンタゴニスト。

【0059】

実施形態 47：2 型 MCP-1 結合核酸分子、3 型 MCP-1 結合核酸分子、4 型 MCP-1 結合核酸分子、1 A 型 MCP-1 結合核酸分子、1 B 型 MCP-1 結合核酸分子および 5 型 MCP-1 結合核酸分子を含む群から選択される核酸分子である、実施形態 46 に記載のアンタゴニストであって、

2 型 MCP-1 結合核酸分子が、5' → 3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

第一の末端ヌクレオチドストレッチが、ACGCA、CGCA および GCA を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

中央ヌクレオチドストレッチが、CSUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGYGGCUC のヌクレオチド配列を含み、および

第二の末端ヌクレオチドストレッチが、UGCUG、UGC および UGC を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

3 型 MCP-1 結合核酸分子が、5' → 3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチドストレッチ、第六の中央ヌクレオチドストレッチ、第七の中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

第一の末端ヌクレオチドストレッチが、GURCUGC、GKSYGC、KBBSC および BNGC を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

第一の中央ヌクレオチドストレッチが、GKMGU のヌクレオチド配列を含み、

第二の中央ヌクレオチドストレッチが、KRRAR のヌクレオチド配列を含み、

第三の中央ヌクレオチドストレッチが、ACKMC のヌクレオチド配列を含み、

第四の中央ヌクレオチドストレッチが、CURYGA、CUWAUGA、CWRMGACW および UGCCAGUG を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

第五の中央ヌクレオチドストレッチが、GGY および CWGC を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

第六の中央ヌクレオチドストレッチが、YAGA、CKAAU および CCUUUAU を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

第七の中央ヌクレオチドストレッチが、GCYR および GCWG を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、および

第二の末端ヌクレオチドストレッチが、GCAGCAC、GCRSMC、GSVVM および GCNV を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

4 型 MCP-1 結合核酸分子が、5' → 3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

第一の末端ヌクレオチドストレッチが、AGCGUGDU、GCGCGAG、CSKSUU、GUGUU および UGUU を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

中央ヌクレオチドストレッチが、AGNDRDGBKGGURGYARGUAAAG、AGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAG および CAGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGA を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、および

第二の末端ヌクレオチドストレッチが、GNCA S GCU、CUCGC GUC、GR

10

20

30

40

50

S M S G、G R C A C および G G C A を含む群から選択されるヌクレオチド配列を含み、
 1 A 型 M C P - 1 結合核酸分子が、5' → 3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッ
 チ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中
 央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチ
 ドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A G C R U G のヌクレオチド配列を含み、

第一の中央ヌクレオチドストレッチが、C C C G G W のヌクレオチド配列を含み、

第二の中央ヌクレオチドストレッチが、G U R のヌクレオチド配列を含み、

第三の中央ヌクレオチドストレッチが、R Y A のヌクレオチド配列を含み、

第四の中央ヌクレオチドストレッチが、G G G G G R C G C G A Y C のヌクレオチド
 配列を含み、

第五の中央ヌクレオチドストレッチが、U G C A A U A A U G または U R Y A W U U
 G のヌクレオチド配列を含み、および

第二の末端ヌクレオチドストレッチが、C R Y G C U のヌクレオチド配列を含み、

1 B 型 M C P - 1 結合核酸分子が、5' → 3' 方向に第一の末端ヌクレオチドストレッ
 チ、第一の中央ヌクレオチドストレッチ、第二の中央ヌクレオチドストレッチ、第三の中
 央ヌクレオチドストレッチ、第四の中央ヌクレオチドストレッチ、第五の中央ヌクレオチ
 ドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチを含み、

第一の末端ヌクレオチドストレッチが、A G Y R U G のヌクレオチド配列を含み、

第一の中央ヌクレオチドストレッチが、C C A G C U または C C A G Y のヌクレオチ
 ド配列を含み、

第二の中央ヌクレオチドストレッチが、G U G のヌクレオチド配列を含み、

第三の中央ヌクレオチドストレッチが、A U G のヌクレオチド配列を含み、

第四の中央ヌクレオチドストレッチが、G G G G G C G C G A C C のヌクレオチド
 配列を含み、

第五の中央ヌクレオチドストレッチが、C A U U U U A または C A U U U A のヌクレ
 オチド配列を含み、および

第二の末端ヌクレオチドストレッチが、C A Y R C U のヌクレオチド配列を含み、

5 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 8 7 ~ 1 1 5 のいずれか 1 つに記載のヌクレ
 オチド配列を含む、

アンタゴニスト。

【0060】

実施形態 4 8 : 2 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 3 7、配列番号 1 1 6、配列
 番号 1 1 7 および配列番号 2 2 8 に記載の核酸配列を含む、実施形態 4 7 に記載のアンタ
 ゴニスト。

【0061】

実施形態 4 9 : 3 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 5 6、配列番号 5 7 ~ 6 1、
 配列番号 6 7 ~ 7 1 および配列番号 7 3 に記載の核酸配列を含む群から選択される核酸配
 列を含む、-実施形態 4 7 に記載のアンタゴニスト。

【0062】

実施形態 5 0 : 4 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 8 0 および配列番号 8 1 に記
 載の核酸配列を含む、実施形態 4 7 に記載のアンタゴニスト。

【0063】

実施形態 5 1 : 1 A 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 2 1 に記載の核酸配列を含
 む、実施形態 4 7 に記載のアンタゴニスト。

【0064】

実施形態 5 2 : 1 B 型 M C P - 1 結合核酸分子が、配列番号 2 8 および配列番号 2 7 に
 記載の核酸配列を含む、実施形態 4 7 に記載のアンタゴニスト。

【0065】

実施形態 5 3 : 以下の化合物：

10

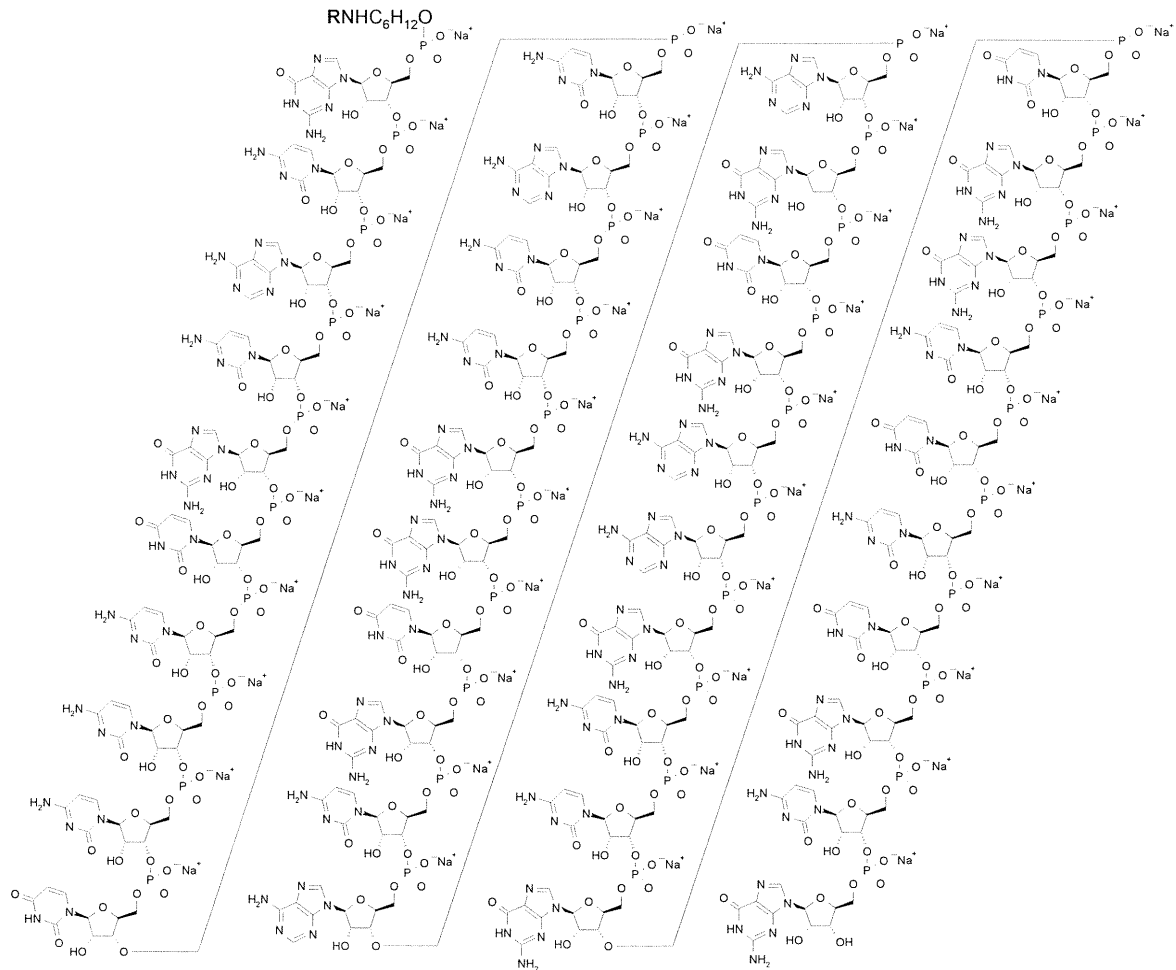
20

30

40

50

【化 1】

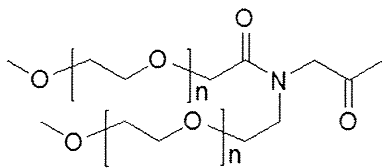


10

20

であり、式中、Rが

【化 2】



30

であり、 n が400～500、好ましくは420～470、より好ましくは450である、
実施形態47～48のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

【0066】

実施形態54：アプタマーである、実施形態1～45のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

40

【0067】

実施形態55：タンパク質である、実施形態1～38のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

【0068】

実施形態56：タンパク質が、抗体、アンチカリン、DARPin、Affilin（登録商標）分子およびカンチリン（cantyrin）からなる群より選択される、実施形態55に記載のアンタゴニスト。

【0069】

実施形態57：モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体からなる群より選択される抗体である、実施形態56に記載のアンタゴニスト。

50

【0070】

実施形態58：抗体が抗CC L2抗体、好ましくはモノクローナル抗CC L2抗体である、実施形態56に記載のアンタゴニスト。

【0071】

実施形態59：アンチカリンである、実施形態56に記載のアンタゴニスト。

【0072】

実施形態60：アンチカリンが抗CC L2アンチカリンである、実施形態57に記載のアンタゴニスト。

【0073】

実施形態61：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い、実施形態1～60のいずれか1つに記載のアンタゴニスト。

10

【0074】

実施形態62：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、対象へのアンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い、実施形態61に記載のアンタゴニスト。

【0075】

実施形態63：疾患を治療する方法であって、実施形態1～62のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められるアンタゴニストを対象に投与することを含み、対象に、実施形態1～62のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる、方法。

20

【0076】

実施形態64：実施形態1～63のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められるCC L2のアンタゴニストの薬剤製造への使用であって、薬剤が、対象の疾患の治療および／または予防のためのものであり、対象に、実施形態1～62のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる、使用。

【0077】

実施形態65：対象が、実施形態1～64のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められるCC L2のアンタゴニストによる治療に感受性であるかどうかを判定する方法であって、対象に実施形態1～64のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められるかどうかを判定することを含み、対象に実施形態1～64のいずれか1つで定められる蛋白尿が認められる場合、対象は、実施形態1～64のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれか1つで定められるCC L2のアンタゴニストによる治療に感受性であるとする、方法。

30

【0078】

実施形態66：対象の腎臓の糸球体濾過を*in situ*で改善する方法であって、実施形態1～65のいずれか1つ、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められるアンタゴニストを対象に投与することを含み、対象に、実施形態1～65のいずれか1つ、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、方法。

40

【0079】

実施形態67：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、対象へのアンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、糸球体濾過の改善が得られたとする、実施形態66に記載の方法。

【0080】

実施形態68：対象の腎臓を*in situ*で修復する方法であって、実施形態1～6

50

7のいずれか1つ、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められるアンタゴニストを対象に投与することを含み、対象に、実施形態1～67のいずれか1つ、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、方法。

【0081】

実施形態69：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、対象へのアンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、腎臓が修復されたと見なす、実施形態68に記載の方法。

【0082】

実施形態70：対象の腎臓の糸球体濾過を改善するための薬剤製造への実施形態1～69のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められるCC L2のアンタゴニストの使用。

【0083】

実施形態71：対象の腎臓を*in situ*で修復するための薬剤製造への実施形態1～70のいずれか、好ましくは実施形態1～62のいずれかで定められるCC L2のアンタゴニストの使用。

【0084】

実施形態72：対象が、実施形態1～62のいずれかで定められる対象である、実施形態70～71のいずれかに記載の使用。

【0085】

実施形態73：対象に、実施形態1～62のいずれかで定められる蛋白尿が認められる、実施形態70～72のいずれかに記載の使用。

【0086】

実施形態74：糸球体濾過量が、実施形態1～62のいずれかの通りに定められる、実施形態70～73のいずれかに記載の使用。

【0087】

実施形態75：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、対象へのアンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、糸球体濾過が改善されたとする、実施形態70および72～74に記載の使用。

【0088】

実施形態76：対象へのアンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、対象へのアンタゴニストの投与終了後1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間または12か月間、投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低い場合、対象の腎臓が*in situ*で修復されたとする、実施形態71～74のいずれかに記載の使用。

【発明の効果】

【0089】

本発明者らは、驚くべきことに、化合物NOX-E36などのCC L2のアンタゴニストが疾患の治療および／または予防に適していることを発見したが、ここでは、その方法は、対象にアンタゴニストを投与することを含み、対象には蛋白尿が認められる。より具体的には、本発明者らは、NOX-E36などのCC L2のアンタゴニストを投与すると、対象の蛋白尿が有意に改善される、すなわち、減少することを発見した。最も驚くべきことは、アンタゴニストの投与終了後、蛋白尿がさらに減少し、アンタゴニストの投与前に対象が示した蛋白尿のレベルよりも低いレベルで維持されたということである。

【0090】

いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、好ましくは、例えばDawsonら(2003)で定義されるCC L2・CCR2系を阻害する、NO

10

20

30

40

50

X-E36などのアンタゴニスト活性がこの効果に関与しているものとする。より具体的には、対象の尿中にアルブミンなどのタンパク質が存在するかどうかを腎臓の炎症の指標および慢性腎疾患の進行のマーカーと考えることができるほか、糖尿病性腎症および2型糖尿病がともに炎症性要素を示す病態であることから、アンタゴニストであり、ひいては抗炎症性分子としての活性を示すNOX-E36などによって、それぞれの器官の炎症状態および糖尿病患者に典型的な無症候性全身性炎症が調節されることにより、治療中止後も依然として進行中の修復過程の開始が促進される。これにより、前記アンタゴニストの投与中止後も蛋白尿の減少が長期間持続することの説明がつく。蛋白尿の改善が持続すれば、糸球体濾過バリアを構成する細胞の機能が正常に戻っている、すなわち、修復過程が進行しているものとする。このように蛋白尿が長期間にわたって正常化された結果、腎臓の濾過能、すなわち糸球体濾過量（略記GFR）の進行性の低下が抑えられるか、停止する。この限りにおいて、本発明は、別の態様では、本明細書に開示される蛋白尿が認められる対象の腎臓を*in situ*で修復する方法であって、本明細書に記載されるアンタゴニストの投与を含む方法であると考えることができる。

10

【発明を実施するための形態】

【0091】

一実施形態では、蛋白尿はアルブミン尿である。好ましい蛋白尿の尺度として、ACR、すなわち尿中アルブミン／クレアチニン比を用い、対象の試料に基づいてその値を求める。試料は対象の尿であるのが好ましい。対象のACRを求める手段および方法は当業者に公知であり、例えば、Labor und Diagnose (Lothar Thomas編, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 2008)に記載されている。

20

【0092】

本明細書に提供される実験的証拠を踏まえれば、当業者には、ここで観察された効果が被験アンタゴニストそのもの、すなわちNOX-E36に限定されないことが理解されよう。むしろ、他のCCL2のアンタゴニスト、特にCCL2・CCR2系のアンタゴニストはいずれも、ここで観察された効果が得られ、ひいては本明細書に開示される目的に等しく適したものになると考えるのが妥当である。

【0093】

さらに、当業者は、本明細書に提供される実験的証拠を踏まえれば、対象が本明細書に開示される蛋白尿を伴う疾患に罹患しているか、罹患するリスクがある場合またはそのような患者が蛋白尿を示す場合、いかなる疾患も治療し得ると考えるのが妥当である。特に限定されないが末期腎疾患、糖尿病性腎症を含めた腎疾患のほかにも、上記のような疾患は、心血管疾患、原発性および続発性アミロイドーシス、巣状分節性糸球体硬化症、ループス腎炎、ファブリー病、糸球体腎炎、膜性腎症、肝腎症候群、IgA腎症、クリオグロブリン血症、多発性骨髄腫、爪膝蓋骨症候群、遺伝性腎炎、結節性多発動脈炎、シェーンライン・ヘノッホ紫斑病、ANCA関連血管炎、ネフローゼ症候群および急速進行性糸球体腎炎を含む群から選択される疾患である。

30

【0094】

腎損傷は実質内、大血管内または集尿系内のものであり得、腎組織を直接検査せずにマーカーから推測されることが多い。腎損傷のマーカーは腎内の推定損傷部位のほか、他の臨床所見とともに腎疾患の原因の手掛かりになることが多い。例えばACRの増大によって表される蛋白尿は、尿中のタンパク質量の増加がみられることを表す一般用語である。蛋白尿は、a) 高分子量タンパク質に対する糸球体の透過性の増大（アルブミン尿または糸球体蛋白尿）、b) 通常であれば濾過される低分子量タンパク質の尿細管における不十分な再吸収（尿細管蛋白尿）またはc) 低分子量タンパク質の血漿中濃度の増大（免疫グロブリン軽鎖などの産生過剰性蛋白尿）による血漿タンパク質の異常な喪失を反映し得る。このように、蛋白尿は腎損傷に特徴的なものである。

40

【0095】

糸球体濾過量（GFR）は一般に、構造が広範囲にわたって損傷を受けると減少し、慢

50

性腎疾患（CKD）では、とりわけ真性糖尿病および糖尿病性腎症で観察されるように、GFR以外の腎機能もほとんどがGFRに並行する形で低下するため、腎機能全体の最も優れた指標であると広く考えられている。対象のGFRを求める手段および方法は当業者に公知であり、例えば、Labor und Diagnose（Lothar Thomas編，TH-Books Verlagsgesellschaft，Frankfurt/Main 2008）および（Leveyら，2009）に記載されている。

