

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5537812号
(P5537812)

(45) 発行日 平成26年7月2日 (2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日 (2014.5.9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 29/00 (2006.01)

A 6 1 P 29/00

請求項の数 23 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-554674 (P2008-554674)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月14日 (2007.2.14)
 (65) 公表番号 特表2009-526532 (P2009-526532A)
 (43) 公表日 平成21年7月23日 (2009.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/001294
 (87) 国際公開番号 W02007/093409
 (87) 国際公開日 平成19年8月23日 (2007.8.23)
 審査請求日 平成22年2月12日 (2010.2.12)
 (31) 優先権主張番号 06002935.2
 (32) 優先日 平成18年2月14日 (2006.2.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 06024202.1
 (32) 優先日 平成18年11月22日 (2006.11.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504411214
 ノクソン・フアルマ・アクチエンゲゼルシ
 ヤフト
 ドイツ10589ベルリン・マクスードー
 ルン-シュトラッセ8-10
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所
 (72) 発明者 プルシユケ, ベルナー
 ドイツ13359ベルリン・ブリーツエナ
 ーシュトラッセ30
 (72) 発明者 ジヤロシユ, フロリアン
 ドイツ13353ベルリン・キアウトシヨ
 ウシュトラッセ1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MCP-1 に結合する核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

MCP-1 に結合する L - 核酸であって、

該核酸が、5' 3' の方向に、第一の伸長ボックス B1A、第二の伸長ボックス B2
 および第三の伸長ボックス B1B からなり、

第一の伸長ボックス B1A は、ACGCA、CGCA および GCA よりなる群から選択さ
 れるヌクレオチド配列を含み、

第二の伸長ボックス B2 は CSUCCUCACCGUGCAAGUGAAGCCGY
 GGCU のヌクレオチド配列を含み、かつ、

第三の伸長ボックス B1B は、UGCUG、UGC G および UGC よりなる群から選択さ
 れるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする L - 核酸。

10

【請求項2】

第二の伸長ボックス B2 が CGUCCUCACCGUGCAAGUGAAGCCG
 UGGCU のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の L - 核酸。

【請求項3】

a) 第一の伸長ボックス B1A が ACGCA のヌクレオチド配列を含み、
 かつ

第三の伸長ボックス B1B が UGCUG のヌクレオチド配列を含むか；または

b) 第一の伸長ボックス B1A が CGCA のヌクレオチド配列を含み、
 かつ

20

第三の伸長ボックス B 1 B が U G C G のヌクレオチド配列を含むか；または

c) 第一の伸長ボックス B 1 A が G C A のヌクレオチド配列を含み、
かつ

第三の伸長ボックス B 1 B が U G C 若しくは U G C G のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の L - 核酸。

【請求項 4】

第一の伸長ボックスが G C A のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の L - 核酸。

【請求項 5】

第三の伸長ボックスが U G C のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の L - 核酸。

10

【請求項 6】

配列番号 3 7 に示される核酸配列または該核酸配列に少なくとも 9 0 % 相同な核酸配列を含む、ことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の L - 核酸。

【請求項 7】

ケモカインを結合することが可能であり、かつ、該ケモカインがエオタキシン、M C P - 1 および M C P - 2 よりなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の L - 核酸。

【請求項 8】

ヒト M C P - 1 を結合することが可能であることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の L - 核酸。

20

【請求項 9】

H E S 部分および P E G 部分 よりなる群 から選択される部分による修飾を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の L - 核酸。

【請求項 1 0】

修飾が直鎖若しくは分枝状 P E G よりなる 群から選択される P E G 部分によるものであり、かつ、該 P E G 部分の分子量が 2 0 から 1 2 0 k D までである、請求項 9 に記載の L - 核酸。

【請求項 1 1】

配列番号 1 1 6 に示される ヌクレオチド配列 および配列番号 1 1 7 に示されるヌクレオチド配列よりなる群から選択される配列を含むことを特徴とする、請求項 1 0 に記載の L - 核酸。

30

【請求項 1 2】

修飾が H E S 部分によるものであり、かつ、該 H E S 部分の分子量が 1 0 から 1 3 0 k D までであることを特徴とする、請求項 9 に記載の L - 核酸。

【請求項 1 3】

第一の伸長ボックスおよび第三の伸長ボックスが任意に、相互にハイブリダイズすることにより、二本鎖構造が形成されていることを特徴とする、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の L - 核酸。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸、および 1 種のさらなる構成要素を含み、かつ、該さらなる構成要素が、製薬学的に許容できる賦形剤、製薬学的に許容できる担体および製薬学的有効成分よりなる群から選択されることを特徴とする、製薬学的組成物。

40

【請求項 1 5】

医薬品の製造のための、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の使用。

【請求項 1 6】

医薬品が、炎症性疾患、自己免疫疾患、自己免疫性脳脊髄炎、卒中、急性および慢性多発性硬化症、慢性炎症、関節リウマチ、腎疾患、再狭窄、血管形成術後の再狭窄、急性および慢性アレルギー反応、一次的および二次的免疫学的若しくはアレルギー反応、喘息、結膜炎、気管支炎、癌、アテローム硬化症、アテローム硬化性心血管系心不全若しくは卒

50

中、乾癬、乾癬性関節炎、神経系の炎症、アトピー性皮膚炎、大腸炎、子宮内膜症、ブドウ膜炎、黄斑変性を包含する網膜障害、網膜剥離、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、網膜色素変性、増殖性硝子体網膜症、および中心性漿液性網脈絡膜症；特発性肺線維症、サルコイドーシス、多発性筋炎、皮膚筋炎、免疫抑制の回避、感染症のリスクを低下させること、敗血症、腎の炎症、糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、閉塞性腎症、急性尿細管壊死、およびびまん性糸球体硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性気管支炎、ベーチェット病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、川崎病後の早発性アテローム硬化症、心筋梗塞、肥満、慢性肝疾患、ペイロニー病、急性脊髄損傷、肺若しくは腎移植、心筋炎、アルツハイマー病およびニューロパシー、乳癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、過誤腫、結腸直腸癌、結腸腺腫、脾炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、なら

びにクローン病若しくは潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患よりなる群から選択される疾患若しくは障害の処置および／若しくは予防のためのものであることを特徴とする、請求項 15 に記載の使用。

10

【請求項 17】

ケモカイン、および請求項 1～13 のいずれかに記載の L - 核酸を含む複合体であって、該ケモカインが、エオタキシン、MCP - 1 および MCP - 2 よりなる群から選択されることを特徴する、複合体。

【請求項 18】

ケモカインの検出のための試験キットであって、請求項 1～13 のいずれかに記載の L - 核酸を含み、該ケモカインがエオタキシン、MCP - 1 および MCP - 2 よりなる群から選択されることを特徴とする、キット。

20

【請求項 19】

候補ケモカインアンタゴニストおよび／若しくは候補ケモカインアゴニストを提供する段階、

請求項 1～13 のいずれかに記載の L - 核酸を提供する段階、

ケモカインアンタゴニストおよび／若しくはケモカインアゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を提供する段階、ならびに

候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうか、および／若しくは候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうかを決定する段階