【0096】

一実施形態では、腎疾患は、2型糖尿病（略記T2DM）患者の糖尿病性腎症（略記DN）である。DNは、T2DMおよび高血圧症の患者によくみられ、ACRおよび／またはGFRによって測定される持続的で通常は進行性の腎機能低下を特徴とする。T2DM患者では、高血糖症および高血圧症がDN発症の主要な決定因子となる。先進工業国では肥満、T2DMおよび高血圧症の発症率が上昇していることを考えると、それに伴いDNの発症率も既に相当な割合に達している。DN患者の治療には、その根底にあるT2DMおよび高血圧症の治療が含まれ、高血圧症のコントロールにはアンジオテンシン変換酵素阻害薬（略記ACEi）およびアンジオテンシンII受容体遮断薬（略記ARB）が処方されることが多く、これらはDNの進行を遅らせる。それにもかかわらず、患者の約20%が最終的にESRDまで進行し、腎代替療法が必要となる。DNは従来、非炎症性疾患であると考えられていたが、現在では、DNに果たすマクロファージの役割を示す明白な証拠が存在する。DN患者の腎生検試料には線維症に続発したものではないマクロファージの糸球体浸潤の増大がみられ、尿細管間質の損傷は単球／マクロファージの細胞浸潤と強い相関がある。前臨床モデルを用いた実験的研究では、単球／マクロファージ浸潤が疾患の初期段階で起こるものであり、この浸潤は腎傷害と相関があることが明らかにされている。

【0097】

別の実施形態では、対象は、真性糖尿病、特に2型糖尿病のマーカーとして一般に認められているHbA1c値の点から特徴付けられる。HbA1cはヘモグロビンの一種であり、主に長期間にわたる血漿グルコース濃度の平均値を求めるために測定される。HbA1cは、非酵素的糖化経路でヘモグロビンが血漿グルコースに曝露されることによって形成される。グルコース値が正常であれば、糖化ヘモグロビンの量も正常となる。血漿グルコース量の平均値が上昇するにつれて、糖化ヘモグロビンの割合は予測可能な形で増大する。

【0098】

一実施形態では、対象は、高血圧症、高血糖症および／または脂質異常症をコントロールする安定治療を受けている。

【0099】

上記の高血圧症をコントロールする治療は、ACEiおよびARBの投与を含み得る。好ましいACEiは、エナラプリル、ラミプリル、リシノプリル、ベナズプリル、ペリンドプリル、イリダプリル（iridapril）、カプトプリル、ゾフェノプリルおよびホシノプリルである。好ましいARBは、ロサルタン、バルサルタン、オルメサルタン、イルベサルタン、テルミサルタンおよびカンデサルタンである。上記の高血圧症をコントロールする治療は、例えばニフェジピン、アムロジピンおよびベラパミルなどのカルシウム（略記Ca）アンタゴニスト、例えばメトプロロール、カルベジロールおよびビソプロロールなどのβ遮断薬ならびに／あるいは例えばフロセミド、エタクリン酸、ヒドロクロチアジド、アセタゾラミド、スピロラクトンおよびアミロリドなどの利尿薬の使用を含み得る。

【0100】

上記の高血糖症をコントロールする治療は、経口抗糖尿病薬、例えば、特に限定されないがメトホルミンを含めたビグアニド；特に限定されないがグリベンクラミドおよびグリメピリドを含めたスルホニル尿素；特に限定されないがアカルボースを含めたα-グルコシダーゼ阻害剤；特に限定されないがナテグリニドおよびレバグリニドを含めたグリニド

；特に限定されないがシタグリブチンおよびビルダグリブチンを含めたDPP4阻害剤；特に限定されないがダバグリフロジンを含めたSGLT2阻害剤などの使用を含み得る。上記の高血糖症をコントロールする治療は、特に限定されないがインクレチン模倣物、例えばエキセナチドなどを含めた非経口抗糖尿病薬の使用を含み得る。上記の高血糖症をコントロールする治療は、インスリン療法を含み得る。

【0101】

本発明の一実施形態では、2型糖尿病は米国糖尿病協会（ADA2012）によって定義される2型糖尿病である。

【0102】

本発明の一実施形態では、1型糖尿病は米国糖尿病協会（ADA2012）によって定義される1型糖尿病である。

【0103】

当業者には、蛋白尿が認められる対象であって、疾患の治療にCCL2のアンタゴニストを使用する方が他の治療法よりも大きな利益が得られる対象が存在することが理解されよう。特許請求される本発明から特に利益が得られる対象は、1型糖尿病に罹患していない対象である。また別の対象は、eGFRが $25\text{ml}/\text{分}/1.73\text{m}^2$ 以下でない対象である。それに関連して、eGFRとは、対象の血漿中のクレアチニン濃度に基づいて求められる推定糸球体濾過量のことである。対象のeGFRを求める手段および方法は当業者に公知であり、例えば、Labor und Diagnose（Lothar Thomas編，TH-Books Verlagsgesellschaft，Frankfurt/Main 2008）に記載されている。ただし、eGFRの代わりに、直接測定したGFR（略記mGFR）を用いることも可能であることが認められよう。クレアチニンおよびシスタチンなどの内因性に産生される濾過マーカーを用いて得られるeGFRとは対照的に、mGFRは外因性濾過マーカーを用いて求められる。mGFRを求めるには、イヌリン、イオヘキソールなどの外因性濾過マーカーまたは 51Cr-EDTA もしくは 125I-イオータラム酸塩 などの放射性トレーサーを患者の静脈内に注射し、その血液からのクリアランスを、例えばHPLC法により、分析的に追跡する。mGFRのデータは精密かつ正確であるが、多くの費用、時間および労力を要するため、臨床ルーチンでは用いない。

【0104】

本明細書で好んで用いられる心血管事象は、好ましくは致命的でない心筋梗塞または致命的でない脳卒中である。

【0105】

本明細書で好んで用いられる急性腎傷害とは、特に限定されないが、腎毒性物質の摂取、尿路の閉塞または血液量の減少を含め、いくつかの原因がある急速な腎機能の低下のことである。

【0106】

一実施形態では、CCL2のアンタゴニストは、CCL2とその受容体、特にCCR2との結合を阻害する化合物である。好ましくは、アンタゴニストは、蛋白尿が認められる対象に投与したときにACRの低下をもたらす化合物であり、蛋白尿は、好ましくは本明細書で定められる通りのものである。より好ましくは、アンタゴニストは、蛋白尿が認められる対象に投与したときにACRの低下をもたらす化合物であり、蛋白尿は、好ましくは本明細書で定められる通りのものであり、ACRの減少は、対象の化合物を投与する前のACRのレベルを下回るレベルで維持される。最も好ましくは、対象に化合物を投与する前のACRのレベルを下回るレベルは、対象に化合物を投与するのを中止しても、対象に化合物を投与する前のACRのレベル未満に維持される。CCL2アンタゴニストの投与終了後に対象が示す蛋白尿のレベルが、1か月間、2か月間、3か月間、4か月間、5か月間、6か月間、7か月間、8か月間、9か月間、10か月間、11か月間および／または12か月間、アンタゴニストの投与前に対象が示す蛋白尿のレベルよりも低いことは本発明の範囲内にある。好ましい実施形態では、アンタゴニストは、実施例の部で定めら

れる環境でNOX-E36とほぼ同じ特徴または同一の特徴を示す化合物である。

【0107】

本明細書に開示されるアンタゴニストは、様々な種類の薬理活性化合物のメンバーであり得る。このような化合物としては、Spiegelmers、アプタマー、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびナノボディ、すなわちラクダ科単ドメイン抗体を含めた抗体、DARPin、Affilin分子、センチリン、アンチカリンおよび標的分子結合ペプチドが挙げられる。アンタゴニストがCCL2またはCCR2と結合することは本発明の範囲内にある。この限りにおいて、CCL2およびCCR2はそれぞれ、上記化合物の標的分子である。

【0108】

設計アンキリン反復タンパク質の頭文字であるDARPinは、通常、標的タンパク質との結合に高特異性および高親和性を示す、遺伝子操作された抗体模倣タンパク質である。このタンパク質は、本来は高親和性タンパク質間相互作用を仲介するタンパク質のクラスである、天然のアンキリントタンパク質に由来するものである。DARPinは、アンキリントタンパク質の少なくとも3つ、通常は4つまたは5つ反復したモチーフで構成されている。その分子質量は、反復が4つまたは5つのDARPinでそれぞれ約14 kDaまたは18 kDa（キロダルトン）である。

【0109】

Affilin分子は、ヒトユビキチン足場をベースとするものである。

【0110】

センチリンは、共通のフィブロネクチンドメインであるセンチリンプラットフォームを土台にして作製されるものである。

【0111】

アンチカリンは、特に独国特許出願第19742706号に記載されている、特有の形態の標的結合ポリペプチドである。

【0112】

また別の種類の化合物にCCL2結合ペプチドがある。このようなペプチドは、ファージディスプレイなどの最新技術による方法を用いることによって作製され得る。基本的には、ファージの形態などでペプチドのライブラリーを作製し、この種のライブラリーを標的分子、本発明の場合、例えばCCL2またはCCR2と接触させる。次いで、それぞれの反応から標的分子と結合するペプチドを、好ましくは標的分子との複合体として取り出す。結合特性が少なくともある程度、具体的に実施する実験の設定、例えば塩濃度などに左右されることは当業者に公知である。高い親和性または強い力で標的分子と結合するペプチドをライブラリーの非結合メンバーから分離し、このほか任意選択で、標的分子とペプチドとの複合体から標的分子を除去した後、それぞれのペプチド（1つまたは複数）を特徴付け得る。特徴付けの前に、任意選択で、例えば、ペプチドをコードするファージを増殖させることによって、増幅段階を実施する。特徴付けは、好ましくは、標的結合ペプチドのシーケンシングを含む。基本的には、ペプチドの長さに制限はないが、好ましくは、それぞれの方法で約8～20アミノ酸の長さを有するペプチドを得るのが好ましい。ライブラリーの大きさは、約 $10^2 \sim 10^{18}$ 、好ましくは $10^8 \sim 10^{15}$ の異なるペプチドの規模であり得るが、これに限定されない。

【0113】

特異的抗体の製造は当業者に公知であり、例えば、Harlow, E. および Lane, D., 'Antibodies: A Laboratory Manual,' Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988)に記載されている。好ましくは、CesarおよびMilsteinのプロトコルならびにそれを土台としたさらなる開発に従って製造され得るモノクローナル抗体を本発明に関連して使用し得る。本明細書で使用される抗体としては、プロテインキナーゼNベータとの結合に適し実際に結合することができる限り、完全抗体、抗体のフラグメントまたは誘導体、例えばFabフラグメント、Fcフラグメ

10

20

30

40

50

ントおよび一本鎖抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。モノクローナル抗体のほかにも、ポリクローナル抗体を使用および／または作製し得る。ポリクローナル抗体の作製も当業者に公知であり、例えば、Harlow, E. および Lane, D., ‘ ‘ Antibodies: A Laboratory Manual, ’ ’ Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988) に記載されている。治療目的で使用する抗体は、上で定義されるようなヒト化抗体またはヒト抗体であるのが好ましい。

【0114】

アプタマーとは、一本鎖または二本鎖のいずれかであり、標的分子、例えば本発明の場合は CCL2 または CCR2 と特異的に相互作用する D-核酸のことである。アプタマーの製造または選択については、例えば欧州特許第 0533838 号に記載されている。基本的には、以下の段階を実施する。まず、核酸、すなわち、アプタマーである可能性がある核酸の混合物を準備し、ここでは、各核酸は通常数個、好ましくは 8 個の後続するランダムなヌクレオチドのセグメントを含む。次いで、この混合物を標的分子と接触させ、ここでは、核酸（1 つまたは複数）は、候補混合物に比して標的に対する親和性が高いことにより標的分子と結合したり、候補混合物よりも強い力で標的分子と結合したりする。次いで、結合している核酸（1 つまたは複数）を混合物の残りのものから分離する。任意選択で、このようにして得られた核酸（1 つまたは複数）を、例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅させる。上記の段階を数回繰り返すと、最終的には、標的と特異的に結合する核酸の割合が増大した混合物を得ることができ、次いで任意選択で、その混合物から最終的な結合核酸を選択する。これらの特異的に結合する核酸（1 つまたは複数）がアプタマーと称されるものである。アプタマー作製または同定する方法のいずれの段階でも、個々の核酸の混合物の試料を取り出し、標準的技術を用いてその配列を決定し得ることは明らかである。アプタマーを、例えば、アプタマー作製の当業者に公知の定義された化学基を導入することなどによって安定化させ得ることは、本発明の範囲内にある。このような修飾は、例えば、糖部分のヌクレオチドの 2' 位へのアミノ基導入にみられ得る。

【0115】

Spiegelmer は、アプタマーの 1 つとほぼ同じ原理に基づくものである。Spiegelmer の製造については、国際特許出願第 98/08856 号に記載されている。Spiegelmer は L-核酸であり、このことは、Spiegelmer が、アプタマーのように D-ヌクレオチドからなるアプタマーとは異なり、L-ヌクレオチドからなることを意味する。Spiegelmer は生体系において安定性が極めて高いほか、アプタマーと同程度の特異性で、Spiegelmer が標的とする分子と相互作用することを特徴とする。

【0116】

本発明の様々な態様を実施するのに好ましい Spiegelmer は、本明細書では、本発明の核酸分子とも称される。

【0117】

本発明の核酸分子は、本明細書ではボックスとも称されるヌクレオチドストレッチの点から特徴付けることができる。核酸分子の種類によってヌクレオチドストレッチは異なる。一般に、本発明の核酸分子は 5' 末端および 3' 末端のヌクレオチドストレッチ、すなわち、第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5' 末端ヌクレオチドストレッチおよび 3' 末端ヌクレオチドストレッチとも称される）を有する。第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチは、原理的にはその塩基相補性により、互いにハイブリダイズすることが可能であり、これによりハイブリダイゼーション時に二本鎖構造が形成される。しかし、生理的および／または非生理的な条件下では、分子内でこ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。核酸分子の 3 つのヌクレオチドストレッチ、すなわち、第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチは互いに 5' → 3' 方向に、すなわち、第一の末端ヌクレオチドストレッチー中央ヌ

クレオチドストレッチー第二の末端ヌクレオチドストレッチの順で配置されている。ただし、別の場合には、第二の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第一の末端ヌクレオチドストレッチが互いに5'→3'方向に配置されている。

【0118】

「ストレッチ」および「ヌクレオチドストレッチ」という用語は、本明細書では、そうでないことが明記されない限り、同義語として使用される。

【0119】

本発明による核酸が核酸分子であることは、本発明の範囲内にある。この限りにおいて、核酸および核酸分子という用語は、本明細書では、そうでないことが明記されない限り、同義語として使用される。

【0120】

本発明による核酸が2つ以上のストレッチを含む、あるいはその一部分（1つまたは複数）が原理的には互いにハイブリダイズし得ることは、本発明の範囲内にある。このようなハイブリダイゼーションが起こると、二本鎖構造が形成される。当業者には、特に *in vitro* および／または *in vivo* の条件下では、このようなハイブリダイゼーションが起こることも、起こらないこともあり得ることが認められよう。また、このようなハイブリダイゼーションが起こる場合、少なくとも塩基対形成の規則に基づいて、このようなハイブリダイゼーション、ひいては二本鎖構造の形成が原理的には起こり得る2つのストレッチが、必ずしもその全長にわたってハイブリダイズするとは限らない。本明細書で好んで使用される二本鎖構造とは、核酸分子または2つ以上の別個の鎖もしくは単一の鎖の核酸分子内で空間的に分離した2つのストレッチによって形成される構造の一部分のことであり、ここでは、好ましくはワトソン・クリック型塩基対形成の規則に従った塩基対が少なくとも1つ、好ましくは2つ以上存在する。当業者にはこのほか、フーグスティーン型塩基対などの他の塩基対形成がこのような二本鎖構造内に存在するか、このような二本鎖構造を形成し得ることが認められよう。ほかにも、2つのストレッチがハイブリダイズする様相は、このようなハイブリダイゼーションがその2つのストレッチの塩基相補性によって起こると推測されるものであるのが好ましいことが認められるはずである。

【0121】

好ましい実施形態では、本明細書で使用される配置という用語は、本明細書に開示される核酸に関連して本明細書に記載される構造的または機能的な特徴または要素の順序または配列を意味する。

【0122】

当業者には、本発明による核酸がCCL2と結合することが可能であることが認められよう。いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、本発明者らは、CCL2との結合は、特許請求される核酸分子の三次元構造的な特徴または要素が組み合わさることによって生じるものであり、このような特徴または要素は、それを形成するヌクレオチドの一次配列の方向および折畳みパターンによって生じるものと推測し、ここでは、このような特徴または要素は、CCL2結合核酸分子の第一の末端ヌクレオチドストレッチ、中央ヌクレオチドストレッチおよび第二の末端ヌクレオチドストレッチであるのが好ましい。個々の特徴または要素は、様々な異なる個々の配列によって形成され得るものであり、その多様性の程度は、そのような要素または特徴が形成することになる三次元構造に応じて変化し得ることは明らかである。特許請求される核酸の全体的な結合特性は、様々な要素および特徴の相互作用から生じるものであり、最終的には、特許請求される核酸とその標的、すなわちCCL2との相互作用を生じさせる。同じく、いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、CCL2結合核酸の特徴である中央ヌクレオチドストレッチは、特許請求される核酸分子とCCL2との結合の仲介に重要であると思われる。したがって、本発明による核酸はそれぞれ、CCL2との相互作用に適している。また当業者には、本発明による核酸がCCL2に対するアンタゴニストであることが認められよう。このため、本発明による核酸はそれぞれ、CCL2に関連するかこれを原因とする、任意の疾患または病態の治療および予防に適している。このような疾患および病態は、前記疾

患および病態にそれぞれ C C L 2 が関与または関連することを確立する先行技術から導き出されるものであり得、このような先行技術を参照により本明細書に組み込むことにより、本発明による核酸の治療的使用に科学的根拠が与えられる。

【0123】

本発明による核酸はほかにも、本明細書に開示される特定の配列に実質的に相同な核酸を含み得る。「実質的に相同な」という用語は、好ましくは、相同性が少なくとも 75 %、好ましくは 85 %、より好ましくは 90 %、最も好ましくは 95 % 超、96 % 超、97 % 超、98 % 超または 99 % 超であると理解されるべきである。

【0124】

本発明による参照ヌクレオチド配列または参照核酸分子に対して、本発明による核酸分子中に存在する相同なヌクレオチドの実際の百分率は、核酸分子中に存在するヌクレオチドの総数に左右される。修飾のパーセントは、核酸分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づくものであり得る。好ましくは、本発明の核酸分子の相同なヌクレオチドは、リボヌクレオチドおよび 2' -デオキシリボヌクレオチドを含む群から選択される。

【0125】

2つの核酸分子の間の相同性は、当業者に公知の通りに求めることができる。より具体的には、配列比較アルゴリズムを用いて、指定のプログラムパラメータに基づき参照配列に対する被験配列（1つまたは複数）のパーセント配列相同性を計算し得る。被験配列は、好ましくは、異なる核酸分子と相同であると考えられる核酸分子または相同であるかどうか、相同である場合どの程度相同であるかを検討する核酸分子の配列であり、ここでは、そのような異なる核酸分子は参照配列とも称される。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 37、配列番号 67～配列番号 71、配列番号 57～配列番号 61、配列番号 73、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 27 および配列番号 28 のいずれか 1 つに記載される核酸分子である。例えば、Smith および Waterman の局所ホモロジーアルゴリズム（Smith および Waterman, 1981）、Needleman および Wunsch の相同性アライメントアルゴリズム（Needleman および Wunsch, 1970）、Pearson および Lipman の類似性検索法（Pearson および Lipman, 1988）、コンピュータによる上記アルゴリズムの実行（Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., マディソン、ウィスコンシン州) の GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA) または視認によって、比較のための最適アライメントを実施することができる。

【0126】

パーセント配列同一性を求めるのに適したアルゴリズムの一例には、ベーシックローカルアライメント検索ツール（以下「BLAST」）に用いられるアルゴリズムがあり、例えば、Altschul ら（Altschul ら, 1990；および Altschul ら, 1997）を参照されたい。BLAST 解析を実施するためのソフトウェアは米国立生物工学情報センター（以下「NCBI」）により公開されている。このソフトウェアを用いて配列同一性を求めるのに使用する初期パラメータは NCBI から入手可能であり、例えば、BLASTN（ヌクレオチド配列用）および BLASTP（アミノ酸配列用）が McGinnis ら（McGinnis ら, 2004）に記載されている。

【0127】

本発明の核酸または本発明による核酸という用語は、本明細書に開示される核酸配列またはその一部分も、好ましくはその核酸または前記部分が C C L 2 との結合に関与する限り含み得る。

【0128】

本発明による核酸はこのほか、本明細書に開示され、そのヌクレオチド配列によって定められる核酸に対してある程度の同一性を有する核酸を含み得る。より好ましくは、本発明はほかにも、本明細書に開示され、そのヌクレオチド配列またはその一部分によって定

められる核酸に対して少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%超、96%超、97%超、98%超または99%超の同一性を有する核酸分子を含む。

【0129】

本明細書で好んで使用される本発明の核酸という用語は、一実施形態では、CCL2ならびにCCL8、CCL13およびCCL11を含む群から選択される任意の分子と結合するのに適した核酸も含み得る。当業者には、本発明による個々の核酸が1つまたは複数のこのような分子と結合することが認められよう。本発明による核酸の結合動態は、国際特許出願第2007/093409号に示されるように、既に明らかにされている。

【0130】

一実施形態では、本明細書に記載される核酸分子のうちの1つあるいはその誘導体および/または代謝産物は短縮されており、ここでは、このような誘導体および/または代謝産物は、好ましくは、本明細書に記載される核酸分子に比して短縮されている核酸である。短縮はこのほか、本明細書に開示される核酸の一方の末端または両末端に関連し得る。短縮はこのほか、核酸の内側のヌクレオチド配列に関連し得る、すなわち、短縮は5'末端ヌクレオチドと3'末端ヌクレオチドそれぞれの間にあるヌクレオチド(1つまたは複数)に関連し得る。さらに、短縮は、本明細書に開示される核酸の配列のわずか1個のヌクレオチド欠失を含み得る。短縮はほかにも、本発明の核酸(1つまたは複数)の2つ以上のストレッチに関連するものであり得、ここでは、ストレッチは長さがわずか1ヌクレオチドであり得る。本発明による核酸と、好ましくはCCL2、CCL8、CCL13およびCCL11を含む群から選択される分子との結合は、当業者がルーチンの実験を用いて、あるいは好ましくは本明細書の実施例の部に記載される通りに本明細書に記載される方法を使用または採用することによって、判定することができる。本明細書で本発明による核酸とCCL2との結合に言及する場合は必ず、それは本発明による核酸と、MCP-2、MCP-4およびエオタキシンを含む群から選択される任意の分子との結合にも当てはまることは、そうでないことが明記されない限り、本発明の実施形態の範囲内にある。

【0131】

このほか、本明細書に全体が記載される個々のおよび任意の核酸分子が、その核酸配列(1つまたは複数)の点で特定のヌクレオチド配列(1つまたは複数)に限定されることは本発明の実施形態の範囲内にある。換言すれば、「～を含む」という用語は、このような実施形態では「～を含んでいる」または「～からなる」という意味で解釈されるべきである。

【0132】

本明細書で使用されるL-核酸またはL-核酸分子とは、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のことである。

【0133】

本明細書で使用されるD-核酸またはD-核酸分子とは、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のことである。

【0134】

また本明細書には、そうでないことが明記されない限り、いずれのヌクレオチド配列も5'→3'方向に記載される。

【0135】

本明細書で好んで使用されるヌクレオチドの位置はいずれも、配列、ストレッチまたはサブストレッチの5'末端に対して相対的に決定または言及されるものである。したがって、第二のヌクレオチドとは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの5'末端から数えて2番目のヌクレオチドのことである。また、それに従えば、最後から2番目のヌクレオチドとは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの3'末端から数えて2番目のヌクレオチドのことである。

【0136】

本発明の核酸がD-ヌクレオチドからなるのか、L-ヌクレオチドからなるのか、両者の組合せからなるのかに関係なく、また両者の組み合わせが、例えば、ランダムな組合せであるのか、少なくとも1つのL-ヌクレオチドと少なくとも1つのD-核酸とからなる定められたストレッチの配列であるのかに関係なく、核酸は、デゾキシリボヌクレオチド（1つまたは複数）、リボヌクレオチド（1つまたは複数）またはその組合せからなるものであり得る。

【0137】

いくつかの理由から、本発明の核酸をL-核酸として設計するのが有利である。L-核酸は天然に存在する核酸の鏡像体である。しかし、D-核酸は水溶液中、特にヌクレアーゼが広く存在する生体系または生物試料中ではあまり安定ではない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞のヌクレアーゼはL-核酸を分解することができない。このため、動物およびヒトの体内を含めたこのような系では、L-核酸の生物学的半減期が大幅に長くなる。L-核酸には分解性がないため、ヌクレアーゼ分解産物は全く生成せず、したがって、それにより生じる副作用は全く認められない。このような側面があることから、L-核酸は、MCP-1の存在に関連する疾患および／または障害の治療に用いられる事実上すべての他の化合物とは一線を画するものとなっている。ワトソン・クリック型塩基対形成とは異なる機序を介して標的分子と特異的に結合するL-核酸または一部もしくは全体がL-ヌクレオチドからなるアプタマー、特にL-ヌクレオチドの部分がアプタマーと標的分子との結合に関与するアプタマーは、Spiegelmerとも称される。アプタマー自体は当業者に公知であり、特に「The Aptamer Handbook」(Klusmann編, 2006)に記載されている。

【0138】

このほか、本発明による核酸が、D-核酸、L-核酸またはD、L-核酸のいずれとして存在するかに関係なく、あるいはDNAまたはRNAのいずれであるかに関係なく、一本鎖または二本鎖の核酸として存在し得ることは本発明の範囲内にある。本発明の核酸は通常、一次配列によって明確な二次構造を示し、ひいてはさらに三次構造を形成し得る、一本鎖の核酸である。しかし、本発明の核酸はほかにも、2本の鎖が、2本の別個の鎖であっても、あるいは好ましくは共有結合により互いに結合していても、互いに相補的または部分的に相補的であり、互いにハイブリダイズし得るという意味で、二本鎖であり得る。

【0139】

本発明の核酸は修飾され得る。このような修飾は核酸の単一ヌクレオチドに関するものであり得、当該技術分野で周知である。このような修飾の例は、特にVenkatesan(2003)、Kusser(2000)およびKlusmann(2006)に記載されている。このような修飾は、本発明の核酸の一部分である個々のヌクレオチドの2'位におけるH原子、F原子またはO-CH₃基もしくはNH₂基であり得る。このほか、本発明による核酸は少なくとも1つのLNAヌクレオチドを含み得る。一実施形態では、本発明による核酸はLNAヌクレオチドからなる。

【0140】

本発明による核酸分子の結合定数は、本発明による核酸が好ましいKD値の範囲を示すという上記の発見を裏付ける実施例3および5に記載される方法を用いることによって求めることができる。個々の核酸分子と標的(本発明の場合、CCL2)との間の結合の強さを表すのに適した尺度がいわゆるKD値であり、このKD値そのものを求める方法も当業者に公知である。

【0141】

好ましくは、本発明による核酸によって示されるKD値は1 μM未満である。約1 μMのKD値が、核酸と標的との非特異的結合に特徴的なものである考えられている。当業者に認められるように、本発明による核酸などの1群の化合物のKD値は、ある特定の範囲内に収まる。上記の約1 μMのKDがKD値の好ましい上限値である。標的と結合する核酸のKDの下限値は、約10ピコモル程度であっても、これより大きい値であってもよい。

。C C L 2 と結合する個々の核酸の K D 値がこの範囲内に収まるのが好ましいことは、本発明の範囲内にある。好ましい範囲は、この範囲内にある任意の 1 つ目の数値およびこの範囲内にある任意の 2 つ目の数値を選択することによって定めることができる。好ましい K D 上限値は 2 5 0 n M および 1 0 0 n M であり、好ましい K D 下限値は 5 0 n M、1 0 n M、1 n M、1 0 0 p M および 1 0 p M である。より好ましい K D 上限値は 2 . 5 n M であり、より好ましい K D 下限値は 1 0 0 p M である。

【0142】

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、それぞれの標的分子（本発明の場合、C C L 2）の機能を阻害する。C C L 2 の機能、例えばそれぞれの受容体 C C R 2 の刺激の阻害は、本発明による核酸分子と C C L 2 が結合し、本発明による核酸分子と C C L 2 の複合体を形成することによって達成される。このような核酸分子と C C L 2 の複合体は、通常であれば C C L 2 によって刺激される受容体 C C R 2 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、C C L 2 によって刺激され得るそれぞれの受容体に依存するのではなく、本発明による核酸分子が C C L 2 による受容体の刺激を妨げることによって生じるものである。

【0143】

本発明による核酸分子の阻害定数は、本発明による核酸が、前記核酸を治療処置スキームに使用することを可能にする好ましい阻害定数を示すという上記の発見を裏付ける実施例 4 に記載される方法を用いることによって、求めることができる。標的（本発明の場合、C C L 2 と受容体 C C R 2）の相互作用に対する個々の核酸分子の阻害作用の強さを表すのに適した尺度がいわゆる半数最大阻害濃度（略記 I C 5 0）であり、この I C 5 0 そのものを求める方法も当業者に公知である。

【0144】

好ましくは、本発明による核酸分子によって示される I C 5 0 値は 1 μ M 未満である。約 1 μ M の I C 5 0 値が、核酸分子による標的機能の非特異的阻害に特徴的なものであると考えられている。当業者に認められるように、本発明による核酸分子などの 1 群の化合物の I C 5 0 値は、ある特定の範囲内に収まる。上記の約 1 μ M の I C 5 0 が I C 5 0 値の好ましい上限値である。標的と結合する核酸分子の I C 5 0 の下限値は、約 1 0 ピコモル程度であっても、これより大きい値であってもよい。C C L 2 と結合する個々の核酸の I C 5 0 値がこの範囲内に収まるのが好ましいことは、本発明の範囲内にある。好ましい範囲は、この範囲内にある任意の 1 つ目の数値およびこの範囲内にある任意の 2 つ目の数値を選択することによって定めることができる。好ましい I C 5 0 上限値は 2 5 0 n M および 1 0 0 n M であり、好ましい I C 5 0 下限値は 5 0 n M、1 0 n M、1 n M、1 0 0 p M および 1 0 p M である。より好ましい I C 5 0 上限値は 2 . 5 n M であり、より好ましい I C 5 0 下限値は 1 0 0 p M である。

【0145】

本発明による核酸分子は、標的分子と結合することが可能である限り、いかなる長さであってもよい。当業者には、本発明による核酸に好ましい長さがあることが認められよう。通常、その長さは 1 5 ~ 1 2 0 ヌクレオチドである。当業者には、1 5 ~ 1 2 0 までの任意の整数が本発明による核酸の長さとして考えられることが認められよう。本発明による核酸の長さとしてより好ましい範囲は、約 2 0 ~ 1 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 8 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 6 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 5 0 ヌクレオチドおよび約 3 0 ~ 5 0 ヌクレオチドの長さである。

【0146】

本明細書に開示される核酸が、好ましくは高分子量部分であって、かつ／または好ましくは特に動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間の点で核酸の特徴を修飾する部分を含むことは、本発明の範囲内にある。このような修飾の特に好ましい実施形態は、本発明による核酸の P E G 化および H E S 化である。本明細書で使用される P E G は、ヒドロキシエチルデンプンのポリ（エチレングリコール）および H E S を意味する。本明細書で好んで使用される P E G 化は、本発明による核酸と結合した P E G 部分からなる、本発明に

よる核酸の修飾である。本明細書で好んで使用されるH E S 化は、本発明による核酸と結合したH E S 部分からなる、本発明による核酸の修飾である。直鎖ポリ（エチレン）グリコール、分岐ポリ（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、ポリオキシアミダート、ポリ（2－ヒドロキシエチル）－L－グルタミンおよびポリエチレングリコールなどの修飾ならびにこのような修飾を用いて核酸を修飾する工程については、欧州特許出願第1306382号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0147】

P E Gが上記のような高分子量部分である場合、その分子量は、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。H E Sが上記のような高分子量部分である場合、その分子量は、好ましくは約50～約1000kDa、より好ましくは約100～約700kDa、最も好ましくは200～500kDaである。H E Sは、モル置換度が0.1～1.5、より好ましくは1～1.5であり、C2/C6比で表される置換試料が約0.1～1.5、好ましくは約3～10である。H E S修飾の工程については、例えば独国特許出願第12004006249.8号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0148】

修飾は原理的には、本発明の核酸分子の任意の位置に施すことができる。好ましくは、このような修飾を核酸分子の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のいずれかに施す。

【0149】

修飾、好ましくはP E Gおよび／またはH E S部分は、本発明の核酸分子と直接結合していても、好ましくはリンカーを介して、間接的に結合していてもよい。このほか、本発明による核酸分子が1つまたは複数の修飾、好ましくは1つまたは複数のP E G部分および／またはH E S部分を含むことは、本発明の範囲内にある。一実施形態では、個々のリンカー分子が、2つ以上のP E G部分またはH E S部分と本発明による核酸分子とを結合させている。本発明に関連して使用されるリンカー自体は、直鎖状であっても分岐鎖上であってもよい。この種のリンカーは当業者に公知であり、さらには国際公開第2005/074993号および国際公開第2003/035665号の特許出願に記載されている。

【0150】

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。生分解性リンカーでは、本発明による核酸から修飾が解離するため、特に動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間の点で本発明による核酸の特徴を修飾することが可能になる。生分解性リンカーを使用することにより、本発明による核酸の滞留時間をより良好に制御することが可能になり得る。このような生分解性リンカーの好ましい実施形態には、特に限定されないが、国際公開第2006/052790号、同第2008/034122号、同第2004/092191号および同第2005/099768号の国際特許出願に記載されている生分解性リンカーがある。

【0151】

修飾または修飾基が生分解性修飾であり、その生分解性修飾は、本発明の核酸分子と直接結合していても、好ましくはリンカーを介して、間接的に結合していてもよいことは、本発明の範囲内にある。生分解性修飾では、本発明による核酸から修飾が解離または分解されるため、特に動物体内、好ましくはヒト体内での滞留時間の点で本発明による核酸の特徴を修飾することが可能になる。生分解性修飾を使用することにより、本発明による核酸の滞留時間をより良好に制御することが可能になり得る。このような生分解性修飾の好ましい実施形態には、特に限定されないが、国際公開第2002/065963号、同第2003/070823号、同第2004/113394号および同第2000/41647号の国際特許出願、好ましくは国際公開第2000/41647号の18ページ、4

10

20

30

40

50

～ 24 行目に記載されている生分解性修飾がある。

【0152】

上記のような修飾以外にも、他の修飾を用いて本発明による核酸の特徴を修飾してもよく、このような他の修飾は、タンパク質、コレステロールなどの脂質およびアミラーゼ、デキストランなどの糖などの群より選択され得る。

【0153】

いかなる理論にも束縛されることを望むものではないが、高分子量部分、例えばポリマー、より具体的には、本明細書に開示され、好ましくは生理的に許容される、1つまたは複数のポリマーなどで本発明による核酸を修飾することにより、排泄動態が変化するものと思われる。より具体的には、このように修飾された本発明の核酸は分子量が増大し、特に本発明の核酸がL型である場合、代謝作用を受けないため、動物体内、好ましくは哺乳動物体内、より好ましくはヒト体内からの排泄が低下するものと思われる。排泄は通常、腎臓を通じて起こるため、本発明者らは、このように修飾された核酸の糸球体濾過量がこの種の高分子量修飾を受けていない核酸に比して大幅に減少するため、動物体内での滞留時間が増大するものと推測する。それに関連して特に注目すべき点として、このような高分子量修飾を受けているにもかかわらず、本発明による核酸の特異性が悪影響を受けない点がある。この限りにおいて、本発明による核酸は特に、薬理活性化合物には通常期待することができない驚くべき特徴を有するため、本発明による核酸を徐放させるのに、徐放のための医薬製剤を必ずしも必要としない。それどころか、高分子量部分を含む修飾形態の本発明による核酸は、それが修飾されていることにより、それ自体が既に徐放性製剤から放出された場合と同じように作用するため、既に徐放性製剤として使用することができる。この限りにおいて、本明細書に開示される本発明による核酸分子の修飾（1つまたは複数）およびこのように修飾された本発明による核酸分子ならびにそれを含む任意の組成物は、その明確で、好ましくは制御された薬物動態および生体内分布をもたらし得る。これには循環血中での滞留時間および組織への分散が含まれる。このような修飾については、国際公開第2003/035665号の特許出願に詳細に記載されている。

【0154】

ただし、本発明による核酸が修飾、特にPEG化またはHES化などの高分子量の修飾を一切含まないも本発明の範囲内にある。このような実施形態は、本発明による核酸が体内の任意の標的器官もしくは組織に選択的な分布を示す場合または本発明による核酸が投与後に体内から迅速に除去されることが望まれる場合に特に好ましい。本明細書に開示される本発明による核酸であって、体内の任意の器官または組織に選択的な分布プロファイルを有する核酸であれば、標的組織に効果的な局所濃度を確保しつつ、全身の核酸濃度を低く維持することが可能になる。これにより、経済的な観点から有益であるのみならず、他の組織が不必要に核酸薬剤に曝露されるのを抑え、ひいては副作用のリスクの可能性を低下させる低用量の使用が可能になる。特に、本発明による核酸またはそれを含む薬剤を用いて、*in vivo*撮像または特定の治療的投与を実施する場合、本発明による核酸が投与後に体内から迅速に除去されるのが望ましいものと考えられる。

【0155】

本発明による核酸および／または本発明によるアンタゴニストは、薬剤の作製または製造に使用され得る。本発明によるこのような薬剤または医薬組成物は、少なくとも1つの本発明の核酸を、任意選択でさらなる薬理活性化合物とともに含有し、ここでは、本発明の核酸は薬理活性化合物そのものとして作用するのが好ましい。このような薬剤は、好ましい実施形態では、少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む。このような担体は、例えば、水、緩衝液、PBS、グルコース溶液、好ましくは5%グルコース平衡塩類溶液、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り得る。このような担体は一般に当業者に公知である。当業者には、本発明の薬剤の任意の実施形態、使用および態様または本発明の薬剤に関連する任意の実施形態、使用および態様はほかに、本発明の医薬組成物に適用可能であり、その逆も同様であることが認められよう。