30

を含んでなり、

該ケモカインがエオタキシン、MCP - 1 および MCP - 2 よりなる群から選択される、ことを特徴とするケモカインアンタゴニスト若しくはケモカインアゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 20】

固相に固定されたケモカインを提供する段階であって、該ケモカインが予め採取されたものである、段階、

標識されている、請求項 1～13 のいずれかに記載の L - 核酸を提供する段階、

候補ケモカインアゴニストおよび／若しくは候補ケモカインアンタゴニストを添加する段階、ならびに

40

候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうか、および／若しくは候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうかを決定する段階

を含んでなり、

該固相に固定されたケモカインがエオタキシン、MCP - 1 および MCP - 2 よりなる群から選択される、

ことを特徴とするケモカインアゴニストおよび／若しくはケモカインアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 21】

請求項 1～13 のいずれかに記載の L - 核酸を含んでなる、ケモカインの検出のための

50

キットであって、該ケモカインがエオタキシン、M C P - 1 および M C P - 2 よりなる群から選択されることを特徴とする、キット。

【請求項 2 2】

予め調製されたサンプル中の請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の検出方法であって、

a) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸またはその部分を、捕捉プローブおよび検出プローブと、同時に若しくはいずれかの順序で連続してのいずれかで反応させる段階であって、該捕捉プローブが請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該検出プローブが請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であるか、あるいはまた、該捕捉プローブが請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該検出プローブが請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的である、段階、ならびに

b) 請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の L - 核酸、ならびに捕捉プローブおよび検出プローブよりなる段階 a) で形成される複合体を検出する段階を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2 3】

検出プローブが検出手段を含み、かつ / または捕捉プローブが固体支持体に固定され得ることを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、M C P - 1 に結合する核酸、ならびにそれぞれ医薬品および診断剤の製造のためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒト M C P - 1 (単球走化性タンパク質 - 1 ; 代替名 M C A F [単球走化性・活性化因子] ; C C L 2 ; S M C - C F [平滑筋細胞コロニー刺激因子] ; H C - 1 1 ; L D C F ; G D C F ; T S G - 8 ; S C Y A 2 ; A 2 ; S w i s s P r o t 受託コード P 1 3 5 0 0) は、独立に 3 群を特徴とした (非特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3) 。それは 7 6 アミノ酸よりなり、そして全部のケモカインのようなヘパリン結合部位を特徴とする。2 個の分子内ジスルフィド結合が該分子に安定な固い構造を賦与する。さらに、M C P - 1 はそのアミノ末端にピログルタミン酸を保有する。T h r 7 1 に潜在的 O - 結合グリコシル化部位が位置する。付加的な M C P ファミリーメンバーはヒト (M C P - 2 、 - 3 、 - 4) およびマウス (M C P - 2 、 - 3 、 - 5) 双方に存在する。該ヒトタンパク質はヒト M C P - 1 におよそ 7 0 % 相同である。

【0 0 0 3】

M C P - 1 の構造は N M R (非特許文献 4) および X 線 (非特許文献 5) により解明された。M C P - 1 単量体は、アミノ末端システインの後にギリシャキーモチーフ中の 3 個の反平行 β - プリーツシートに至る 1 個の長いループが続く典型的なケモカイン折り畳みを有する。該タンパク質は 3 個の β - シートの上に重なる α - ヘリックス中で終端する (P D B データ受託コード 1 D O K) 。

【0 0 0 4】

異なる哺乳動物種からの M C P - 1 形態の三次元構造は一般に維持されているとは言え、アミノ酸配列は進化の間にとりわけ良好に保存されてはいない。配列アライメントの結果は、最初の 7 6 アミノ酸内にヒトおよびマウス M C P - 1 (J E とともに呼ばれる) 間で 5 5 % の全体的配列類似性を示す。アミノ酸配列は別にして、マウス M C P - 1 は分子の大きさ (1 2 5 アミノ酸) およびグリコシル化の程度がヒト M C P - 1 と異なる。マウス M C P - 1 はヒト M C P - 1 中に存在せずかつ *i n v i t r o* 生物活性に必要とされない 4 9 アミノ酸のカルボキシ末端ドメインを含有する。ヒト M C P - 1 は、以下からの

10

20

30

40

50

M C P - 1 と、以下の割合の同一のアミノ酸を共有する：

【 0 0 0 5 】

【表 1】

• <i>Macaca mulatta</i> (アカゲザル) MCP-1	97%
• <i>Sus scrofa</i> (ブタ) MCP-1	79%
• <i>Equus caballus</i> (ウマ)	78%
• <i>Canis familiaris</i> (イヌ) MCP-1	76%
• <i>Oryctolagus cuniculus</i> (ウサギ) MCP-1	75%
• <i>Bos Taurus</i> (ウシ)	72%
• <i>Homo sapiens</i> MCP-3	71%
• <i>Homo sapiens</i> エオタキシン	64%
• <i>Homo sapiens</i> MCP-2	62%
• <i>Mus musculus</i> (マウス) MCP-1	55%
• <i>Rattus norvegicus</i> (ラット) MCP-1	55%

10

【 0 0 0 6 】

この高程度の相違を考えれば、げっ歯類モデルでの薬理学的研究の成功裏の成績のために、げっ歯類 M C P - 1 のアンタゴニストを生成することが必要でありうる。

【 0 0 0 7 】

20

M C P - 1 は、単球 / マクロファージ、好塩基球、活性化 T 細胞および N K 細胞の強力な誘引物質である。内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞、ケラチノサイト、滑膜細胞、メサンギウム細胞、骨芽細胞、平滑筋細胞のような多様な細胞型、ならびに多数の腫瘍細胞が M C P - 1 を発現する（非特許文献 6）。その発現は、I L - 1、T N F -、I F N -、L P S（リポ多糖）および G M - C S F のようないくつかの型の炎症前剤により刺激される。

【 0 0 0 8 】

乱雑なケモカインネットワークにおいてはむしろ異常に、M C P - 1 はその受容体の使用において高度に特異的であり、ケモカイン受容体 C C R 2 にのみ高親和性で結合する。全部のケモカイン受容体のように C C R 2 は G P C R である（非特許文献 7）。C C R 2 は、カルボキシ末端領域をコードする m R N A の選択的スプライシングにより 2 種のわずかに異なる形態すなわち C C R 2 a および C C R 2 b で発現されるようである（非特許文献 8）。これらの受容体は、単球、骨髄系前駆細胞および活性化 T 細胞で発現される（非特許文献 9；非特許文献 10）。H E K - 2 9 3 細胞にトランスフェクトした受容体に対する M C P - 1 の解離定数は 2 6 0 p M であり、これは単球で測定される値と一致している（非特許文献 9；非特許文献 11）。トランスフェクトした H E K - 2 9 3 細胞上の C C R 2 b の M C P - 1 での活性化は、9 0 p M の濃度でアデニリルシクラーゼを阻害し、そしてわずかにより高い濃度で（見るところホスファチジルイノシトール加水分解に依存せず）細胞内カルシウムを動員する。アデニリルシクラーゼおよび細胞内カルシウム放出に対する影響は破傷風毒素により強く阻害され、シグナル伝達における G_i 型ヘテロ三量体 G タンパク質の関与を意味している（非特許文献 9）。

30

40

【 0 0 0 9 】

M C P - 1 は炎症を起こした組織への単球の動員に関与する。そこで、常在性マクロファージは、M C P - 1 および他者のようなケモカイン、ならびに T N F、I L - 1 および他者のようなサイトカインを放出し、それらは一連の接着分子を発現するように内皮細胞を活性化する。生じる「粘着性」内皮は血管中の単球をその表面に沿ってローリングさせる。ここで、単球は内皮表面上に提示される M C P - 1 に遭遇し、M C P - 1 は単球上の C C R 2 に結合しかつそれらを活性化する。これは最終的に確実な停止、内皮に沿った単球の拡散および周囲組織への遊出に至り、周囲組織で単球はマクロファージに分化しかつ最大 M C P - 1 濃度の部位に移動する。

50

【 0 0 1 0 】

MCP-1は、小型(約8~14kDa)ヘパリンに結合する、大部分は塩基性かつ構造上関係した分子の1ファミリーであるケモカインファミリーの1メンバーである。それらは炎症を起こした組織で主に形成され、そして白血球(white blood cell)(白血球(leukocyte))の動員、活性化および増殖を調節する(非特許文献6;非特許文献12;非特許文献13)。ケモカインは、好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、肥満細胞、TおよびB細胞の走化性を選択的に誘導する。それらの走化効果に加え、それらは、細胞形状の変化、遊離細胞内カルシウムイオンの濃度の一過性増大、脱顆粒、インテグリンの上方制御、ロイコトリエン、プロスタグランジン、トロンボキサンのような生物活性脂質の形成、または呼吸性バースト(病原性生物体若しくは腫瘍細胞の破壊のための反応性酸素種の放出)のような応答性細胞での他の効果を選択的に発揮し得る。従って、さらなる炎症前メディエーターの放出、感染若しくは炎症の部位への白血球の走化性および血管外遊走を惹起することにより、ケモカインは炎症反応の増大を誘発する。

10

【 0 0 1 1 】

4個の保存されたシステイン残基の最初の2種の配置に基づき、ケモカインは4分類、すなわち、システインが縦列であるCC若しくは-ケモカイン、それらが1個の付加的なアミノ酸残基により分離されているCXC若しくは-ケモカイン、ただ1個のジスルフィド架橋を有する、今日まで唯一の代表(representant)としてリンホタクチンを含むXC若しくはケモカイン、および今日まで知られている唯一の分類メンバーとして膜結合型フラクタルカインを含む、システイン間の3アミノ酸残基を特徴とするCX3Cケモカインに分割される(Bazan 1997)。

20

【 0 0 1 2 】

CXCケモカイン、とりわけそれらのアミノ末端にアミノ酸配列ELRを保有するCXCケモカインは主に好中球に作用する。好中球上で活性であるCXCケモカインの例は、IL-8、GRO、-および-、NAP-2、ENA-78およびGCP-2である。CCケモカインは、単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球のようなより多様な白血球、ならびにTおよびBリンパ球に作用する(非特許文献14;非特許文献6;非特許文献15;非特許文献16;非特許文献17)。これらの例は、I-309;MCP-1、-2、-3、-4、MIP-1および-、RANTESならびにエオタキシンである。

30

【 0 0 1 3 】

ケモカインは、7個の膜を貫通するGタンパク質共役受容体(GPCR;非特許文献18)のスーパーファミリーに属する受容体を通じて作用する。一般的に言って、ケモカインおよびケモカイン受容体の相互作用は、1種のケモカインが多くのケモカイン受容体に結合し得、かつ、逆に、単一のケモカイン受容体が数種のケモカインと相互作用し得るために、乱雑である傾向がある。CCケモカインの数種の既知の受容体は、MIP-1およびRANTESを結合するCCR1(非特許文献19;非特許文献20);MCP-1、-2、-3および-4を包含するケモカインを結合するCCR2(非特許文献8;非特許文献9;非特許文献21;非特許文献22);エオタキシン、RANTESおよびMCP-3を包含するケモカインを結合するCCR3(非特許文献23);MCP-1、MIP-1およびRANTESに应答してシグナルを発することが見出されたCCR4(非特許文献24);ならびにMIP-1および-、ならびにRANTESに应答してシグナルを発することが示されたCCR5(非特許文献25;非特許文献26;非特許文献27)を包含する。

40

【 0 0 1 4 】

上で挙げられたとおり、MCPファミリーの全4メンバー(1-4)はCCR2に結合する一方、MCP-2、MCP-3およびMCP-4は、CCR1およびCCR3(非特許文献21;非特許文献28;非特許文献29)、ならびにMCP-2の場合はCCR5(非特許文献30)ともまた相互作用し得る。MCPファミリーとの高い相同性を示す別

50

のＣＣケモカインはエオタキシンであり、それは元はアレルゲンで攻撃した感作されたモルモットから採取した気管支肺胞洗浄液から単離された（非特許文献１６）。エオタキシンはまたＣＣＲ２も活性化し得ることが示されている（非特許文献３１）。

【００１５】

本発明の根底にある問題は、ＭＣＰ－１と特異的に相互作用する手段を提供することである。より具体的には、本発明の根底にある問題は、ＭＣＰ－１と特異的に相互作用する、核酸に基づく手段を提供することである。

【００１６】

本発明の根底にあるさらなる一問題は、ヒト若しくはヒト以外の疾患の処置のための医薬品の製造のための手段を提供することであり、該疾患は、こうした疾患の発病機序に直接若しくは間接的にのいずれかで関与しているＭＣＰ－１を特徴とする。

10

【００１７】

本発明の根底にあるなおさらなる一問題は、疾患の処置のための診断剤の製造のための手段を提供することであり、該疾患は、こうした疾患の発病機序に直接若しくは間接的にのいずれかで関与しているＭＣＰ－１を特徴とする。

【非特許文献１】Matsushima 1988

【非特許文献２】Rollins 1989

【非特許文献３】Yoshimura 1989

【非特許文献４】Handel 1996

【非特許文献５】Lubkowski 1997

20

【非特許文献６】Baggiolini 1994

【非特許文献７】Dawson 2003

【非特許文献８】Charo 1994

【非特許文献９】Myers 1995

【非特許文献１０】Qin 1996

【非特許文献１１】Van Riper 1993

【非特許文献１２】Springer 1995

【非特許文献１３】Schall 1994

【非特許文献１４】Oppenheim 1991

【非特許文献１５】Miller 1992

30

【非特許文献１６】Jose 1994

【非特許文献１７】Ponath 1996a

【非特許文献１８】Murphy 2000

【非特許文献１９】Neote 1993

【非特許文献２０】Gao 1993

【非特許文献２１】Gong 1997

【非特許文献２２】Garcia-Zepeda 1996

【非特許文献２３】Ponath 1996b

【非特許文献２４】Power 1995

【非特許文献２５】Boring 1996

40

【非特許文献２６】Raport 1996

【非特許文献２７】Samson 1996

【非特許文献２８】Heath 1997

【非特許文献２９】Uguccioni 1997

【非特許文献３０】Ruffing 1998

【非特許文献３１】Martinellic 2001

【発明の開示】

【００１８】

[発明の要約]