【0156】

本明細書で好んで使用される「併用療法」または「同時療養」は、2剤以上の治療剤、すなわち、本発明の薬剤と第二の薬剤の共同作用から有益な効果を得ることを目的とする治療計画の一環として、本発明の薬剤と、少なくとも1剤の第二の薬剤との投与を含む。これらの薬剤のそのままでの、または組み合わせでの投与は通常、定められた期間の間（通常、選択される組合せに応じて数分間、数時間、数日間または数週間）実施される。

【0157】

「併用療法」は、一般にはないことであるが、偶然に任意に本発明の組合せとなる別個の単独療法計画の一環として2剤以上の治療剤の投与を包含することが意図される場合もある。「併用療法」は、これらの治療剤を連続的に投与すること、すなわち、各治療剤を異なる時間に投与することのほかにも、これらの治療剤、すなわち少なくとも2剤の治療剤を実質的に同時に投与することを包含することが意図される。実質的な同時投与は、例えば、各治療剤を一定の比率で含む単一カプセルを対象に投与するか、各治療剤の単一カプセルを対象に複数個投与することによって遂行することができる。

10

【0158】

治療剤の連続投与または実質的な同時投与は、特に限定されないが、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からの直接吸収を含めた任意の適切な経路によって実施することができる。治療剤は、同じ経路により投与しても、異なる経路により投与してもよい。例えば、治療効果のある薬剤の特定の組合せのうち第一の治療剤を注射により投与し、組合せのうち他方または他の治療剤を局所的に投与してもよい。

【0159】

あるいは、例えば、全治療剤を局所的に投与してもよく、また全治療剤を注射により投与してもよい。治療剤を投与する順序は、別途言及されない限り、重要なものではない。併用療法が非薬物治療をさらに含む場合、非薬物治療は、治療剤と非薬物治療との組合せから有益な効果が得られる限り、任意の適切な時間に実施してよい。例えば、適切な場合、非薬物治療を一時的に、場合によっては数日ないし数週間中止し、その一方で治療剤は依然として投与する場合でも、依然として有益な効果を得ることができる。

20

【0160】

上で一般論として概説したように、本発明による薬剤は原理的には、当業者に公知の任意の形態で投与することができる。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による投与、好ましくは注射による投与である。あるいは、薬剤を局所投与してもよい。その他の投与経路には、筋肉内、腹腔内、皮下、経口、鼻腔内、気管内および経肺があるが、効果が得られると同時に最も侵襲性が少ない投与経路が好ましい。

30

【0161】

非経口投与は一般に、皮下注射、筋肉内注射または静脈内注射および注入に用いられる。さらに、非経口投与の方法の1つに、一定レベルの投与量が確実に維持され、当業者に周知である、緩徐放出または徐放システムの埋植を用いるものがある。

【0162】

さらに、本発明の好ましい薬剤は、当業者に公知である、適切な鼻腔内賦形剤、吸入剤の局所使用による鼻腔内経路または経皮パッチの形態を用いる経皮経路によって投与することができる。経皮送達システムの形態で投与するには通常、投与を中断するのではなく、投与計画全体を通じて継続する。その他の好ましい局所の製剤としては、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、エアロゾルスプレーおよびゲル剤が挙げられる。

40

【0163】

本発明の薬剤は一般に、治療に効果的な量の活性成分（1つまたは複数）、特に限定されないが、好ましくは薬学的に許容される媒体に溶解または分散させた、本発明の核酸分子を含めた活性成分を含む。薬学的に許容される媒体または担体としては、任意のあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。薬理活性物質にこのような媒体および薬剤を使用することは当該技術分野で周知である。このほか、本発明の薬剤に補助的な有効成分を組み込んでもよい。

【0164】

50

さらなる態様では、本発明は医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、少なくとも1つの本発明による核酸と、好ましくは薬学的に許容される賦形剤とを含む。このような賦形剤は、当該技術分野で使用され、かつ／または知られている任意の賦形剤または任意の結合剤であり得る。より具体的には、このような結合剤または賦形剤は、本明細書に開示される薬剤の製造に関連して記載される任意の結合剤または賦形剤である。さらなる実施形態では、医薬組成物は、さらなる薬理活性物質を含む。

【0165】

薬剤および医薬組成物の調製はそれぞれ、本開示を踏まえれば当業者にわかるものである。このような組成物は通常、液体または懸濁液のいずれか：注射前に溶解または懸濁させるのに適した固体形態の注射剤として；錠剤をはじめとする経口投与用の固形物として；時間放出カプセル剤として；点眼剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、吸入剤などを含めた現在用いられているその他の任意の形態で調製され得る。このほか、外科医、内科医または医療従事者が手術野の特定の領域を治療するのに生理食塩水ベースの洗浄剤などの滅菌製剤を使用するのは特に有用である。このほか、微小装置、微粒子またはスポンジにより組成物を送達してもよい。

【0166】

製剤化すると、剤形に適合した方法で、かつ薬学的に効果的な量で薬剤が投与される。製剤は、上記の種類の注射用液剤などの様々な剤形で容易に投与されるが、ほかにも、薬物放出カプセルなどを用いてもよい。

【0167】

本発明による薬剤はこのほか、時間放出型および徐放型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のような経口剤形で投与することができる。坐剤は、脂肪を含む乳剤または懸濁剤から調製するのが有利である。

【0168】

本発明による医薬組成物または薬剤は、無菌であり、かつ／または保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を調節する塩および／または緩衝剤などの補助剤を含有するものであり得る。さらに、本発明による医薬組成物または薬剤はほかにも、治療に価値のあるその他の物質を含有し得る。組成物は、従来の混合法、造粒法またはコーティング法に従って調製され、通常、約0.1%～75%、好ましくは約1%～50%の有効成分を含有する。

【0169】

液体、特に注射用組成物は、例えば、溶解させること、分散させることなどによって調製することができる。活性化合物を薬学的に純粋な溶媒、例えば水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、グリセロール、エタノールなどに溶かすか、これと混合して、注射可能な溶液または懸濁液を形成する。さらに、注射前に液体に溶解させるのに適した固体形態を製剤化することができる。

【0170】

本発明の薬剤および核酸分子はそれぞれほかにも、小型の一枚膜小胞、大型の一枚膜小胞および多重膜小胞などのリポソーム送達システムの形態で投与することができる。リポソームは、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様々なリン脂質から形成することができる。いくつかの実施形態では、当業者に周知のように、脂質成分の薄膜を薬物の水溶液と水和させて、薬物を封入した脂質を形成させる。例えば、本発明による核酸分子を、当該技術分野で公知の方法を用いて構築した脂溶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、リポソームの表面にこのような核酸分子を担持させて標的化し、内部に細胞殺作用を仲介する細胞毒性薬を含ませてもよい。核酸結合複合体の一例が米国特許第6,011,020号に記載されている。

【0171】

本発明の薬剤および核酸分子はそれぞれほかにも、標的化可能な薬物担体としての可溶

性ポリマーと結合させ得る。このようなポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、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ジンを挙げ得る。さらに、本発明の薬剤および核酸分子をそれぞれ、薬物の放出制御を達成するのに有用なクラスの生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリイブシロンカプロラクトン、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、ポリシアノアクリラートおよび架橋したまたは両親媒性のヒドロゲルブロックコポリマーと結合させ得る。

【0172】

本明細書に開示されるいずれかの疾患の治療には、本発明による核酸の効果的な血漿中濃度の範囲は、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。

10

【0173】

本発明の核酸分子および薬剤はそれぞれ、好ましくは、1日1回、隔日または2日置きに1回、週1回、隔週1回、月1回または2か月置きに1回投与し得る。

【0174】

本明細書に記載される薬剤が本明細書に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にある。

【0175】

当業者には、CCL2のアンタゴニストとして作用する核酸分子について上に記載したことが、好ましくは、任意のCCL2のアンタゴニスト、特に本明細書に開示される薬理活性化合物のクラスにも同様に適用されることが理解されよう。

20

【0176】

本明細書で好んで使用される治療という用語は、好ましい実施形態では、治療に加えて、またはこれに代えて、予防および／または追跡を含む。

【0177】

本明細書で好んで使用される疾患および障害という用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。

【0178】

本明細書で好んで使用されるCCL2およびMCP-1という用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。

30

【0179】

本明細書で好んで使用されるCCL8およびMCP-2という用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。

【0180】

本明細書で好んで使用されるCCL11およびエオタキシンという用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。

【0181】

本明細書で好んで使用されるCCL13およびMCP-4という用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。

40

【0182】

本明細書で好んで使用されるNOX-E36およびemaptipcap pegolという用語は、そうでないことが明記されない限り、互換的に使用されるものとする。NOX-E36のヌクレオチド配列、NOX-E36のPEG部分およびNOX-E36のヌクレオチド配列とNOX-E36のPEG部分とを連結するリンカーを表1、配列番号228に明記する。

【0183】

種々の配列番号、本発明による核酸分子および本明細書で使用される標的分子CCL2の化学的性質、その実際の配列ならびに内部参照番号を下の表にまとめる。

【0184】

50

【表 1】

配列番号	RNA／ペプチド	配列	内部参照
1	L-タンパク質	QPDAINAPVTCCYNFTNR KISVQRLASYRRITSSKC PKEAVIFKTIVAKEICAD PKQKWVQDSMDHLDKQTQ TPKT	ヒトMCP-1、huMCP-1、CCL2
2	L-RNA	CSUCCCUACCCGGUGCAA GUGAAGCCGYGGCUC	
3	L-RNA	AGNDRDGBKGGURGYARG UAAAG	
4	L-RNA	AGGUGGGUGGUAGUAAGU AAAG	
5	L-RNA	CAGGUGGGUGGUAGAAUG UAAAGA	

6	L-RNA	GGGGGRCGCGAYC	
7	L-RNA	UGCAAUAAUG	
8	L-タンパク質	GPASVPTTCCFNLANRKI PLQRLESYRRITSGKCPQ KAVIFKTKLAKDICADPK KKWVQDSMKYLDQKSPTP KP	ヒトエオタキシシ/CCL1 1
9	L-タンパク質	QPDSVSIPITCCFNVINR KIPIQRLESYTRITNIQC PKEAVIFKTKRGKEVCAD PKERWVRDSMKHLDQIFQ NLKP	ヒトMCP-2、CCL8、h uMCP-2
10	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	169-B1trc
11	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UUGCACGCU	169-F3trc
12	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGUAA UAAUGCACGCU	169-C1trc
13	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UAAUGCGCGCU	169-A3trc
14	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUAGCA GGGGGGCGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	169-B2trc
15	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUA GGGGGGCGCGAUCUACAA UUGCACGCU	176-B12trc
16	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGACA GGGGGGCGCGACCUGCAU UUGCACGCU	176-D9trc
17	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGCGCGACCUGUAU UUGCACGCU	176-B10trc
18	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGGCGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	169-F2trc
19	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGCGCGACCUGCAA UUGCACGCU	176-B9trc
20	L-RNA	AGCAUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGCGCGACCUGCAU UUGCAUGCU	176-H9trc
21	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUA GGGGGGCGCGACCUACAU UUGCACGCU	176-E10trc

10

20

30

40

22	L-RNA	AGUGUGCCAGCUGUGAUG GGGGGGCGCGACCCAUUU UACACACU	176-G9 t r c
23	L-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUU ACACACU	176-F9 t r c
24	L-RNA	AGUGUGCGAGCGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUU ACAUAUCU	176-C11 t r c
25	L-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUU ACAUAUCU	176-E11 t r c
26	L-RNA	AGUAUGCCAGCGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUA CAUAUCU	176-D10 t r c
27	L-RNA	AGUGUGCCAGUGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUU ACACACU	176-H10 t r c
28	L-RNA	AGCGUGCCAGUGUGAUGG GGGGGGCGCGACCCAUUUU ACACGCU	176-C9 t r c
29	L-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGCGGC UCUGCGU	180-B1-001
30	L-RNA	ACGCACCUCCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGCGC	180-A4-002
31	L-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGCGU	180-D1-002
32	L-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGCGU	180-D1-011
33	L-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGC	180-D1-012
34	L-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGC	180-D1-018
35	L-RNA	CGCACGUCCCUCACCGGU GCAAGUGAAGCCGUGGCU CUGCGU	180-D1-034
36	L-RNA	CGCACGUCCCUCACCGGU GCAAGUGAAGCCGUGGCU CUGCG	180-D1-035
37	L-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGCG	180-D1-036

10

20

30

40

38	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAAUGACAGCCGA AUGCUGGCAGCAC	178-A8
39	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAAUGACAGCCUA AUGCUGGCAGCAC	178-F7
40	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUUAUGACAGCCGA AUGCUGGCAGCAC	178-G7
41	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAA CUACUGCCAGUGGGUCAG AGCUAGCAGCAC	178-C6
42	L-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAA CUCCCUAAGACAGGCCAG AGCCGGCAGCAC	178-E7
43	L-RNA	GUGCUGCGGAGUUGAAAA CUCCCUAAGACAGGCCAG AGCCGGCAGCAC	178-G6
44	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAUGACAGCCUAA UGCUGGCAGCAC	178-A7
45	L-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAA CUCCCUAAGACAGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-C7
46	L-RNA	GUGCUGCGGCGUGAAAAA CGCCCUGCGACUGCCCUU UAUGCAGGCAGCAC	178-E5
47	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-F1
48	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAGA CUACCUGUGACAGCCGAA UGCUGGCAGCAC	181-B2
49	L-RNA	GUACUGCGUAGUUAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-C2
50	L-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-A6
51	L-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAGCGACAGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-D6
52	L-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAGCGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-D5
53	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAGAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-A2

10

20

30

40

5 4	L-RNA	GGCUGCGUAGUUAAAAAC UACCAGCGACUGGCUAGA GCCGGCAGCC	1 7 8-D 5-0 2 0
5 5	L-RNA	GGCGCGUAGUUAAAAACU ACCAGCGACUGGCUAGAG CCGGCGCC	1 7 8-D 5-0 2 7
5 6	L-RNA	GUGCGCGUAGUUAAAAAC UACCAGCGACUGGCUAGA GCCGGCGCAC	1 7 8-D 5-0 3 0
5 7	L-RNA	GUGCGCGUAGUGAGAAAC UACCAACGACUGGCUAGA GCCGGCGCAC	1 8 1-A 2-0 0 2
5 8	L-RNA	GUGCCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGGCAC	1 8 1-A 2-0 0 4
5 9	L-RNA	GUGGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCCAC	1 8 1-A 2-0 0 5
6 0	L-RNA	GUCGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCGAC	1 8 1-A 2-0 0 6
6 1	L-RNA	UGC GCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCGCA	1 8 1-A 2-0 0 7
6 2	L-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCAGC	1 8 1-A 2-0 0 8
6 3	L-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCAGC	1 8 1-A 2-0 1 1
6 4	L-RNA	GGUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCACC	1 8 1-A 2-0 1 2
6 5	L-RNA	UGGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCCA	1 8 1-A 2-0 1 5
6 6	L-RNA	GCGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCGC	1 8 1-A 2-0 1 6
6 7	L-RNA	GUGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCAC	1 8 1-A 2-0 1 7
6 8	L-RNA	GG-GCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCCC	1 8 1-A 2-0 1 8
6 9	L-RNA	GAGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCUC	1 8 1-A 2-0 1 9

10

20

30

40

70	L-RNA	CGGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCCG	181-A2-020
71	L-RNA	CGGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCCG	181-A2-021
72	L-RNA	CAGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCUG	181-A2-022
73	L-RNA	CUGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCAG	181-A2-023
74	L-RNA	AGCGUGUUAGUGAAGUGG GUGGCAGGUAAGGACAC GCU	184-B8 t r c
75	L-RNA	AGCGUGGUAGCGGUGUGG GUGGUAGGUAAGGCCAC GCU	184-C6 t r c
76	L-RNA	AGCGUGAUAGAAGAGCGG GUGGUAGGUAAGGUCAG GCU	184-H5 t r c
77	L-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUG GUAGUAAGUAAAGGACAC GCU	184-A7 t r c
78	L-RNA	AGCGUGUUAGGUGGGUGG UAGUAAGUAAAGGACACG CU	187-A5 t r c
79	L-RNA	AGCGUGUUAGGUGGGUGG UAGUAAGUAAAGGGCACG CU	187-H5 t r c
80	L-RNA	CCGCUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGGGCGG	174-D4-004
81	L-RNA	GCGCGAGCAGGUGGGUGG UAGAAUGUAAAGACUCGC GUC	166-A4-002
82	L-RNA	CGUGUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGACACG	187-A5 t r c-001
83	L-RNA	GUGUUAGGUGGGUGGUAG UAAGUAAAGGACAC	187-A5 t r c-002
84	L-RNA	CGUGUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGGCACG	187-H5 t r c-002
85	L-RNA	GUGUUAGGUGGGUGGUAG UAAGUAAAGGGCAC	187-H5 t r c-003
86	L-RNA	UGUUAGGUGGGUGGUAGU AAGUAAAGGGCA	187-H5 t r c-004
87	L-RNA	GGACGAGAGUGACAAAUG AUAUAACCUCCUGACUAA CGCUGCGGGCGACAGG	177-B3

10

20

30

40

88	L-RNA	GGACCUAUCGCUAAGACA ACGCGCAGUCUACGGGAC AUUCUCCGCGGACAGG	177-C1
89	L-RNA	GGACAAUUGUUACCCCG AGAGAGACAAAUGAGACA ACCUCCUGAAGACAGG	177-C2
90	L-RNA	GGACGAAAGUGAGAAAUG AUACAACCUCCUGUUGCU GCGAAUCCGGACAGG	177-E3
91	L-RNA	GGACGUAAAAGACGCUAC CCGAAAGAAUGUCAGGAG GGUAGACCGACAGG	177-D1
92	L-RNA	GGACUAGAAACUACAAUA GCGGCCAGUUGCACCGCG UUAUCAACGACAGG	177-E1
93	L-RNA	GGACUAGUCAGCCAGUGU GUAUAUCGGACGCGGGUU UAUUUACUGACAGG	177-A1
94	L-RNA	GGACUGUCCGGAGUGUGA AACUCCCCGAGACCGCCA GAAGCGGGGACAGG	177-G3
95	L-RNA	GGACUUCUAUCCAGGUGG GUGGUAGUAUGUAAAGAG AUAGAAGUGACAGG	177-C3
96	L-RNA	GGACGAGAGCGAACAAUG AUAUAACCUCCUGACGGA AAGAGAUCGACAGG	177-A2
97	L-RNA	CCUGUGCUACACGCAGUA AGAAGUGAACGUUCAGUA UGUGUGCACAGG	170-E4 t r c
98	L-RNA	CGUGAGCCAGGCACCGAG GGCGUUAACUGGCUGAUU GGACACGACACG	166-D2 t r c
99	L-RNA	CGUGAACAUUGCAAGCUAA GCGGGGCUGUUGGUUGCU UGGCCCGCCACG	174-A2 t r c
100	L-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAA CCACGUAAAAUCAACCUA AUGGGCCGCACG	174-E2 t r c
101	L-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAA CCACGUAAAAUCAACCUA AUGGGCCGCACG	183-G3 t r c
102	L-RNA	CGUGAACAUUCAAGCUAA GCGGGGCUGUUGGUUGCU UGGCCCGCCACG	183-B2 t r c
103	L-RNA	CGUGCCGAGGCGGCGACC AGCGUUACUUAGAGAGGC UUUGGCACCACG	166-B2 t r c