本発明の根底にあるこれらおよび他の問題は、付属される独立請求項の主題により解決

50

される。好ましい態様を従属請求項から採用しうる。

【0019】

本発明の根底にある問題は、1 A型核酸、1 B型核酸、2型核酸、3型核酸、4型核酸、および配列番号87ないし115のいずれかの核酸配列を有する核酸を含んでなる群から選択される、好ましくはMCP-1に結合する核酸により、第一のアスペクトにおいてもまた解決される。

【0020】

該第一のアスペクトの第一の下位アスペクト(subaspect)において、1 A型核酸は、5' 3'の方向に、第一の伸長ボックスB1A、第二の伸長ボックスB2、第三の伸長ボックスB3、第四の伸長ボックスB4、第五の伸長ボックスB5、第六の伸長ボックスB6および第七の伸長ボックスB1Bを含んでなり、

10

第一の伸長ボックスB1Aおよび第七の伸長ボックスB1Bは場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第一の伸長ボックスB1AはAGCRUGのヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックスB2はCCCGGWのヌクレオチド配列を含んでなり、

第三の伸長ボックスB3はGURのヌクレオチド配列を含んでなり、

第四の伸長ボックスB4はRYAのヌクレオチド配列を含んでなり、

第五の伸長ボックスB5はGGGGGRCGCGAYCのヌクレオチド配列を含んでなり、

第六の伸長ボックスB6はUGC AAUA AUG若しくはURYAWUUGのヌクレオチド配列を含んでなり、および

20

第七の伸長ボックスB1BはCRYGCUのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0021】

第一の下位アスペクトの好ましい一態様において、

第一の伸長ボックスB1AはAGCGUGのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0022】

第一の下位アスペクトの一態様において、

第二の伸長ボックスB2はCCCGGUのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0023】

第一の下位アスペクトの一態様において、

30

第三の伸長ボックスB3はGUGのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0024】

第一の下位アスペクトの一態様において、

第四の伸長ボックスB4はGUAのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0025】

第一の下位アスペクトの一態様において、

第五の伸長ボックスB5はGGGGGGCGCGAC Cのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0026】

第一の下位アスペクトの一態様において、

40

第六の伸長ボックスB6はUACA UUGのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0027】

第一の下位アスペクトの一態様において、

第七の伸長ボックスB1BはCACGCUのヌクレオチド配列を含んでなる。

【0028】

第一の下位アスペクトの一態様において、該核酸は配列番号21の核酸配列を含んでなる。

【0029】

第一のアスペクトの第二の下位アスペクトにおいて、1 B型核酸は、5' 3'の方向に、第一の伸長ボックスB1A、第二の伸長ボックスB2、第三の伸長ボックスB3、第

50

四の伸長ボックス B 4、第五の伸長ボックス B 5、第六の伸長ボックス B 6 および第七の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、

第一の伸長ボックス B 1 A および第七の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第一の伸長ボックス B 1 A は A G Y R U G のヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックス B 2 は C C A G C U 若しくは C C A G Y のヌクレオチド配列を含んでなり、

第三の伸長ボックス B 3 は G U G のヌクレオチド配列を含んでなり、

第四の伸長ボックス B 4 は A U G のヌクレオチド配列を含んでなり、

第五の伸長ボックス B 5 は G G G G G G C G C G A C C のヌクレオチド配列を含んでなり

10

第六の伸長ボックス B 6 は C A U U U U A 若しくは C A U U U A のヌクレオチド配列を含んでなり、および

第七の伸長ボックス B 1 B は C A Y R C U のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 0 】

該第二の下位アスペクトの一態様において、

第一の伸長ボックス B 1 A は A G C G U G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 1 】

第二の下位アスペクトの一態様において、

第二の伸長ボックス B 2 は C C A G U のヌクレオチド配列を含んでなる。

20

【 0 0 3 2 】

第二の下位アスペクトの一態様において、

第六の伸長ボックス B 6 は C A U U U U A のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 3 】

第二の下位アスペクトの一態様において、

第七の伸長ボックス B 1 B は C A C G C U のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 4 】

第二の下位アスペクトの一態様において、該核酸は、配列番号 2 8 および配列番号 2 7 の核酸配列を含んでなる。

【 0 0 3 5 】

30

第一のアスペクトの第三の下位アスペクトにおいて、2 型核酸は、5 ' 3 ' の方向に、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2 および第三の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、

第一の伸長ボックス B 1 A および第三の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第一の伸長ボックス B 1 A は、A C G C A、C G C A および G C A を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックス B 2 は 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んでなり、

第三の伸長ボックス B 1 B は、U G C G U、U G C G および U G C を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

40

【 0 0 3 6 】

該第三の下位アスペクトの一態様において、

第二の伸長ボックス B 2 は C G 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 U G G C U C のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 7 】

第三の下位アスペクトの一態様において、

a) 第一の伸長ボックス B 1 A は A C G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は U G C G U のヌクレオチド配列を含んでなるか；または

50

b) 第一の伸長ボックス B 1 A は C G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は U G C G のヌクレオチド配列を含んでなるか；または

c) 第一の伸長ボックス B 1 A は G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は U G C 若しくは U G C G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 8 】

第三の下位アスペクトの一態様において、

第一の伸長ボックス B 1 A は G C A のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 3 9 】

第三の下位アスペクトの好ましい一態様において、

第三の伸長ボックス B 1 B は U G C G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 0 】

第三の下位アスペクトの一態様において、該核酸は、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 7 8 の核酸配列を含んでなる。

【 0 0 4 1 】

第一のアスペクトの第四の下位アスペクトにおいて、3 型核酸は、5' 3' の方向で、
第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2 A、第三の伸長ボックス B 3、第
四の伸長ボックス B 2 B、第五の伸長ボックス B 4、第六の伸長ボックス B 5 A、第七の
伸長ボックス B 6、第八の伸長ボックス B 5 B および第九の伸長ボックス B 1 B を含んで
なり、

第一の伸長ボックス B 1 A および第九の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイ
ブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第二の伸長ボックス B 2 A および第四のボックス B 2 B は場合によっては相互とハイブリ
ダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第六の伸長ボックス B 5 A および第八のボックス B 5 B は場合によっては相互とハイブリ
ダイズして、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第一の伸長ボックス B 1 A は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックス B 2 A は G K M G U のヌクレオチド配列を含んでなり、

第三の伸長ボックス B 3 は K R R A R のヌクレオチド配列を含んでなり、

第四の伸長ボックス B 2 B は A C K M C のヌクレオチド配列を含んでなり、

第五の伸長ボックス B 4 は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第六の伸長ボックス B 5 A は、G G Y および C W G C を含んでなる群から選択されるヌク
レオチド配列を含んでなり、

第七の伸長ボックス B 6 は、Y A G A、C K A A U および C C U U U A U を含んでなる群
から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第八の伸長ボックス B 5 B は、G C Y R および G C W G を含んでなる群から選択されるヌ
クレオチド配列を含んでなり、ならびに