10

20

30

40

104	L-RNA	CGUGAUAAACAGCCGUCGG UCAAGAAAACAAAGUUCG GGCGGCGCACG	166-G3 t r c
105	L-RNA	CGUGGGUGGCGCACCGAG GGCGAAAAGCCACCAGUA AAGAUAGACCG	166-D1 t r c
106	L-RNA	CGUGUGAUCUCCUUUGGG GUGAUUAGCUUAGAGACU UCCCACACG	183-H2 t r c
107	L-RNA	GCACCUUCGCCUAAUACA CGUGCCGGCUAGCUAAUA CUCGUCCGC	167-A7 t r c
108	L-RNA	GCACGACUUGGGCGACCA GUGAUACUUAGAGAGCAA GUCGUCCGC	167-C7 t r c
109	L-RNA	GCGCGCGCUCAGUAAGAA AUUGAAAGUUCAGAAUGU CGUCGCGC	167-B5 t r c
110	L-RNA	AGUGUGUGGCAGGCUAAG GAGAUAUUCCGAGACCAC GCU	184-D7 t r c
111	L-RNA	AGUGUGUGGCAGACUAUG GAUAGACUCCGAGACCAC GCU	184-D6 t r c
112	L-RNA	AGCGUGAGGCGACCAGCG GAUUACUUAGAGAGUCAC GCU	184-E5 t r c
113	L-RNA	AGCGUGAAGGGGACCAGC GUUACUUACAGAGUUCAC GCU	184-G6 t r c
114	L-RNA	AGCGUGUGAUGUAUGUAG CACCGUAUCAGAGGACAC GCU	184-B7 t r c
115	L-RNA	AGCGUGAGGCGACCCGUG UUUCGUAGAGAGUCACGC U	184-B6 t r c
116	L-RNA	5' PEG-GCACGUCCCUCA CCGGUGCAAGUGAAGCCG UGGCUCUGCG	NOX-E36-5' PEG
117	L-RNA	GCACGUCCCUACCCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGCG-3' PEG	NOX-E36-3' PEG
118	L-RNA	GGGGGGCGCGACC	
119	D-タンパク質	ビオチン-QPDAINAPVTCCY NFTNRKISVQRLASYRRI TSSKCPKEAVIFKTIVAK EICADPKQKWVQDSMDHL DKQTQTPKT	ビオチン化ヒトD-MCP- 1

10

20

30

40

1 2 0	L-RNA	CGUCCCUACCCGGUGCAA GUGAAGCCGUGGCUC	
1 2 1	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	1 6 9-B 1 t r c
1 2 2	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UUGCACGCU	1 6 9-F 3 t r c
1 2 3	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGACGCGACCUGUAA UAAUGCACGCU	1 6 9-C 1 t r c
1 2 4	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGACGCGACCUGCAA UAAUGCGCGCU	1 6 9-A 3 t r c
1 2 5	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUAGCA GGGGGGGCGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	1 6 9-B 2 t r c
1 2 6	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUA GGGGGGGCGCGAUCUACAA UUGCACGCU	1 7 6-B 1 2 t r c
1 2 7	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGACA GGGGGGGCGCGACCUGCAU UUGCACGCU	1 7 6-D 9 t r c
1 2 8	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGGCGCGACCUGUAU UUGCACGCU	1 7 6-B 1 0 t r c
1 2 9	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCA GGGGGGGCGCGACCUGCAA UAAUGCACGCU	1 6 9-F 2 t r c
1 3 0	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGGCGCGACCUGCAA UUGCACGCU	1 7 6-B 9 t r c
1 3 1	D-RNA	AGCAUGCCCGGUGUGGCA GGGGGGGCGCGACCUGCAU UUGCAUGCU	1 7 6-H 9 t r c
1 3 2	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUA GGGGGGGCGCGACCUACA UUGCACGCU	1 7 6-E 1 0 t r c
1 3 3	D-RNA	AGUGUGCCAGCUGUGAUG GGGGGGGCGCGACCCAUUU UACACACU	1 7 6-G 9 t r c
1 3 4	D-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGG GGGGGGGCGCGACCCAUUUU ACACACU	1 7 6-F 9 t r c
1 3 5	D-RNA	AGUGUGCGAGCGUGAUGG GGGGGGGCGCGACCCAUUUU ACAUACU	1 7 6-C 1 1 t r c
1 3 6	D-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGG	1 7 6-E 1 1 t r c

10

20

30

40

		GGGGGCGCGACCCAUUUU ACAUACU	
137	D-RNA	AGUAUGCCAGCGUGAUGG GGGGGCGCGACCCAUUUA CAUACU	176-D10 t r c
138	D-RNA	AGUGUGCCAGUGUGAUGG GGGGGCGCGACCCAUUUU ACACACU	176-H10 t r c
139	D-RNA	AGCGUGCCAGUGUGAUGG GGGGGCGCGACCCAUUUU ACACGCU	176-C9 t r c
140	D-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGCGGC UCUGCGU	180-B1-001
141	D-RNA	ACGCACCUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGCGC	180-A4-002
142	D-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGCGU	180-D1-002
143	D-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGCGU	180-D1-011
144	D-RNA	ACGCACGUCCCUCACCGG UGCAAGUGAAGCCGUGGC UCUGC	180-D1-012
145	D-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGC	180-D1-018
146	D-RNA	CGCACGUCCCUCACCGGU GCAAGUGAAGCCGUGGCU CUGCGU	180-D1-034
147	D-RNA	CGCACGUCCCUCACCGGU GCAAGUGAAGCCGUGGCU CUGCG	180-D1-035
148	D-RNA	GCACGUCCCUCACCGGUG CAAGUGAAGCCGUGGCUC UGCG	180-D1-036
149	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAAUGACAGCCGA AUGCUGGCAGCAC	178-A8
150	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAAUGACAGCCUA AUGCUGGCAGCAC	178-F7
151	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUUAUGACAGCCGA AUGCUGGCAGCAC	178-G7
152	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAA	178-C6

10

20

30

40

		CUACUGCCAGUGGGUCAG AGCUAGCAGCAC	
153	D-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAA CUCCCUAAGACAGGCCAG AGCCGGCAGCAC	178-E7
154	D-RNA	GUGCUGCGGAGUUGAAAA CUCCCUAAGACAGGCCAG AGCCGGCAGCAC	178-G6
155	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGA CUACCUAUGACAGCCUAA UGCUGGCAGCAC	178-A7
156	D-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAA CUCCCUAAGACAGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-C7
157	D-RNA	GUGCUGCGGCGUGAAAAA CGCCCUAGCGACUGCCCUU UAUGCAGGCAGCAC	178-E5
158	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-F1
159	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAGA CUACCUUGUGACAGCCGAA UGCUGGCAGCAC	181-B2
160	D-RNA	GUACUGCGUAGUUAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-C2
161	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-A6
162	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAGCGACAGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-D6
163	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAA CUACCAGCGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	178-D5
164	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAGAAA CUACCAACGACUGGCUAG AGCCGGCAGCAC	181-A2
165	D-RNA	GGCUGCGUAGUUAAAAAC UACCAGCGACUGGCUAGA GCCGGCAGCC	178-D5-020
166	D-RNA	GGCGCGUAGUUAAAAACU ACCAGCGACUGGCUAGAG CCGGCGCC	178-D5-027
167	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAAC UACCAGCGACUGGCUAGA GCCGGCGCAC	178-D5-030
168	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAGAAAC	181-A2-002

10

20

30

40

		UACCAACGACUGGCUAGA GCCGGCGCAC	
169	D-RNA	GUGCCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGGCAC	181-A2-004
170	D-RNA	GUGGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCCAC	181-A2-005
171	D-RNA	GUCGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCGAC	181-A2-006
172	D-RNA	UGCGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCGCA	181-A2-007
173	D-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCAGC	181-A2-008
174	D-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCAGC	181-A2-011
175	D-RNA	GGUGCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCAC	181-A2-012
176	D-RNA	UGGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGC-CA	181-A2-015
177	D-RNA	GCGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCGC	181-A2-016
178	D-RNA	GUGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCAC	181-A2-017
179	D-RNA	GG-GCGUAGUGAGAAACU ACCAACGACUGGCUAGAG CCGGCCC	181-A2-018
180	D-RNA	GAGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCUC	181-A2-019
181	D-RNA	CGGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCCG	181-A2-020
182	D-RNA	CCGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCGG	181-A2-021
183	D-RNA	CAGCGUAGUGAGAAACUA CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCUG	181-A2-022
184	D-RNA	CUGCGUAGUGAGAAACUA	181-A2-023

10

20

30

40

		CCAACGACUGGCUAGAGC CGGCAG	
185	D-RNA	AGCGUGUUAGUGAAGUGG GUGGCAGGUAAAGGACAC GCU	184-B8 t r c
186	D-RNA	AGCGUGGUAGCGGUGUGG GUGGUAGGUAAAGGCCAC GCU	184-C6 t r c
187	D-RNA	AGCGUGAUAGAAGAGCGG GUGGUAGGUAAAGGUCAG GCU	184-H5 t r c
188	D-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUG GUAGUAAGUAAAGGACAC GCU	184-A7 t r c
189	D-RNA	AGCGUGUUAGGUGGGUGG UAGUAAGUAAAGGACACG CU	187-A5 t r c
190	D-RNA	AGCGUGUUAGGUGGGUGG UAGUAAGUAAAGGGCACG CU	187-H5 t r c
191	D-RNA	CCGCUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGGGCGG	174-D4-004
192	D-RNA	GCGCGAGCAGGUGGGUGG UAGAAUGUAAAGACUCGC GUC	166-A4-002
193	D-RNA	CGUGUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGACACG	187-A5 t r c-001
194	D-RNA	GUGUUAGGUGGGUGGUAG UAAGUAAAGGACAC	187-A5 t r c-002
195	D-RNA	CGUGUUAGGUGGGUGGUA GUAAGUAAAGGGCACG	187-H5 t r c-002
196	D-RNA	GUGUUAGGUGGGUGGUAG UAAGUAAAGGGCAC	187-H5 t r c-003
197	D-RNA	UGUUAGGUGGGUGGUAGU AAGUAAAGGGCA	187-H5 t r c-004
198	D-RNA	GGACGAGAGUGACAAAUG AUUAACCUCUGACUAA CGCUGCGGGCGACAGG	177-B3
199	D-RNA	GGACCUAUCGCUAAGACA ACGCGCAGUCUACGGGAC AUUCUCCGCGGACAGG	177-C1
200	D-RNA	GGACAAUUGUUACCCCCG AGAGAGACAAAUGAGACA ACCUCCUGAAGACAGG	177-C2
201	D-RNA	GGACGAAAGUGAGAAAUG AUACAACCUCUGUUGCU GCGAAUCCGGACAGG	177-E3
202	D-RNA	GGACGUAAAAGACGCUAC	177-D1

10

20

30

40

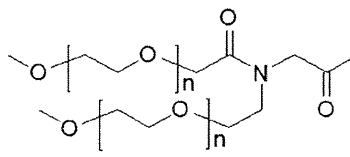
		CCGAAAGAAUGUCAGGAG GGUAGACCGACAGG	
203	D-RNA	GGACUAGAAACUACAAUA GCGGCCAGUUGCACCGCG UUAUCAACGACAGG	177-E1
204	D-RNA	GGACUAGUCAGCCAGUGU GUAUAUCGGACGCGGGUU UAUUUACUGACAGG	177-A1
205	D-RNA	GGACUGUCCGGAGUGUGA AACUCCCCGAGACCGCCA GAAGCGGGGACAGG	177-G3
206	D-RNA	GGACUUCUAUCCAGGUGG GUGGUAGUAUGUAAAGAG AUAGAAGUGACAGG	177-C3
207	D-RNA	GGACGAGAGCGAACA AUG AUAUAACCUCCUGACGGA AAGAGAUCGACAGG	177-A2
208	D-RNA	CCUGUGCUACACGCAGUA AGAAGUGAACGUUCAGUA UGUGUGCACAGG	170-E4 t r c
209	D-RNA	CGUGAGCCAGGCACCGAG GGCGUUAACUGGCUGAUU GGACACGACACG	166-D2 t r c
210	D-RNA	CGUGAACAUUGCAAGCUAA GCGGGGCUGUUGGUUGCU UGGCCCGCCACG	174-A2 t r c
211	D-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAA CCACGUAAAAUCAACCUA AUGGGCCGCACG	174-E2 t r c
212	D-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAA CCACGUAAAAUCAACCUA AUGGGCCGCACG	183-G3 t r c
213	D-RNA	CGUGAACAUUCAAGCUAA GCGGGGCUGUUGGUUGCU UGGCCCGCCACG	183-B2 t r c
214	D-RNA	CGUGCCGAGGCGGCGACC AGCGUUACUUAGAGAGGC UUUGGCACCACG	166-B2 t r c
215	D-RNA	CGUGAUAAACAGCCGUCGG UCAAGAAAACAAAGUUCG GGCGGCGCACG	166-G3 t r c
216	D-RNA	CGUGGGUGGCGCACCGAG GGCGAAAAGCCACCAGUA AAGAUAGACCG	166-D1 t r c
217	D-RNA	CGUGUGAUCUCCUUUGGG GUGAUUAGCUUAGAGACU UCCCACACG	183-H2 t r c
218	D-RNA	GCACCUUCGCCUAAUACA	167-A7 t r c

10

20

30

40

		CGUGCCGGCUAGCUAAUA CUCGUCCGC	
219	D-RNA	GCACGACUUGGGCGACCA GUGAUACUUAGAGAGCAA GUCGUCCGC	167-C7 t r c
220	D-RNA	GCGCGCGCUCAGUAAGAA AUUGAAAGUUCAGAAUGU CGUCGCGC	167-B5 t r c
221	D-RNA	AGUGUGUGGCAGGCUAAG GAGAUAUUCCGAGACCAC GCU	184-D7 t r c
222	D-RNA	AGUGUGUGGCAGACUAUG GAUAGACUCCGAGACCAC GCU	184-D6 t r c
223	D-RNA	AGCGUGAGGCGACCAAGCG GAUUACUUAGAGAGUCAC GCU	184-E5 t r c
224	D-RNA	AGCGUGAAGGGGACCAAGC GUUACUUACAGAGUUCAC GCU	184-G6 t r c
225	D-RNA	AGCGUGUGAUGUAUGUAG CACCGUAUCAGAGGACAC GCU	184-B7 t r c
226	D-RNA	AGCGUGAGGCGACCCGUG UUUCGUAGAGAGUCACGC U	184-B6 t r c
227	L-タンパク質	FNPQGLAQPDA LNVPSTC CFTFSSKKI SLQRLKSYV ITTSRCPQKAVIFRTKL KEICADPKEKWVQNYMKH LGRKAHTLKT	CCL13/MCP-4
228	L-RNA	RNHC6H12O-GCACGUCC CUCACCGGUGCAAGUGAA GCCGUGGCUCUGCG 式中、Rは  であり、nは400～500、好ましくは420～470、より好ましくは450である。	NOX-E36/emamt icap pegol

10

20

30

40

【0185】

さらなる態様では、本発明は疾患を治療する方法に関するものであり、ここでは、この方法は、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して本明細書で定められ開示されるアンタゴニストを対象に投与することを含み、対象には、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められる蛋白尿が認められる。

【0186】

さらなる態様では、本発明は、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められるCCL2のアンタゴニストの薬剤製造への使用に関するものであり、

50

ここでは、薬剤は対象の疾患の治療および／または予防のためのものであり、対象には、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められる蛋白尿が認められる。

【0187】

またさらなる態様では、本発明は、薬学的に許容される添加剤と、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められるCCL2のアンタゴニストとを含む、医薬組成物に関するものであり、ここでは、医薬組成物は対象の疾患の治療および／または予防のためのものであり、対象には、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められる蛋白尿が認められる。

【0188】

別の態様では、本発明は、対象が本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められるCCL2のアンタゴニストによる治療に感受性であるかどうかを判定する方法に関するものであり、ここでは、この方法は、対象に本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められる蛋白尿が認められるかどうかを判定することを含み、対象に本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められる蛋白尿が認められる場合、その対象は、本発明のそれぞれのおよび任意の態様および実施形態に関連して定められるCCL2のアンタゴニストによる治療に感受性であるとする。

【0189】

本発明は、さらなる特徴、実施形態および利点が理解され得る図面、実施例および配列表によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0190】

【図1】「1A型」のMCP-1結合核酸分子の配列アライメントを示す図である。

【図2】「1B型」のMCP-1結合核酸分子の配列アライメントを示す図である。

【図3】「2型」のMCP-1結合核酸分子およびMCP-1結合核酸分子180-D1-002の誘導体の配列アライメントを示す図である。

【図4】「3型」のMCP-1結合核酸分子の配列アライメントを示す図である。

【図5】MCP-1結合核酸分子178-D5および181-A2（「3型」のMCP-1結合核酸分子）の誘導体を示す図である。

【図6】「4型」のMCP-1結合核酸分子の配列アライメントを示す図である。

【図7】他のMCP-1結合核酸分子に加えて、5型MCP-1結合核酸分子とも称される、さらなるMCP-1結合核酸分子を示す図である。

【図8】2型糖尿病患者51例からなるグループに化合物NOX-E36による治療を実施している期間および化合物NOX-E36の投与終了後84日間（追跡）にわたる経時的なACRを示す図である。

【図9】2型糖尿病患者51例からなるグループに化合物NOX-E36またはプラセボによる治療を実施している期間ならびに化合物NOX-E36およびプラセボの投与終了後84日間（追跡）にわたる経時的なACRを示す図である。

【図10】2型糖尿病患者51例からなるグループに化合物NOX-E36による治療を実施している期間および化合物NOX-E36の投与終了後28日間（追跡）にわたる経時的な血中HbA1c値を示す図である。

【図11】2型糖尿病患者51例からなるグループに化合物NOX-E36またはプラセボによる治療を実施している期間ならびに化合物NOX-E36およびプラセボの投与終了後28日間（追跡）にわたる経時的な血中HbA1c値を示す図である。

【図12】2型糖尿病患者75例からなるグループに化合物emapticappegol（NOX-E36）による治療を実施している期間および化合物NOX-E36の投与終了後28日間にわたる化合物NOX-E36の経時的な血漿中濃度を示す図である。

【図13】2型糖尿病患者75例からなるグループに化合物emapticappegol（NOX-E36）またはプラセボによる治療を実施している期間ならびに化合物N

10

20

30

40

50

OX-E36 およびプラセボの投与終了後84日間（追跡）にわたる経時的なACRを示す図である。

【図14】2型糖尿病患者75例からなるグループをプラセボ（左のバー）またはemapiticap pegol（NOX-E36）（中央のバー）のいずれかで治療し、85日目にベースラインACRと比較したACRのパーセント変化；および85日目に2型糖尿病患者75例からなるグループについて、NOX-E36で治療した前記患者のACRとプラセボで治療した前記患者のACRとを比較したときのACRの相対変化を示す図である。

【図15】2型糖尿病患者75例からなるグループにemapiticap pegol（NOX-E36）またはプラセボによる治療を実施している期間ならびに化合物NOX-E36 およびプラセボの投与終了後28日間（追跡）にわたる経時的な血中HbA1c値を示す図である。

【図16】2型糖尿病患者75例からなるグループをプラセボ（左のバー）またはemapiticap pegol（NOX-E36）（中央のバー）のいずれかで治療し、85日目にベースラインHbA1cと比較したHbA1cのパーセント変化；および85日目に2型糖尿病患者75例からなるグループについて、NOX-E36で治療した前記患者のHbA1cとプラセボで治療した前記患者のHbA1cとを比較したときのHbA1cの相対変化を示す図である。

【実施例】

【0191】

以下では、「核酸」および「核酸分子」は、そうでないことが明記されない限り、同義語として使用される。さらに、「ストレッチ」および「ヌクレオチドストレッチ」という用語は、そうでないことが明記されない限り、同義語として使用される。以下では、「MCP-1」および「CCL2」という用語は、そうでないことが明記されない限り、同義語として使用される。

【0192】

実施例1：ヒトMCP-1／CCL2と結合する核酸分子

ヒトMCP-1と結合するL-核酸分子およびそれぞれのヌクレオチド配列を図1～7に示す。これらの核酸分子は様々な配列モチーフを示し、このうち主要な4つの型は図1および2（1A型／1B型）、図3（2型）、図4および5（3型）ならびに図6（4型）で定められるものであり、互いに関連が認められず、上記の様々な配列モチーフにも関連が認められないまた別のMCP-1結合核酸分子は図7に列記され、5型とも称されるものである。

【0193】

ヌクレオチド配列モチーフを定義するにあたって、多義ヌクレオチドにIUPACの略号を用いる：

S 強い GまたはC；
W 弱い AまたはU；
R プリン GまたはA；
Y ピリミジン CまたはU；
K ケト GまたはU；
M イミノ AまたはC；
B Aではない CまたはUまたはG；
D Cではない AまたはGまたはU；
H Gではない AまたはCまたはU；
V Uではない AまたはCまたはG；
N すべて AまたはGまたはCまたはU

【0194】

核酸配列またはストレッチおよびボックスそれぞれの配列はいずれも、そうでないことが明記されない限り、5'→3'方向に示される。

【0195】

核酸分子にその結合動態による順位を付けるため、直接的競合プルダウンアッセイにビオチン化ヒト MCP-1 を用いて、核酸分子をアプタマーレベルで、すなわち D-核酸分子として特徴付けた（プロトコルは実施例 3 を参照されたい）。選択した配列を Spiegelmer として合成し（プロトコルは実施例 2 を参照されたい）、*in vitro* 走化性アッセイ（プロトコルは実施例 4 を参照されたい）に天然の立体配置の MCP-1（L-MCP）を用いて、あるいは Biacore 2000 機器を用いた表面プラズモン共鳴測定（プロトコルは実施例 5 を参照されたい）により試験した。

【0196】

1 A 型 MCP-1 結合核酸分子

図 1 に示されるように、1 A 型の MCP-1 結合核酸分子の配列はいずれも、ヌクレオチドの配列ストレッチまたはボックスを複数含み、ここでは、ボックス B1A および

B1B は、互いにハイブリダイズすることができる 5' 末端および 3' 末端ヌクレオチドストレッチ（第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二のヌクレオチドストレッチとも称される）である。しかし、実際に生理的条件下で存在する分子には、このようなハイブリダイゼーションが必ずしも起こるわけではない。ボックス B2、B3、B4、B5 およびボックス B6 にはボックス B1A およびボックス B1B が隣接している。

【0197】

定められたボックスの配列には、1 A 型の MCP-1 結合核酸同士の間で、MCP-1 との結合親和性に影響を及ぼす差が存在し得る。1 A 型 MCP-1 結合核酸としてまとめられる様々な MCP-1 結合核酸の結合解析に基づけば、ボックス B1A、B2、B3、B4、B5、B6 および B1B ならびに以下に記載するそのヌクレオチド配列はそれぞれが、より好ましくは全体として、MCP-1 との結合に不可欠なものである：

- ・ボックス B1A および B1B は第一および第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5' 末端および 3' 末端ヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ここでは、両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、B1A は AGCRUG、好ましくは AGCGUG であり、B1B は CRYGCU、好ましくは CACGCU であり；

- ・ボックス B2 は第一の中央ヌクレオチドストレッチであり、これは CCCGGW、好ましくは CCCGGU である；

- ・ボックス B3 は第二の中央ヌクレオチドストレッチであり、これは GUR、好ましくは GUG であり；

- ・ボックス B4 は第三の中央ヌクレオチドストレッチであり、これは RYA、好ましくは GUA であり；

- ・ボックス B5 は第四の中央ヌクレオチドストレッチであり、これは GGGGGRCCGAYC；好ましくは GGGGGCGCGACCC であり；

- ・ボックス B6 は第五の中央ヌクレオチドストレッチであり、これは UGCAAUAAUG または URYAWUUG、好ましくは UACAUUUG である。

【0198】

図 1 に示されるように、176-E10trc と称される核酸分子は MCP-1 との結合親和性が最も高く、 K_D は 5 nM であり（プロトコルは実施例 3 を参照されたい）、したがって、最適な配列ならびに配列要素 B1A、B2、B3、B4、B5、B6 および B1B の最適な組合せを構成し得る。

【0199】

1 B 型 MCP-1 結合核酸分子

図 2 に示されるように、1 B 型の配列はいずれも、ヌクレオチドの配列ストレッチまたはボックスを複数含み、ここでは、ボックス B1A および B1B は、互いにハイブリダイズすることができる 5' 末端および 3' 末端ヌクレオチドストレッチ（第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二のヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ボックス B2、B3、B4、B5 およびボックス B6 にはボックス B1A およびボックス B1B が隣接している。しかし、実際に生理的条件下で存在する分子には、このようなハイブリダ

10

20

30

40

50

イゼーションが必ずしも起こるわけではない。

【0200】

定められたボックスの配列には、1 B型のMCP-1結合核酸同士の間で、MCP-1との結合親和性に影響を及ぼす差が存在し得る。1 B型MCP-1結合核酸としてまとめられる様々なMCP-1結合核酸の結合解析に基づけば、ボックスB1A、B2、B3、B4、B5、B6およびB1Bならびに以下に記載するそのヌクレオチド配列はそれぞれが、より好ましくは全体として、MCP-1との結合に不可欠なものである：

- ・ボックスB1AおよびB1Bは第一および第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5'末端および3'末端ヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ここでは、両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、B1AはAGYRUG、好ましくはAGCGUGであり、B1BはCAYRCU、好ましくはCACGCUであり；

- ・ボックスB2は第一の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはCCAGCUまたはCCAGY、好ましくはCCAGUであり；

- ・ボックスB3は第二の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはGUGであり；

- ・ボックスB4は第三の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはAUGであり；

- ・ボックスB5は第四の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはGGGGGGCGCGACCであり；

- ・ボックスB6は第五の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはCAUUUAまたはCAUUUAであり、好ましくはCAUUUAである。

【0201】

図2に示されるように、176-C9trcと称される核酸はMCP-1との結合親和性が最も高く、 K_D は5 nMであり（プロトコルは実施例3を参照されたい）、したがって、最適な配列ならびに配列要素B1A、B2、B3、B4、B5、B6およびB1Bの最適な組合せを構成し得る。

【0202】

2型MCP-1結合核酸分子

図3に示されるように、2型の配列はいずれも、ヌクレオチドの配列ストレッチまたはボックスを複数含み、ここでは、ボックスB1AおよびB1Bは、互いにハイブリダイズすることができる5'末端および3'末端ヌクレオチドストレッチ（第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二のヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ボックスB2は中央配列要素である。しかし、実際に生理的条件下で存在する分子には、このようなハイブリダイゼーションが必ずしも起こるわけではない。

【0203】

定められたボックスの配列には、3型のMCP-1結合核酸同士の間で、MCP-1との結合親和性に影響を及ぼす差が存在し得る。2型MCP-1結合核酸としてまとめられる様々なMCP-1結合核酸の結合解析に基づけば、ボックスB1A、B2およびB1Bならびに以下に記載するそのヌクレオチド配列はそれぞれが、より好ましくは全体として、MCP-1との結合に不可欠なものである：

- ・ボックスB1AおよびB1Bは第一および第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5'末端および3'末端ヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ここでは、両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、ここでは、B1AがACGCAであり、かつB1BがUGC GUであるか、B1AがCGCAであり、かつB1BがUGC GUであるか、B1AがGCAであり、かつB1BがUGC GUまたはUGC GUであり；好ましくはB1AがGCAであり、かつB1BがUGC GUであり；

- ・ボックスB2は中央ヌクレオチドストレッチCSUCCUCACCGGUGCAAAGUGAAGCCG YGGCUC、好ましくはCGUCCUCACCGGUGCAAAGUGAAGCCGUGG CUCである。

【0204】

図3に示されるように、180-D1-002と称される核酸ならびに180-D1-011、180-D1-012、180-D1-035および180-D1-036のよ

うな180-D1-002の誘導体は、プルダウンアッセイまたは競合プルダウンアッセイではアプタマーとしてMCP-1との結合親和性が最も高く、 K_D が1 nM未満であり（プロトコルは実施例3を参照されたい）、したがって、最適な配列ならびに配列要素B1A、B2およびB1Bの最適な組合せを構成し得る。

【0205】

核酸分子180-D1-036は、解離定数（ K_D ）が室温では 890 ± 65 pM、 37°C では 146 ± 13 pMであることが明らかになった（プロトコルは実施例3を参照されたい）。それぞれのSpiegelmer 180-D1-036は、*in vitro* 走化性アッセイで約0.5 nMの阻害濃度（ IC_{50} ）を示した（プロトコルは実施例4を参照されたい）。Spiegelmer 180-D1-036のペグ化誘導体180-D1-036-3'PEGおよび180-D1-036-5'PEGは、走化性アッセイで IC_{50} が1 nM未満であることが明らかになり（プロトコルは実施例4を参照されたい）、一方、細胞培養実験ではSpiegelmer 180-D1-036-5'PEGとしてSpiegelmer NOX-E36を用いた。Spiegelmer NOX-E36（emapticap pegolとも称される）は、そのヌクレオチド配列に特異的なリンカーにより連結された40 kDa-PEGを含む、Spiegelmer 180-D1-036-5'PEGの特異的変異体である（表1；配列番号228を参照されたい）。

【0206】

3型MCP-1結合核酸分子

図4および5に示されるように、3型の配列はいずれも、ヌクレオチドの配列ストレッチまたはボックスを複数含み、ここでは、3対のボックスが3型MCP-1結合核酸に特徴的なものである。ボックスB1AとB1BおよびボックスB2AとB2BおよびボックスB5AとB5Bはともに、互いにハイブリダイズする能力を有する。しかし、実際に生理的条件下で存在する分子には、このようなハイブリダイゼーションが必ずしも起こるわけではない。ハイブリダイズする可能性のあるこれらの配列の間には、ボックスB3、ボックスB4およびボックスB6で定められるハイブリダイズしないヌクレオチドが位置している。

【0207】

定められたボックスの配列には、3型のMCP-1結合核酸同士の間で、MCP-1との結合親和性に影響を及ぼす差が存在し得る。3型MCP-1結合核酸としてまとめられる様々なMCP-1結合核酸の結合解析に基づけば、ボックスB1A、B2A、B3、B2B、B4、B5A、B6、B5B、B1Bならびに以下に記載するそのヌクレオチド配列はそれぞれが、より好ましくは全体として、MCP-1との結合に不可欠なものである：

- ・ボックスB1AおよびB1Bは第一および第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5'末端および3'末端ヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ここでは、両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、ここでは、B1AがGURCUGCであり、かつB1BがGCAGCACであり；好ましくはB1AがGUGCUGCであり、かつB1BがGCAGCACであるか；
- B1AがGKSYGCであり、かつB1BがGCRSMCであり；好ましくはB1AがGUGCGCであり、かつB1BがGCGCACであるか；
- B1AがKBBSCであり、かつB1BがGSVVMであり；好ましくはB1AがKKSSCであり、かつB1BがGSMMであるか；
- B1AがBNGCであり、かつB1BがGCNVであり；好ましくはB1AがSNGCであり、かつB1BがGCNSであり；最も好ましくはB1AがGGGCであり、かつB1BがGCCCであり；

- ・ボックスB2AおよびB2Bは第一および第三の中央ヌクレオチドストレッチであり、ここでは、両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、ここでは、B2AがGKM GUであり、かつB2BがACKMCであり；好ましくはB2AがG

U A G Uであり、かつB 2 BがA C U A Cであり；

・ボックスB 3は第二の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはK R R A R、好ましくはU A A A AまたはG A G A Aであり；

・ボックスB 4は第四の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはC U R Y G AまたはC U W A U G AまたはC W R M G A C WまたはU G C C A G U G、好ましくはC A G C G A C UまたはC A A C G A C Uであり；

・B 5 AおよびB 5 Bは第五および第七の中央ヌクレオチドストレッチであり、ここでは、両ストレッチは互いにハイブリダイズすることができ、B 5 AがG G Yであり、かつB 5 BがG C Y Rであり、一方、G C YはB 5 Aのヌクレオチドとハイブリダイズすることができるか；B 5 AがC W G Cであり、かつB 5 BがG C W Gであり；好ましくはB 5 AがG G Cであり、かつB 5 BがG C C Gであり；

・ボックスB 6は第六の中央ヌクレオチドストレッチであり、これはY A G AまたはC K A A UまたはC C U U U A U、好ましくはU A G Aである。

【0208】

図4および5に示されるように、178-D5と称される核酸とその誘導体178-D5-030ならびに181-A2とその誘導体181-A2-002、181-A2-004、181-A2-005、181-A2-006、181-A2-007、181-A2-017、181-A2-018、181-A2-019、181-A2-020、181-A2-021および181-A2-023はMCP-1との結合親和性が最も高い。178-D5および178-D5-030を直接的競合プルダウンアッセイでアダプターとして評価したところ（プロトコルは実施例3を参照されたい）、 K_D が約500 pMであった。同じ実験設定で、181-A2は K_D が約100 pMであることが明らかになった。Biacore解析（プロトコルは実施例5を参照されたい）により、181-A2とその誘導体のMCP-1に対する K_D は200～300 pMであることが明らかになった。培養細胞を用いた走化性アッセイ（プロトコルは実施例4を参照されたい）では、178-D5および181-A2はともに IC_{50} が500 pMと測定された。したがって、178-D5および181-A2とその誘導体は、最適な配列ならびに配列要素B1A、B2A、B3、B2B、B4、B5A、B6、B5BおよびB1Bの最適な組合せを構成し得る。

【0209】

4型MCP-1結合核酸

図6に示されるように、4型の配列はいずれも、ヌクレオチドの配列ストレッチまたはボックスを複数含み、ここでは、ボックスB1AおよびB1Bは、互いにハイブリダイズすることができる5'末端および3'末端ストレッチ（第一の末端ヌクレオチドストレッチおよび第二のヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ボックスB2は中央配列要素である。

【0210】

定められたボックスの配列には、4型のMCP-1結合核酸同士の間で、MCP-1との結合親和性に影響を及ぼす差が存在し得る。4型MCP-1結合核酸としてまとめられる様々なMCP-1結合核酸の結合解析に基づけば、ボックスB1A、B2およびB1Bならびに以下に記載するそのヌクレオチド配列はそれぞれが、より好ましくは全体として、MCP-1との結合に不可欠なものである；

・ボックスB1AおよびB1Bは第一および第二の末端ヌクレオチドストレッチ（5'末端および3'末端ヌクレオチドストレッチとも称される）であり、ここでは、両ストレッチは互いにハイブリダイズすることができ、ここでは、B1AがA G C G U G D Uであり、かつB1BがG N C A S G C Uであるか；B1AがG C G C G A Gであり、かつB1BがC U C G C G U Cであるか；B1AがC S K S U Uであり、かつB1BがG R S M S Gであるか；B1AがG U G U Uであり、かつB1BがG R C A Cであるか；B1AがU G U Uであり、かつB1BがG G C Aであり；好ましくはB1AがC S K S U Uであり、かつB1BがG R S M S Gであり；最も好ましくはB1AがC C G C U Uであり、かつB

1 BがG G G C G Gであり；

・ボックスB 2は中央ヌクレオチドストレッチであり、これはA G N D R D G B K G G U R G Y A R G U A A A GまたはA G G U G G G U G G U A G U A A G U A A A GまたはC A G G U G G G U G G U A G A A U G U A A A G A、好ましくはA G G U G G G U G G U A G U A A G U A A A Gである。

【0211】

図6に示されるように、174-D4-004と称される核酸および166-A4-002と称される核酸はMCP-1に対する結合親和性が最も高く、したがって、最適な配列ならびに配列要素B1A、B2およびB1Bの最適な組合せを構成し得る。

【0212】

その他のMCP-1結合核酸分子

さらに、図7に示される29種類の他のMCP-1結合核酸は、1～4型のMCP-1結合核酸で示されたヌクレオチド配列要素の組合せによって表すことができないものである。

【0213】

図1～7に示される配列はいずれも本発明による核酸分子であり、その短縮形態のみならず、その伸長形態も、このようにそれぞれ短縮および伸長された核酸分子が依然として標的と結合することができる限り、本発明による核酸分子に含まれることを理解すべきである。

【0214】

実施例2：アプタマーおよびSpiegelmerの合成および誘導体化

小規模合成

ABI 394合成装置（Applied Biosystems社、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）に2' TBDMS RNAホスホラミダイト反応（DamhaおよびOgilvie, 1993）を用いた固相合成法により、アプタマー（D-RNA核酸）およびSpiegelmer（L-RNA核酸）を作製した。D-立体配置およびL-立体配置のrA（N-Bz）-ホスホラミダイト、rC（Ac）-ホスホラミダイト、rG（N-ibu）-ホスホラミダイトおよびrU-ホスホラミダイトをChemGenes社（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から購入した。ゲル電気泳動によりアプタマーおよびSpiegelmerを精製した。