第九の伸長ボックス B 1 B は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 2 】

該第四の下位アスペクトの一態様において、

第三の伸長ボックス B 3 は、G A G A A 若しくは U A A A A のヌクレオチド配列を含んで
なる。

【 0 0 4 3 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

第五の伸長ボックス B 4 は、C A G C G A C U 若しくは C A A C G A C U のヌクレオチド
配列を含んでなる。

【 0 0 4 4 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

第五の伸長ボックス B 4 は C A G C G A C U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、ボックス B 3 は U A A A A のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 5 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

第五の伸長ボックス B 4 は C A A C G A C U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、ボックス B 3 は G A G A A のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 6 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

第七の伸長ボックス B 6 は U A G A のヌクレオチド配列を含んでなる。

10

【 0 0 4 7 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

a) 第一の伸長ボックス B 1 A は G U R C U G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G C A G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第一の伸長ボックス B 1 A は G K S Y G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G C R S M C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

20

c) 第一の伸長ボックス B 1 A は K B B S C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G S V V M のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

d) 第一の伸長ボックス B 1 A は B N G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G C N V のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 8 】

第四の下位アスペクトの好ましい一態様において、

a) 第一の伸長ボックス B 1 A は G U G C U G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

30

第九の伸長ボックス B 1 B は G C A G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第一の伸長ボックス B 1 A は G U G C G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G C G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

c) 第一の伸長ボックス B 1 A は K K S S C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G S S M M のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

d) 第一の伸長ボックス B 1 A は S N G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

40

第九の伸長ボックス B 1 B は G C N S のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 4 9 】

第四の下位アスペクトのさらなる好ましい一態様において、

第一の伸長ボックス B 1 A は G G G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B は G C C C のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 0 】

第四の下位アスペクトの一態様において、該第二の伸長ボックス B 2 A は G K M G U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第四の伸長ボックス B 2 B は A C K M C のヌクレオチド配列を含んでなる。

50

【 0 0 5 1 】

第四の下位アスペクトの好ましい一態様において、該第二の伸長ボックス B 2 A は G U A G U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第四の伸長ボックス B 2 B は A C U A C のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 2 】

第四の下位アスペクトの一態様において、

a) 第六の伸長ボックス B 5 A は G G Y のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第八の伸長ボックス B 5 B は G C Y R のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第六の伸長ボックス B 5 A は C W G C のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第八の伸長ボックス B 5 B は G C W G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 3 】

第四の下位アスペクトの好ましい一態様において、

第六の伸長ボックス B 5 A は G G C のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第八の伸長ボックス B 5 B は G C C G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 4 】

第四の下位アスペクトのより好ましい一態様において、第六の伸長ボックス B 5 A は、第八の伸長ボックス B 5 B のヌクレオチド G C Y とハイブリダイズする。

【 0 0 5 5 】

第四の下位アスペクトの一態様において、該核酸は配列番号 5 6 に記載の核酸配列を含んでなる。

【 0 0 5 6 】

第四の下位アスペクトの一態様において、該核酸は、配列番号 5 7 ないし 6 1、配列番号 6 7 ないし 7 1 および配列番号 7 3 の核酸配列を含んでなる群から選択される核酸配列を含んでなる。

【 0 0 5 7 】

第一のアスペクトの第五の下位アスペクトにおいて、4 型核酸は、5' 3' の方向で、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2、第三の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、

第一の伸長ボックス B 1 A および第三の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

第一の伸長ボックス B 1 A は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックス B 2 は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、ならびに

第三の伸長ボックス B 1 B は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 8 】

該第五の下位アスペクトの一態様において、

a) 第一の伸長ボックス B 1 A は G U G U U のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は G R C A C のヌクレオチド配列を含んでなり；

b) 第一の伸長ボックス B 1 A は G C G C G A G のヌクレオチド配列を含んでなり、
かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は C U C G C G U C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

c) 第一の伸長ボックス B 1 A は C S K S U U のヌクレオチド配列を含んでなり、

10

20

30

40

50

かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は G R S M S G のヌクレオチド配列を含んでなるか、若しくは
d) 第一の伸長ボックス B 1 A は U G U U のヌクレオチド配列を含んでなり、

かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は G G C A のヌクレオチド配列を含んでなるか、若しくは
e) 第一の伸長ボックス B 1 A は A G C G U G D U のヌクレオチド配列を含んでなり、

かつ

第三の伸長ボックス B 1 B は G N C A S G C U のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 5 9 】

第五の下位アスペクトの好ましい一態様において、第一の伸長ボックス B 1 A は C S K
S U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第三の伸長ボックス B 1 B は G R S M S
G のヌクレオチド配列を含んでなる。

10

【 0 0 6 0 】

第五の下位アスペクトのより好ましい一態様において、第一の伸長ボックス B 1 A は C
C G C U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第三の伸長ボックス B 1 B は G G G
C G G のヌクレオチド配列を含んでなる。

【 0 0 6 1 】

第五の下位アスペクトの一態様において、
第二の伸長ボックス B 2 は、A G G U G G G U G G U A G U A A G U A A A G のヌクレオ
チド配列を含んでなる。

20

【 0 0 6 2 】

第五の下位アスペクトの一態様において、該核酸は配列番号 8 0 の核酸配列を含んでな
る。

【 0 0 6 3 】

第一ないし第五の下位アスペクトの一態様において、核酸は M C P - 1、好ましくはヒ
ト M C P - 1 を結合することが可能である。

【 0 0 6 4 】

第一ないし第五の下位アスペクトの一態様において、核酸はケモカインを結合すること
が可能であり、該ケモカインはエオタキシン、M C P - 1、M C P - 2 および M C P - 3
を含んでなる群から選択される。

30

【 0 0 6 5 】

第一ないし第五の下位アスペクトの一態様において、核酸はケモカインを結合すること
が可能であり、該ケモカインはヒトエオタキシン、ヒト M C P - 1、ヒト M C P - 2 およ
びヒト M C P - 3 を含んでなる群から選択される。

【 0 0 6 6 】

第一ないし第五の下位アスペクトの一態様において、核酸は M C P - 1 を結合すること
が可能であり、M C P - 1 は好ましくはサル M C P - 1、ウマ M C P - 1、ウサギ M C P
- 1、ウシ M C P - 1、イヌ M C P - 1、ブタ M C P - 1 およびヒト M C P - 1 を含んで
なる群から選択される。

【 0 0 6 7 】

第一ないし第五の下位アスペクトの一態様において、核酸はヒト M C P - 1 を結合する
ことが可能である。

40

【 0 0 6 8 】

第一ないし第五の下位アスペクトの好ましい一態様において、M C P - 1 は配列番号 1
のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 6 9 】

本発明の根底にある問題は、好ましくはマウス M C P - 1 に結合する核酸により第二の
アスペクトにおいて解決され、該核酸は、配列番号 1 2 2、配列番号 2 5 3 および配列番
号 2 5 4 の核酸配列を含んでなる。

【 0 0 7 0 】

50

本発明の根底にある問題は、好ましくはマウスMCP-1に結合する核酸により第三のアスペクトにおいて解決され、該核酸は配列番号127の核酸配列を含んでなる。

【0071】

第二および第三のアスペクトの一態様において、マウスMCP-1は配列番号2のアミノ酸配列を含んでなる。

【0072】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、該核酸は修飾を含んでなり、該修飾は好ましくは高分子部分であり、かつ/または、該修飾は、好ましくは、動物若しくはヒト身体、好ましくはヒト身体中の滞留時間に関して第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の特徴を改変することを可能にする。

10

【0073】

第一ないし第三のアスペクトの好ましい一態様において、修飾はHES部分およびPEG部分を含んでなる群から選択される。

【0074】

第一ないし第三のアスペクトのより好ましい一態様において、修飾は直鎖若しくは分枝状PEGよりなるPEG部分であり、該PEG部分の分子量は好ましくは約20から120kDまで、より好ましくは約30から80kDまで、および最も好ましくは約40kDである。

【0075】

第一ないし第三のアスペクトの代替のより好ましい一態様において、修飾はHES部分であり、好ましくは該HES部分の分子量は約10から130kDまで、より好ましくは約30から130kDまで、および最も好ましくは約100kDである。

20

【0076】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、修飾はリンカーを介して核酸に結合される。

【0077】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、修飾は、その5'末端ヌクレオチドおよび/若しくはその3'末端ヌクレオチドの核酸に、ならびに/または5'末端ヌクレオチドと3'末端ヌクレオチドの間の核酸のヌクレオチドに結合される。

【0078】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、核酸のヌクレオチド若しくはそれを形成するヌクレオチドはL-ヌクレオチドである。

30

【0079】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、核酸はL-核酸である。

【0080】

第一ないし第三のアスペクトの一態様において、MCP-1を結合することが可能な核酸の部分はL-ヌクレオチドよりなる。

【0081】

本発明の根底にある問題は、第一、第二および第三のアスペクトの核酸、ならびに場合によっては1種のさらなる構成要素を含んでなる製薬学的組成物により、第四のアスペクトにおいて解決され、該さらなる構成要素は、製薬学的に許容できる賦形剤、製薬学的に許容できる担体および製薬学的有効成分を含んでなる群から選択される。

40

【0082】

該第四のアスペクトの一態様において、製薬学的組成物は、第一ないし第三のアスペクトのいずれかの核酸、および製薬学的に許容できる担体を含んでなる。

【0083】

本発明の根底にある問題は、医薬品の製造のための第一、第二および第三のアスペクトの核酸の使用により、第五のアスペクトにおいて解決される。

【0084】

該第五のアスペクトの一態様において、医薬品は、ヒト医学での使用のため若しくは獣

50

医学での使用のためである。

【0085】

本発明の根底にある問題は、診断手段の製造のための第一、第二および第三のアスペクトの核酸の使用により、第六のアスペクトにおいて解決される。

【0086】

第五のアスペクトの一態様において、および第六のアスペクトの一態様において、医薬品および診断手段それぞれは、炎症性疾患、自己免疫疾患、自己免疫性脳脊髄炎、卒中、急性および慢性多発性硬化症、慢性炎症、関節リウマチ、腎疾患、再狭窄、血管形成術後の再狭窄、急性および慢性アレルギー反応、一次的および二次的免疫学的若しくはアレルギー反応、喘息、結膜炎、気管支炎、癌、アテローム硬化症、アテローム硬化性心血管系心不全若しくは卒中、乾癬、乾癬性関節炎、神経系の炎症、アトピー性皮膚炎、大腸炎、子宮内膜症、ブドウ膜炎、黄斑変性を包含する網膜障害、網膜剥離、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、網膜色素変性、増殖性硝子体網膜症、および中心性漿液性網脈絡膜症；特異性肺線維症、サルコイドーシス、多発性筋炎、皮膚筋炎、免疫抑制の回避、感染症のリスクを低下させること、敗血症、腎の炎症、糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、閉塞性腎症、急性尿細管壊死、およびびまん性糸球体硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性気管支炎、ベーチェット病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、川崎病後の早発性アテローム硬化症、心筋梗塞、肥満、慢性肝疾患、ペイロニー病、急性脊髄損傷、肺若しくは腎移植、心筋炎、アルツハイマー病およびニューロパシー、乳癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、過誤腫、結腸直腸癌、結腸腺腫、痔炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、ならびにクローン病若しくは潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患を含んでなる群から選択される疾患若しくは障害のそれぞれ処置および／若しくは予防ならびに診断のためである。

【0087】

論理により束縛されることを望むものではなく、診断目的上の本発明の核酸の適合性は、増大若しくは低下されたケモカインレベルに主に基づき、こうしたケモカインは、エオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択され、より具体的にはMCP-1である。前述の疾患の大部分はこうした増大若しくは低下されたケモカインレベルを示すことが当業者により認められるであろう。

【0088】

本発明の根底にある問題は、ケモカインならびに第一、第二および第三のアスペクトの核酸を含んでなる複合体により、第七のアスペクトにおいて解決され、該ケモカインは、エオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択され、好ましくは該複合体は結晶性複合体である。

【0089】

該第七のアスペクトの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0090】

第七のアスペクトの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

【0091】

本発明の根底にある問題は、ケモカインの検出のための第一、第二および第三の核酸の使用により、第八のアスペクトにおいて解決され、該ケモカインはエオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0092】

該第八のアスペクトの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0093】

第八のAspectの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

【0094】

本発明の根底にある問題は、以下の段階：

・候補ケモカインアンタゴニストおよび／若しくは候補ケモカインアゴニストを提供する段階、

・第一、第二若しくは第三のAspectの核酸を提供する段階、

・ケモカインアンタゴニストおよび／若しくはケモカインアゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を提供する段階、ならびに

・候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうか、および／若しくは候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうかを決定する段階

を含んでなり、

該ケモカインはエオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される、

ケモカインアンタゴニスト若しくはケモカインアゴニストのスクリーニング方法により、第九のAspectにおいて解決される。

【0095】

該第九のAspectの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0096】

第九のAspectの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

【0097】

本発明の根底にある問題は、以下の段階：

・相、好ましくは固相に固定されたケモカインを提供する段階、

・標識されている、第一、第二若しくは第三のAspectの核酸、好ましくは第一のAspectの核酸を提供する段階、

・候補ケモカインアゴニストおよび／若しくは候補ケモカインアンタゴニストを添加する段階、ならびに

・候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうか、および／若しくは候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうかを決定する段階

を含んでなり、

該ケモカインはエオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される、

ケモカインアゴニストおよび／若しくはケモカインアンタゴニストのスクリーニング方法により、第十のAspectにおいて解決される。

【0098】

該第十のAspectの一態様において、該核酸が候補ケモカインアゴニスト若しくは候補ケモカインアンタゴニストにより置換されるかどうか評価されるような該決定することが実施される。

【0099】

第十のAspectの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0100】

第十のアスペクトの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

【0101】

本発明の根底にある問題は、第一、第二および第三のアスペクトの核酸を含んでなる、ケモカインの検出のためのキットにより、第十一のアスペクトにおいて解決され、該ケモカインはエオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0102】

10

該第十一のアスペクトの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0103】

第十一のアスペクトの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

【0104】

本発明の根底にある問題は、第十のアスペクト若しくは第九のアスペクトの方法により得ることが可能なケモカインアンタゴニストにより、第十二のアスペクトにおいて解決され、該ケモカインは、エオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される。