【0215】

大規模合成および修飾

AktaPilot100合成装置（Amersham Biosciences；General Electric Healthcare社、フライブルク）に2' TBDMS RNAホスホラミダイト反応（DamhaおよびOgilvie, 1993）を用いた固相合成法によりSpiegelmerを作製した。L-rA（N-Bz）-ホスホラミダイト、L-rC（Ac）-ホスホラミダイト、L-rG（N-ibu）-ホスホラミダイトおよびL-rU-ホスホラミダイトをChemGenes社（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から購入した。5'-アミノ修飾剤をAmerican International Chemicals社（フレイミングハム、マサチューセッツ州、米国）から購入した。孔径1000 ÅのL-riboG、L-riboC、L-riboAまたはL-riboU修飾CPG（Link Technology社、グラスゴー、英国）上で未修飾または5'-アミノ修飾Spiegelmerの合成を開始し、3'-NH₂修飾Spiegelmerには1000 Åの3'-Aminomodifier-CPG（ChemGenes社、ウィルミントン、マサチューセッツ州）を用いた。カップリング（1サイクル当たり15分）には、ベンジルチオテトラゾール（CMS-Chemicals社、アビンドン、英国）の0.3Mアセトニトリル溶液および3.5当量の各ホスホラミダイトの0.1Mアセトニトリル溶液を用いた。酸化-カップリングサイクルを用いた。さらに、Biosolve社（ファルケンスワート、オランダ）からオリゴヌクレオチド合成用の標準溶媒および試薬を購入した。SpiegelmerをDM

10

20

30

40

50

T-O-N合成し、脱保護した後、Source 15 RPC媒体 (Amersham社) を用いた分取RP-HPLCにより精製した (Wincottら, 1995)。80%酢酸で5' DMT基を除去した (室温で30分間)。次いで、2MのNaOAc水溶液を加え、5K再生セルロース膜 (Millipore社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を用いたタンジェンシャルフロー濾過によりSpiegelmerを脱塩した。

【0216】

SpiegelmerのPEG化

Spiegelmerのin vivoでの血漿中滞留時間を延ばすため、Spiegelmerの3'末端または5'末端に40kDaのポリエチレングリコール (PEG) 部分を共有結合させた。

10

【0217】

PEG化 (PEG化の方法の技術的詳細については欧州特許出願第1306382号を参照されたい) には、精製した5'-アミノまたは3'-アミノ修飾SpiegelmerをH₂O (2.5ml)、DMF (5ml) および緩衝液A (5ml; クエン酸・H₂O [7g]、ホウ酸 [3.54g]、リン酸 [2.26ml] および1M NaOH [343ml] を混合し、最終体積が1lになるまで水を加えて調製; 1M HClでpH=8.4に調整) の混合物に溶かした。

【0218】

1M NaOHでSpiegelmer溶液のpHを8.4にした。次いで、40kDa PEG-NHSエステル (Jenkem Technology社、アレン、テキサス州、米国) を最大収率が75~85%に達するまで、30分毎に0.25当量ずつ6回、37℃で加えた。PEG-NHSエステルを添加する間、1M NaOHで反応混合物のpHを8~8.5に保った。

20

【0219】

反応混合物と尿素溶液 (8M) 4ml および4ml 緩衝液B (0.1Mの酢酸トリエチルアンモニウム水溶液) とを混合し、15分間、95℃に加熱した。次いで、Source 15 RPC媒体 (Amersham社) にアセトニトリル勾配 (緩衝液B; 緩衝液C: 酢酸トリエチルアンモニウムの0.1Mアセトニトリル溶液) を用いたRP-HPLCにより、PEG化Spiegelmerを精製した。過剰なPEGを5%の緩衝液Cで溶離し、PEG化Spiegelmerを10~15%の緩衝液Cで溶離した。純度95%超 (HPLCにより評価) の生成物画分を合わせ、3MのNaOAc 40mlと混合した。タンジェンシャルフロー濾過 (5K再生セルロース膜、Millipore社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) によりPEG化Spiegelmerを脱塩した。

30

【0220】

実施例3: 結合定数の決定 (プルダウンアッセイ)

直接的プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイフォーマットで20℃または37℃にてアプタマーのD-MCP-1に対する親和性を測定した。[γ-³²P] 標識ATP (Hartmann Analytic社、ブラウンシュウィク、ドイツ) を用いて、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (Invitrogen社、カールスルーエ、ドイツ) によりアプタマーを5'-リン酸標識した。標識したアプタマーの比放射能は200,000~800,000cpm/pmolであった。アプタマーを変性および再生させた後、低濃度で平衡に達するように、選択緩衝液 (20mMトリス-HCl、pH7.4; 137mM NaCl; 5mM KCl; 1mM MgCl₂; 1mM CaCl₂; 0.1% [w/vol] Tween-20) 中、様々な量のビオチン化D-MCP-1とともに37℃、濃度20pMで4~12時間インキュベートした。使用したプラスチック製品または固定化基質の表面に結合パートナーが吸着するのを防ぐため、選択緩衝液に10μg/mlヒト血清アルブミン (Sigma-Aldrich社、シュタインハイム、ドイツ) および10μg/ml酵母RNA (Ambion社、オースチン、米国) を添加した。ビオチン化D-MCP-1の濃度の範囲を8pM~100nMに設定し、反応体積を1mlとした。選択緩衝液で予め平衡

40

50

化したStreptavidin Ultralink Plus粒子(Pierce Biotechnology社、ロックフォード、米国) 1.5 μ lにペプチドおよびペプチド-アプタマー複合体を固定化し、総体積6 μ lにして再懸濁させた。粒子をサーモミキサー中、各温度で30分間、懸濁状態で維持した。上清を傾瀉し、十分に洗浄した後、シンチレーションカウンターで固定化放射活性を測定した。結合の百分率をビオチン化D-MCP-1の濃度に対してプロットし、化学量論組成を1:1であると仮定してソフトウェアアルゴリズム(GRAFIT; Eritacus Software社; サリ州、英国)を用いることにより解離定数を求めた。

【0221】

競合プルダウンアッセイ

様々なD-MCP-1結合アプタマーを比較するため、競合させて順位を付けるアッセイを実施した。この目的のために、使用できるアプタマーのうち最もアフィンのものを放射標識し(上記を参照されたい)、参照として用いた。変性および再生させた後、選択緩衝液1ml中、競合させずにNeutrAvidinアガロースまたはStreptavidin Ultralink Plus(ともにPierce社製)に固定化し洗浄した後にペプチドとの結合が約5~10%になる条件下、37℃でビオチン化D-MCP-1とインキュベートした。変性および再生させた非標識D-RNAアプタマー変異体を様々な濃度(例えば、2nM、10nMおよび50nM)の標識参照アプタマーに過剰に加えて、結合反応を同時に進行させた。被験アプタマーは標的との結合に参照アプタマーと競合するため、その結合特性に応じて結合シグナルが減少した。次いで、このアッセイで最も高い活性を示したアプタマーをさらなるアプタマー変異体の比較解析のための新たな参照として用いることができた。

【0222】

実施例4: MCP-1結合SpiegelmerによるMCP-1誘導走化性阻害の解析

上記のように増殖させたTHP-1細胞を遠心分離し、HBH(1mg/mlウシ血清アルブミンおよび20mM HEPESを含有するHBSS)で1回洗浄し、 3×10^6 細胞/mlで再懸濁させた。この懸濁物100 μ lを5 μ m細孔のTranswellインサート(Corning社、番号3421)に加えた。下側コンパートメントでMCP-1をHBH 600 μ l中、様々な濃度のSpiegelmerとともに37℃で20~30分間プレインキュベートした後、細胞を加えた。細胞を37℃で3時間遊走させた。その後、インサートを取り出し、下側コンパートメントにレサズリン(Sigma社)の440 μ Mリン酸緩衝生理食塩水溶液60 μ lを加えた。37℃で2.5時間インキュベートした後、Fluostar Optima多検出型プレートリーダー(BMG社)により励起波長544nmおよび発光波長590nmにおける蛍光を測定した。

【0223】

ヒトMCP-1に対する半数最大効果濃度(EC₅₀)の決定

THP-1細胞を様々な濃度のヒトMCP-1に対して3時間遊走させた後、ヒトMCP-1に対する用量反応曲線を取得したところ、最大効果濃度は約1nMであり、これより高い濃度では活性化が減少することがわかった。Spiegelmerによる走化性阻害に関するさらなる実験には、0.5nMのMCP-1濃度を用いた。

【0224】

マウスMCP-1に対する半数最大効果濃度(EC₅₀)の決定

THP-1細胞を様々な濃度のマウスMCP-1に対して3時間遊走させた後、マウスMCP-1に対する用量反応曲線を取得したところ、最大効果濃度は約1~3nMであり、これより高い濃度では活性化が減少することがわかった。Spiegelmerによる走化性阻害に関するさらなる実験には、0.5nMのマウスMCP-1濃度を用いた。

【0225】

実施例5: 表面プラズモン共鳴測定による結合解析

Biacore 2000機器(Biacore AB社、ウプサラ、スウェーデン)

を用いて、S p i e g e l m e r とタンパク質ヒトM C P - 1 との結合を解析した。アミン基を介してヒトM C P - 1 をカップリングする場合、ヒトM C P - 1 を水に対して1 ~ 2 時間透析して (M i l l i p o r e V S W P 混合セルロースエステル; 孔径0. 0 2 5 μ M)、干渉するアミンを除去した。C M 4 センサーチップ (B i a c o r e A B 社、ウプサラ、スウェーデン) を活性化させた後、0. 4 M N H S と0. 1 M E D C の1 : 1 希釈液3 5 μ l を流速5 μ l / 分で注入することによりタンパク質をカップリングさせた。次いで、ヒトM C P - 1 を0. 1 ~ 1. 5 μ g / m l の濃度で、機器の反応が1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 R U (相対単位) の範囲内に収まるまで流速2 μ l / 分で注入した。エタノールアミン塩酸塩溶液 (p H 8. 5) 3 5 μ l を流速5 μ l / 分で注入することにより、未反応のN H S エステルを不活性化させた。センサーチップを結合緩衝液で2 回刺激し、ベースラインが安定したと思われるまで1 0 μ l / 分で1 ~ 2 時間、平衡化した。いずれのタンパク質も、選択緩衝液 (トリス- H C l 、2 0 m M ; N a C l 、1 3 7 m M ; K C l 、5 m M ; C a C l ₂ 、1 m M ; M g C l ₂ 、1 m M ; T w e e n 2 0 、0. 1 % [w / v] ; p H 7. 4) 中1 0 0 0 n M 、5 0 0 n M 、2 5 0 n M 、1 2 5 n M 、6 2 . 5 n M 、3 1 . 2 5 n M および0 n M の濃度のS p i e g e l m e r を連続して注入することにより動力学的パラメータおよび解離定数を評価した。いずれの実験にも、結合時間1 8 0 秒および解離時間3 6 0 秒に定めたK i n j e c t コマンドを用いて、流速1 0 μ l / 分、温度3 7 $^{\circ}$ C で解析を実施した。データ解析および解離定数 (K _D) の算出は、ラングミュア1 : 1 化学量論フィッティングアルゴリズムを用いてB I A e v a l u a t i o n 3 . 0 ソフトウェア (B I A C O R E A B 社、ウプサラ、スウェーデン) により実施した。

10

20

【0226】

実施例6 : 2 型糖尿病およびアルブミン尿を有する患者を対象にしたN O X - E 3 6 によるC C L 2 阻害効果の特徴を明らかにするための第I I a 相試験の最初の結果

本試験は前向き多施設無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間第I I a 相試験であり、2 型糖尿病およびアルブミン尿を有し、高血圧症 (A C E i およびA R B) 、高血糖症 (経口抗糖尿病薬および / またはインスリン) および脂質異常症をコントロールする標準治療を受けている患者に皮下投与を複数回実施したものである。本試験は、(i) 被験者の併用療法および生活習慣を安定させるために最大3 0 日間継続するスクリーニング、(i i) 被験薬N O X - E 3 6 (0. 5 m g / k g) を週2 回注射し、定期的に検査および血液検体採取を実施する、1 2 週間継続する治療ならびに(i i i) 最終来院および被験者の状態を診る完全検査を含めた1 2 週間の無治療追跡で構成されていた。

30

【0227】

被験薬N O X - E 3 6 とは、配列番号2 2 8 のヌクレオチド配列と、同ヌクレオチド配列の5 ' 末端に結合した4 0 k D a P E G 部分とを含む、L - 核酸のことである。

【0228】

主要選択基準

主要選択基準を以下のものとした：

- ・米国糖尿病協会 (A D A) の定義による2 型糖尿病が認められる
- ・H b A 1 c が6 . 0 % 以上、1 0 . 5 % 以下である
- ・朝一番に排泄された尿で3 回算出されたA C R が1 0 0 m g / g を上回る。ただし、少なくとも2 つの測定値が1 0 0 m g / g を上回っていればよい
- ・高血圧症、高血糖症および (該当する場合は) 脂質異常症をコントロールする安定な (少なくとも3 か月間、投薬が変化していない) 治療を受けている患者
- ・アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (A C E i) またはアンジオテンシン I I 受容体遮断薬 (A R B) 、すなわちレニン- アンジオテンシン系 (R A S) 遮断による安定な治療を受けている

40

【0229】

主要除外基準

主要除外基準を以下のものとした：

50

- ・ 1 型糖尿病が認められる
- ・ e G F R が $25 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ 以下である
- ・ 最近（3 か月以内）、心血管事象が発生した
- ・ コントロールされていない高血圧症（上限値 $180 / 110 \text{ mmHg}$ ）が認められる
- ・ スクリーニング前の 3 か月間に透析を受けており、かつ／または急性腎傷害が認められた

- ・ 重篤な浮腫、感染症、下肢潰瘍が認められる
- ・ 試験担当者の判断により、本試験の期間中、安全性および有効性の評価に著しく干渉すると思われる重度の疾患に現時点で罹患している
- ・ スクリーニング来院時、臨床試験担当者の判断により、臨床的に重要な臨床検査異常値が認められる

- ・ チアゾリジンジオン系薬物および免疫抑制薬を使用している、ステロイド療法（局所使用または吸入を除く）を受けている、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、2 型シクロオキシゲナーゼ（COX-2）阻害薬、2 剤以上の利尿薬および／またはアリスキレンを慢性的に使用している。

【0230】

有効性評価

有効性評価を以下の通りに実施した：

2 型糖尿病およびアルブミン尿を有する患者を対象に、CCl2 阻害に対する被験薬の臨床効果を以下のパラメータにより評価した：

- ・ 朝一番に排泄された尿で算出した ACR（アルブミン／クレアチニン比）
- ・ HbA1c
- ・ 血清中 hsCRP
- ・ 血糖障害、全身性炎症、腎および肝疾患ならびに心血管機能のまた別の尿および血清／血漿マーカー
- ・ インスリン抵抗性のホメオスタシスモデル（HOMA-IR）
- ・ フローサイトメトリーによる末梢血中の CCR2 陽性白血球サブセットの判定
- ・ 心血管機能のマーカーとしての血圧変化。

【0231】

安全性評価：

安全性評価を以下の通りに実施した：

- ・ 有害事象（AE）
- ・ 身体検査
- ・ バイタルサイン
- ・ 12 リード心電図（ECG）
- ・ 安全性臨床検査
- ・ 免疫原性評価
- ・ 血清中クレアチニン濃度に基づいて CKD-EPI 式により算出した eGFR および血清シスタチン C により算出した eGFR。

【0232】

本試験の結果を図 8～11 にまとめる。

【0233】

図 8 および 9 に示される ACR の結果の説明：

治療期間および 3 か月間の追跡期間に患者 51 例に観察された ACR 応答は、29 日目から治療終了時まで変動が少なく、安定な低下を示し、この状態は 141 日目（-39%）まで継続し、その後、169 日目にわずかに再び増大し、治療効果が失われつつあることが示唆された（-36%）。それに対してプラセボ群では、169 日目までの追跡期間全体を通じて大きい変動が継続した。

【0234】

治療を中止しても ACR 応答が持続的に観察されたのは極めて有望なことであり、NO

10

20

30

40

50

X-E36などの化合物とその他の化合物とを区別する強力な因子となる可能性を秘めている。このような長期間にわたる効果は、NOX-E36が113日目には薬理的に重要でないレベルまで排泄されていることが既にわかっていることから、同化合物がそれだけ長期間体内に残留することに起因するものであるとは考えられない。この効果が薬理的曝露の期間を過ぎても維持されたことは明らかであることから、腎臓の構造に何らかの効果をもたらされたことが示唆される。

【0235】

図10および11に示されるHbA1cの結果の説明：

治療期間および1か月間の追跡期間に患者51例に観察されたHbA1c応答は、一定の低下を示した後、さらにわずかな改善を示し、第113日の時点で効果は-0.54%（絶対値）になった。それに対してプラセボ群では、治療期間中、一時的な低下を伴う経時変化を示し、57日目に反跳が始まり、113日目の時点で効果は+1.1%（絶対値）になった。

10

【0236】

実施例7：2型糖尿病およびアルブミン尿を有する患者を対象にしたNOX-E36によるCCL2阻害効果の特徴を明らかにするための第IIa相試験の最終結果

実施例6に記載した第IIa相試験には患者を計75例登録した。本実施例は上記第IIa相試験で得られた最終結果に関連するものであり、主要有効性解析には、重大なプロトコル違反がみられた患者、RAS二重遮断による治療を受けた患者および血尿と白血球尿を併発した患者を除外した。

20

【0237】

NOX-E36は安全で耐受性に優れており、治療による重要な有害事象として唯一認められたのは少数の軽度の局所的注射部位反応であった。血漿中濃度は薬学的に意味のある濃度の 358 ± 106 nMに達し（図12）、期待される薬力学的効果、すなわち、CCR2を発現する末梢血中の単球数の変化が観察された。

【0238】

投与期間中および投与終了後のACRの経時変化を図13に示す。85日目の治療終了時、NOX-E36では平均ACRがプラセボに比して32%低下し（ $P=0.014$ ；図14を参照されたい）、50%以上の低下が認められた患者は、NOX-E36投与群では31%であったのに対し、プラセボ投与群ではわずか6%であった。NOX-E36の治療効果は、投与中止後、観察期間終了時まで観察された（図13を参照されたい）。最後の投与から8週間後に平均ACRに対する最大効果（プラセボに対して-39%、 $P=0.010$ ）が観察された。

30

【0239】

試験全体を通じて、血圧、eGFRともに治療群の間に意味のある差は認められなかった。

【0240】

85日目、HbA1cの意味のある減少が観察され（NOX-E36およびプラセボでそれぞれベースラインから-0.32%および+0.06%の絶対変化； $P=0.096$ ）、これは治療中止後も継続し、最後の投与から4週間後に統計的に有意なものとなった（ $P=0.036$ ）（図15および16）。

40

【0241】

図14および16に示される「ns」は有意でないという意味である。

【0242】

実施例6および7の両方に示した結果から、NOX-E36による長期治療が安全で耐受性に優れており、アルブミン尿を伴う2型糖尿病の患者の尿中アルブミン排泄およびHbA1cを減少させることは明らかである。上記の結果からほかにも、アルブミン尿に対する効果が治療中止後も持続することを示す実験的証拠が得られ、これは糖尿病性腎症の重要な病態生理的機序が影響を受けることを示すものである。このことは、NOX-E36と既存の治療戦略とを区別し、同薬剤の疾患修飾能を示すものである。さらに、この適