20

【0105】

第十二のアスペクトの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0106】

第十二のアスペクトの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

30

【0107】

本発明の根底にある問題は、第十のアスペクト若しくは第九のアスペクトの方法により得ることが可能なケモカインアゴニストにより、第十三のアスペクトにおいて解決され、該ケモカインは、エオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0108】

第十三のアスペクトの一態様において、ケモカインは、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される。

【0109】

第十三のアスペクトの一態様において、ケモカインはMCP-1であり、MCP-1は、好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である。

40

【0110】

ケモカインアゴニストおよび/若しくはケモカインアンタゴニストが、好ましくは、本明細書に明記されるところのそれぞれのケモカインを扱うそれぞれアゴニストおよびアンタゴニストであることが、当業者により認められるであろう。従って、ケモカインアゴニストおよびケモカインアンタゴニストは、例えばそれぞれMCP-1アゴニストおよびMCP-1アンタゴニストである。

【0111】

50

本発明の根底にある問題は、サンプル中の第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の検出方法により、第十四のアスペクトにおいて解決され、該方法は：

- a) 本発明の核酸を含有するサンプルを提供する段階；
- b) 捕捉プローブ（該捕捉プローブは第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的であり）、ならびに検出プローブ（該検出プローブは第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であるか、若しくは、あるいは、該捕捉プローブは第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該検出プローブは第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的である）を提供する段階；
- c) 捕捉プローブおよび検出プローブを、同時に若しくはいずれかの順序で連続してのいずれかで、第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸若しくはその部分と反応させる段階；
- d) 場合によっては、捕捉プローブが、段階 a) で提供される第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸に従った核酸にハイブリダイズするかどうかを検出する段階；ならびに
- e) 第一、第二および第三のアスペクトのいずれかの核酸、ならびに捕捉プローブおよび検出プローブよりなる段階 c) で形成される複合体を検出する段階を含んでなる。

10

【 0 1 1 2 】

20

該第十四のアスペクトの一態様において、検出プローブは検出手段を含んでなり、かつ／若しくは捕捉プローブは支持体、好ましくは固体支持体に固定され得る。

【 0 1 1 3 】

第十四のアスペクトの一態様において、複合体の一部でないいかなる検出プローブも、段階 e) で複合体の一部である検出プローブのみが検出されるように反応から除去される。

【 0 1 1 4 】

第十四のアスペクトの一態様において、段階 e) は、第一、第二若しくは第三のアスペクトのいずれかの核酸またはその部分の存在下および前記核酸若しくはその部分の非存在下で捕捉プローブおよび検出プローブがハイブリダイズされる場合に検出手段により生成されるシグナルを比較する段階を含んでなる。

30

【 0 1 1 5 】

第十四のアスペクトの一態様において、検出されるべき核酸は、配列番号 3 7、1 1 6、1 1 7 若しくは 2 7 8 の核酸配列を有する核酸であり、かつ、捕捉プローブ若しくは検出プローブは、配列番号 2 5 5 若しくは配列番号 2 5 6 の核酸配列を含んでなる。

【 0 1 1 6 】

第十四のアスペクトの一態様において、検出されるべき核酸は、配列番号 1 2 2、2 5 3 若しくは 2 5 4 の核酸配列を有する核酸であり、かつ、捕捉プローブ若しくは検出プローブは、配列番号 2 8 1 および配列番号 2 8 2 の核酸配列を含んでなる。

40

【 0 1 1 7 】

[発明の詳細な記述]

本発明の根底にある問題は、それに付属される独立請求項の主題によってもまた解決される。好ましい態様は付属される従属請求項から採用しうる。

【 0 1 1 8 】

本明細書に記述されるところの本発明の核酸の特徴は、単独で若しくはいずれかの組合せのいずれかで核酸を使用する本発明のいかなるアスペクトでも実現し得る。

【 0 1 1 9 】

ヒトならびにマウスの MCP - 1 は、それぞれ配列番号 1 および 2 のアミノ酸配列を有する基本的タンパク質である。

【 0 1 2 0 】

50

MCP-1に対する短い高親和性結合核酸を同定し得たという知見は、基本的タンパク質に向けられるアダプターすなわち標的分子へのD-核酸結合の生成が、高いがしかし非特異的S/N比をこの種の標的が生じるために一般に非常に困難であることをEatonら(1997)が観察した限りにおいては驚くべきである。この高S/N比は、MCP-1のような基礎的標的に対し核酸により示される高い非特異的親和性から生じる。

【0121】

特許請求の範囲および実施例1により詳細に概説されるとおり、本発明者は、多数の異なるMCP-1結合核酸分子をより驚くべきことに同定し得、それにより該核酸の大部分を本明細書でボックスともまた称されるヌクレオチドの伸長に関して特徴付け得た。多様なMCP-1結合核酸分子は、それぞれ前記ボックスならびにいくつかの構造的特徴および要素に基づき分類し得る。かように定義された多様な範疇は、本明細書で型ならびにより具体的には1A型、1B型、2型、3型および4型ともまた称される。

10

【0122】

本発明の核酸は、本明細書に開示される特定の配列に本質的に相同である核酸もまた含んでなる。相同性が最低75%、好ましくは85%、より好ましくは90%および最も好ましくは95%、96%、97%、98%若しくは99%以上であるような、実質的に相同という用語が理解されるべきである。

【0123】

本発明の核酸に存在する相同なヌクレオチドの実際の比率は、該核酸に存在するヌクレオチドの総数に依存することができる。改変パーセントは該核酸に存在するヌクレオチドの総数に依存し得る。

20

【0124】

相同性は当業者に既知のとおり決定し得る。より具体的には、配列比較アルゴリズムが、その場合、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列に関する試験配列(1種若しくは複数)について配列同一性パーセントを計算する。試験配列は、好ましくは、それが別の核酸分子に相同であるかどうか、およびもしそうであればどの程度かを試験すべきと言われる若しくは試験すべきである配列若しくは核酸分子であり、それによりこうした別の核酸分子は参照配列ともまた称される。一態様において、参照配列は本明細書に記述されるところの核酸分子、より好ましくは、配列番号10ないし129、132ないし256および278~282のいずれかの配列を有する核酸分子である。比較のための配列の至適のアライメントは、例えばSmithとWatermanの局所相同性アルゴリズム(SmithとWaterman、1981)NeedlemanとWunschの相同性アライメントアルゴリズム(NeedlemanとWunsch、1970)PearsonとLipmanの相同性検索法(PearsonとLipman、1988)、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装(Wisconsin Genetics ソフトウェアパッケージ、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、ウィスコンシン州マディソンのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、若しくは目視検査により、実施し得る。

30

【0125】

配列同一性パーセントを決定するのに適するアルゴリズムの一例は、基本的局所アライメント検索ツール(下で「BLAST」)で使用されるアルゴリズムである。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国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)(下で「NCBI」)から公的に入手可能である。NCBIから入手可能なソフトウェア、例えばBLASTN(ヌクレオチド配列のため)およびBLASTP(アミノ酸配列のため)を使用する配列同一性の決定において使用されるデフォルトのパラメータが、McGinnisら(McGinnisら、2004)に記述されている。