50

応に承認された薬物をはじめとする新規な方法とは対照的に、NOX-E36が尿中アルブミン排泄に及ぼす効果によって血圧もeGFRも変化することはない。

【0243】

参考文献

本明細書に引用される文献は、そうでないことが明記されない限り、その開示が参照により組み込まれ、その全書誌データは以下の通りである。

- ADA (2012) Standards of medical care in diabetes—2012. *Diabetes Care* 35 Suppl 1: S11–63
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215 (3): 403–10. 10
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* Sep 1; 25 (17): 3389–402.
- Brown Z, Gerritsen ME, Carley WW, Strieter RM, Kunkel SL, Westwick J (1994) Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *Am J Pathol* 145 (4): 913–921 20
- Damha MJ and Ogilvie KK, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, ed. S. Agrawal, p. 81–114, Humana Press Inc. (1993)
- Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C (2003) Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets* 7 (1): 35–48 30
- Giunti S, Barutta F, Perin PC, Gruden G (2010) Targeting the MCP-1/CCR2 System in diabetic kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol* 8 (6): 849–860
- Kahn BB (1998) Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92 (5): 593–596 40
- Klussmann S. (2006). ‘‘The Aptamer Handbook—Functional Oligonucleotides and their Applications.’’ Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2
- Kusser W (2000). *J Biotechnol* 74: 27–38
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, Coresh J (2009) A new equation to estimate glomerular filtr 50

- ation rate. *Ann Intern Med* 150 (9) : 604-612
- Mayr FB, Spiel AO, Leitner JM, Firbas C, Sch
nee J, Hilbert J, Derendorf H, Jilma B (2009)
) Influence of the duffy antigen on pharm
acokinetics and pharmacodynamics of reco
mbinant monocyte chemoattractant protein
(MCP-1, CCL-2) in vivo. *Int J Immunopathol
Pharmacol* 22 (3) : 615-625
- McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the
core of a powerful and diverse set of se
quence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*
32 (Web Server issue) : W20-5. 10
- Mora C, Navarro JF (2004) Inflammation and
pathogenesis of diabetic nephropathy. *Met
abolism* 53 (2) : 265-266; author reply 266-2
67
- Mora C, Navarro JF (2005) The role of infla
mmation as a pathogenic factor in the de
velopment of renal disease in diabetes. *C
urr Diab Rep* 5 (6) : 399-401 20
- Needleman & Wunsch (1970), A general metho
d applicable to the search for similarit
ies in the amino acid sequence of two pr
oteins. *J Mol Biol.* 48 (3) : 443-53.
- Ota T (2013) Chemokine systems link obesit
y to insulin resistance. *Diabetes Metab J*
37 (3) : 165-172
- Pearson & Lipman (1988), Improved tools fo
r biological sequence comparison. *Proc. Na
t'l. Acad. Sci. USA* 85 : 2444 30
- Rollins BJ, Pober JS (1991) Interleukin-4 i
nduces the synthesis and secretion of MC
P-1/JE by human endothelial cells. *Am J P
athol* 138 (6) : 1315-1319
- Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd
J, Groop PH (2003) Diabetic nephropathy is
associated with low-grade inflammation
in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia*
46 (10) : 1402-1407
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Infla
mmation and insulin resistance. *J Clin In
vest* 116 (7) : 1793-1801 40
- Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2 : 4
82
- Struyf S, Van Collie E, Paemen L, Put W, Len
aerts JP, Proost P, Opdenakker G, Van Damme
J (1998) Synergistic induction of MCP-1 a
nd-2 by IL-1beta and interferons in fibr
oblasts and epithelial cells. *J Leukoc Bi
ol* 63 (3) : 364-372 50

Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF (2007) Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117 (4) : 902-909

Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T (2002) Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 169 (4) : 2026-2033

Venkatesan N, Kim SJ, Kim BH (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. *Curr Med Chem* 10 (19) : 1973-1991

Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, and Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 23 : 2677-2684.

【0244】

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、単独でも任意に組み合わせても、本発明をその様々な形態で実施するための材料となり得る。

10

20

【図 1】

1 A 型 M C P - 1 結合核酸

長さ (n t)	ブルダウ ン	長さ (n t)	ブルダウ ン
169-B1trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
169-F3trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
169-C1trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
169-A3trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
169-B2trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-B12trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-D9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-B10trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
169-F2trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-B9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-H9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-E10trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
ボックス	AGGUG	CCC GA	GUG GCA

> E10trc : 結合アッセイによる判定で、176-E10trcよりも弱い結合を示した
> E10trc : 結合アッセイによる判定で、176-E10trcよりも弱い結合を示した

【図 2】

1 B 型 M C P - 1 結合核酸

長さ (n t)	ブルダウ ン	長さ (n t)	ブルダウ ン
176-G9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-F9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-C11trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-E11trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-D10trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-H10trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
176-C9trc	AGGUG	CCC GA	GUG GCA
ボックス	AGGUG	CCC GA	GUG GCA

= C9trc : 結合アッセイによる判定で、176-C9trcと同程度の結合を示した
> C9trc : 結合アッセイによる判定で、176-C9trcよりも弱い結合を示した

【図 3】

2 型 M C P - 1 結合核酸

長さ (n t)	ブルダウ ン	I C ₅₀ 走化性
180-B1-001	AGGCA	< 1 nM
180-A4-002	AGGCA	< 1 nM
180-D1-002	AGGCA	< 1 nM
ボックス	AGGCA	< 1 nM

M C P - 1 結合核酸 180-D1-002 の誘導体

長さ (n t)	ブルダウ ン	I C ₅₀ 走化性
180-D1-011	AGGCA	1.2 nM
180-D1-012	AGGCA	2.6 nM
180-D1-018	AGGCA	2 nM
180-D1-034	AGGCA	2 nM
180-D1-035	AGGCA	0.5 nM
180-D1-036	AGGCA	0.5 nM
ボックス	AGGCA	0.5 nM

= D1-002 : 結合アッセイによる判定で、180-D1-002と同程度の結合を示した
> D1-002 : 結合アッセイによる判定で、180-D1-002よりも弱い結合を示した

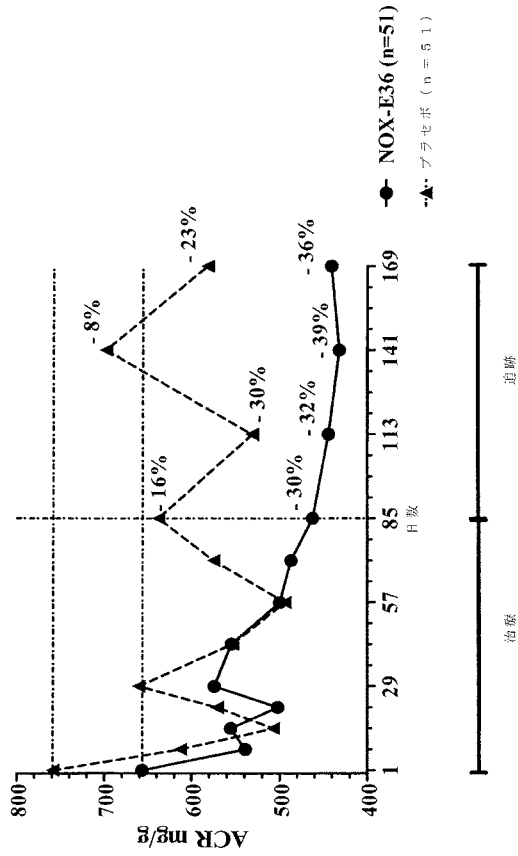
【図 4】

3 型 M C P - 1 結合核酸

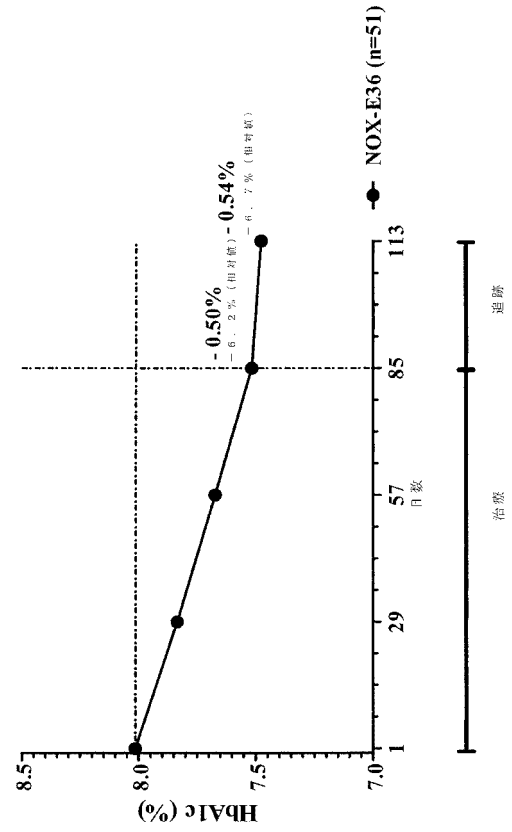
長さ (n t)	ブルダウ ン	I C ₅₀ 走化性 [nM]
178-A8	AGGCA	< 1 nM
178-F7	AGGCA	< 1 nM
178-C6	AGGCA	< 1 nM
178-E7	AGGCA	< 1 nM
178-G6	AGGCA	< 1 nM
178-A7	AGGCA	< 1 nM
178-C7	AGGCA	< 1 nM
178-E5	AGGCA	< 1 nM
181-F1	AGGCA	< 1 nM
181-B2	AGGCA	< 1 nM
178-A6	AGGCA	< 1 nM
178-D6	AGGCA	< 1 nM
178-D5	AGGCA	< 1 nM
181-A2	AGGCA	< 1 nM
ボックス	AGGCA	< 1 nM

= 178-D5 : 結合アッセイによる判定で、178-D5と同程度の結合を示した
> 178-D5 : 結合アッセイによる判定で、178-D5よりも弱い結合を示した

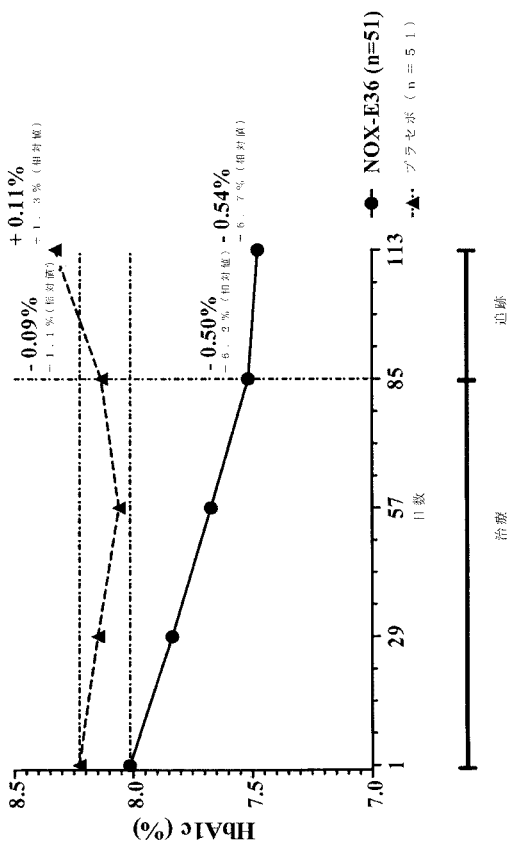
【図 9】



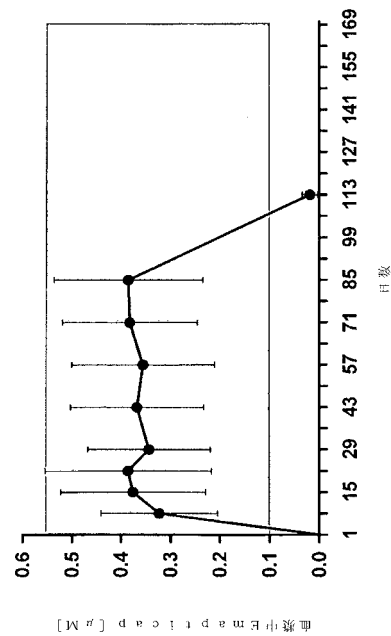
【図 10】



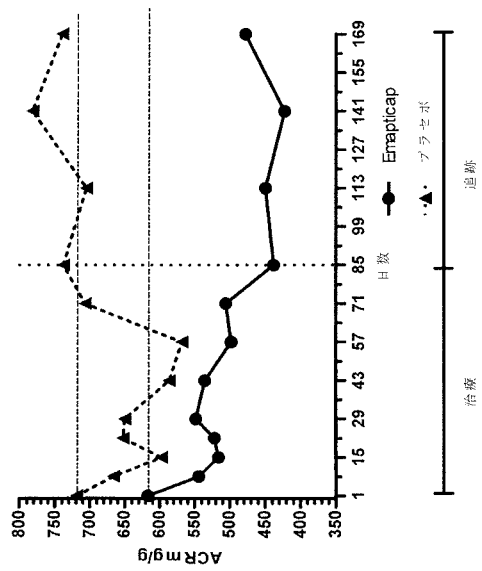
【図 11】



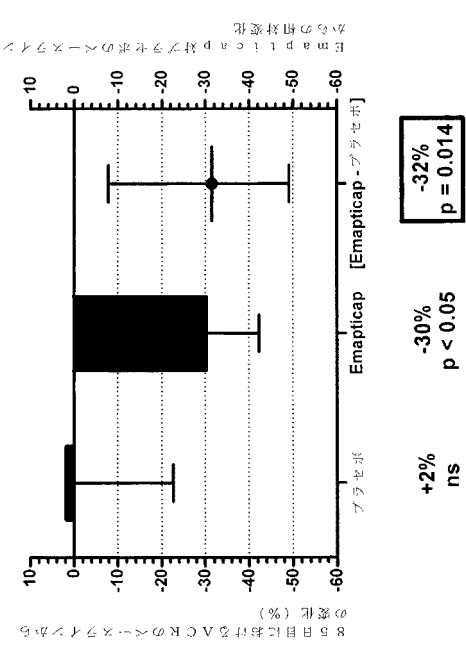
【図 12】



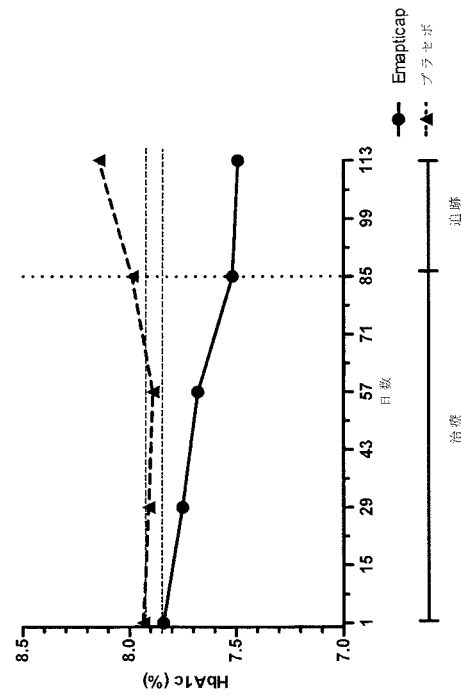
【図 1 3】



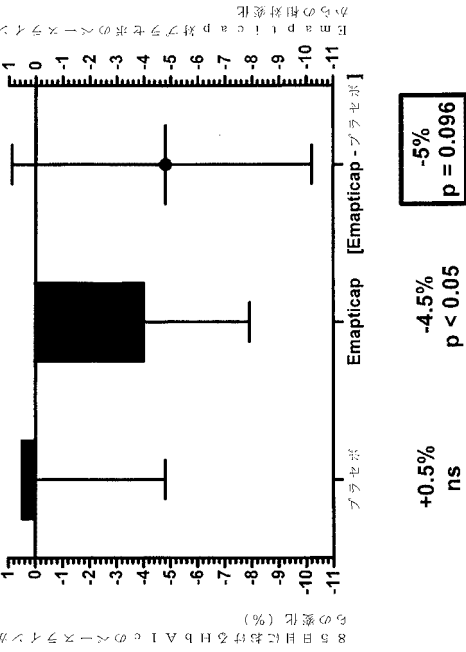
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【配列表】

2017502075000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/002945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/7088 A61P13/12
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)

A61K A61P

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, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/025251 A1 (NOXXON PHARMA AG [DE]; PURSCHKE WERNER [DE]; JAROSCH FLORIAN [DE]; EUL) 1 March 2012 (2012-03-01) page 127, paragraph 4; page 100, paragraph 2; claims 1, 32, 16-30; figure 19; examples 1,2, 6, 10, 13	1-76
A	WO 2007/093409 A2 (NOXXON PHARMA AG [DE]; PURSCHKE WERNER [DE]; JAROSCH FLORIAN [DE]; EUL) 23 August 2007 (2007-08-23) cited in the application claim 1	1-76

☒ 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

16 January 2015

Date of mailing of the international search report

27/01/2015

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

Habedanck, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/002945

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAYYED SUFYAN G: "Role of pro-inflammatory and homeostatic chemokines in diabetic nephropathy", DISSERTATION ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER HUMANBIOLOGY AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 1-125, XP002662958, Retrieved from the Internet: URL:http://edoc.ub.uni-muenchen.de/11223/1/Sayyed_Sufyan.pdf [retrieved on 2011-11-07] paragraph [4.2.1.2] - paragraph [4.2.2] -----	1-76
X	C. M. LLOYD: "RANTES and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Play an Important Role in the Inflammatory Phase of Crescentic Nephritis, but Only MCP-1 Is Involved in Crescent Formation and Interstitial Fibrosis", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 185, no. 7, 7 April 1997 (1997-04-07), pages 1371-1380, XP055160289, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.185.7.1371 page 1376, left-hand column, line 1 - right-hand column, line 6; figure 7 abstract -----	1-3,6, 55-58, 61, 63-66, 68,70-74

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/002945

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012025251	A1	01-03-2012	NONE
WO 2007093409	A2	23-08-2007	AT 510014 T 15-06-2011
		AU 2007214668 A1 23-08-2007	
		BR P10707842 A2 10-05-2011	
		CA 2638847 A1 23-08-2007	
		CN 101415825 A 22-04-2009	
		CN 103275984 A 04-09-2013	
		DK 2135949 T3 04-02-2013	
		EP 1984501 A2 29-10-2008	
		EP 2135949 A1 23-12-2009	
		EP 2365080 A1 14-09-2011	
		ES 2397803 T3 11-03-2013	
		HK 1129127 A1 10-01-2014	
		JP 5537812 B2 02-07-2014	
		JP 2009526532 A 23-07-2009	
		KR 20080105078 A 03-12-2008	
		KR 20130100213 A 09-09-2013	
		PT 2135949 E 07-01-2013	
		US 2010284961 A1 11-11-2010	
		US 2013035376 A1 07-02-2013	
		WO 2007093409 A2 23-08-2007	

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	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 K	47/50	(2017.01)	A 6 1 P	19/00
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 K	47/48
C 1 2 N	15/115	(2010.01)	C 1 2 N	15/00
C 0 7 K	16/24	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
			C 0 7 K	16/24

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

(72)発明者 バウマン, マスィアス

ドイツ国, 1 4 4 6 9 ポツダム, アイゼンハート シュトラーセ 5

Fターム(参考) 4C076 AA94 EE23 EE59 FF31

4C084 AA02 AA17 BA03 NA14 ZA362 ZA422 ZA812 ZB262 ZC352

4C085 AA13 AA14 DD62 EE01

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA42 ZA81 ZB26

ZC35

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA10 FA33