40

【0126】

50

発明の核酸、若しくは本発明の核酸という用語は、本明細書に開示される核酸配列若しくはそれらの部分を、好ましくは該核酸若しくは前記部分がMCP-1への結合に關与する程度まで含んでなる核酸もまた含んでなる。本明細書で好ましく使用されるところの発明の核酸という用語は、MCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンを含んでなる群から選択されるいずれかの分子に結合するのに適する核酸も、一態様においてまた含んでなる。本発明の個々の核酸はこうした分子の1若しくは数種に結合することができるが、当業者により認められるであろう。こうした核酸は、一態様において、本明細書に記述される核酸分子の1種、またはその誘導体および/若しくは代謝物であり、こうした誘導体および/若しくは代謝物は、好ましくは、本明細書に記述される核酸分子に比較して切断された核酸である。切断は、本明細書に開示されるところの核酸の端のいずれか若しくは双方に關しうる。また、切断は、核酸のヌクレオチドの内部配列に關しうる。すなわち、それはそれぞれ5'および3'末端ヌクレオチドの間のヌクレオチド(1個若しくは複数)に關しうる。さらに、切断は、本明細書に開示される核酸の配列からのわずかな単一ヌクレオチドの欠失を含んでなる。切断は、発明の核酸(1種若しくは複数)の1個以上の伸長にもまた關することができ、該伸長は約1ヌクレオチド長であり得る。好ましくはMCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンを含んでなる群から選択される分子への本発明の核酸の結合は、慣例の実験を使用して、または本明細書に開示されるところの、好ましくは実施例の部で本明細書に記述されるところの方法を使用若しくは採用することにより、当業者により決定され得る。それとは反対に明示的に示されない限り、それが本発明の核酸の若しくはMCP-1との結合と本明細書で称される場合はいつも、MCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンを含んでなる群から選択されるいずれかの分子への若しくはそれらとの本発明の核酸の結合にもこれがまた当てはまることは、本発明の一態様内にある。

【0127】

本発明の核酸はD-核酸若しくはL-核酸いずれでもありうる。好ましくは、発明の核酸はL-核酸である。加えて、核酸の一部若しくはいくつかの部分がD-核酸として存在するか、または核酸の少なくとも一部分若しくはいくつかの部分がL-核酸であることが可能である。核酸の「部分」という用語は約1ヌクレオチドを意味している。こうした核酸は一般に本明細書でそれぞれD-およびL-核酸と称される。従って、とりわけ好ましい一態様において、本発明の核酸はL-ヌクレオチドよりなりかつ最低1個のD-ヌクレオチドを含んでなる。こうしたD-ヌクレオチドは、好ましくは、本発明の核酸を規定する伸長と異なる部分、好ましくは、該核酸の他の部分との相互作用が關わるその部分に結合される。好ましくは、こうしたD-ヌクレオチドは、それぞれ伸長のいずれかおよび本発明のいずれかの核酸の一末端に結合される。さらなる好ましい一態様において、こうしたD-ヌクレオチドは、好ましくは本発明の核酸にPEGおよびHESのような修飾を結合するスペーサー若しくはリンカーとして作用しうる。

【0128】

それらの核酸配列(1種若しくは複数)に關してそっくりそのまま本明細書に記述される核酸分子のそれぞれおよびいずれも特定のヌクレオチド配列(1種若しくは複数)に制限されることもまた、本発明の一態様内にある。言い換えれば「含んでなること」若しくは「含んでなる」という用語は、こうした態様において含有すること若しくはよりなることという意味に解釈されるべきである。

【0129】

本発明の核酸がより長い核酸の部分であり、このより長い核酸はいくつかの部分を含んでなり、最低1個のこうした部分が本発明の核酸若しくはその一部分であることもまた、本発明内にある。これらのより長い核酸の他の部分(1個若しくは複数)は1若しくは数個のD-核酸または1若しくは数個のL-核酸のいずれでもあり得る。いかなる組合せも本発明とともに使用しうる。単独の若しくは一緒にされるのいずれのより長い核酸のこれらの他の部分(1個若しくは複数)も、そっくりそのまま若しくは特定の組合せでのいずれかで、結合、好ましくはMCP-1への結合と異なる機能を表し得る。1つの可能な機

能は他の分子との相互作用を可能にすることであり、それによりこうした他の分子は、好ましくは例えば固定、架橋、検出若しくは増幅についてのようにMCP-1と異なる。本発明のさらなる一態様において、本発明の核酸は、個別の若しくは組合せられた部分として、本発明の核酸の数種を含んでなる。本発明の核酸の数種を含んでなるこうした核酸もまたより長い核酸という用語により包括される。

【0130】

本明細書で使用されるところのL-核酸は、L-ヌクレオチドよりなる、好ましくは完全にL-ヌクレオチドよりなる核酸である。

【0131】

本明細書で使用されるところのD-核酸は、D-ヌクレオチドよりなる、好ましくは完全にD-ヌクレオチドよりなる核酸である。

10

【0132】

核酸および核酸分子という用語は、それとは反対に明示的に示されない場合は互換性の様式で本明細書で使用する。

【0133】

また、それとは反対に示されない場合、いかなるヌクレオチド配列も本明細書で5' 3'の方向で示される。

【0134】

発明の核酸がD-ヌクレオチド、L-ヌクレオチド若しくは双方の組合せ（該組合せは例えば無作為の組合せであるか、若しくは最低1個のL-ヌクレオチドおよび最低1種のD-核酸よりなる伸長の定義された配列である）よりなるかどうかに関係なく、該核酸は、デオキシリボヌクレオチド（1個若しくは複数）、リボヌクレオチド（1個若しくは複数）またはそれらの組合せよりなることができる。

20

【0135】

発明の核酸をL-核酸として設計することはいくつかの理由から有利である。L-核酸は天然に存在する核酸の鏡像異性体である。D-核酸は、しかしながら、ヌクレアーゼの広範囲の存在により、水性溶液、およびとりわけ生物学的系若しくは生物学的サンプル中で非常に安定ではない。天然に存在するヌクレアーゼ、とりわけ動物細胞からのヌクレアーゼはL-核酸を分解することが可能でない。このため、L-核酸の生物学的半減期は、動物およびヒトの身体を包含するこうした系で有意に延長される。L-核酸の欠如する分解性により、ヌクレアーゼ分解生成物は生成されず、そして従ってそれから生じる副作用は観察されない。このアスペクトは、MCP-1の存在が関わる疾患および/若しくは障害の治療で使用する事実上全部の他の化合物のL-核酸の範囲を定める。ワトソン・クリック塩基対形成と異なる機構により標的分子に特異的に結合するL-核酸、またはL-ヌクレオチドより部分的に若しくは完全になるアプタマー（とりわけアプタマーのそれらの部分は標的分子へのアプタマーの結合に關与する）はシュビーゲルマーともまた呼ばれる。

30

【0136】

本明細書で本発明の核酸ともまた称される発明の核酸は、それらがD-核酸、L-核酸若しくはD, L-核酸として存在するかどうか、またはそれらがDNAであるか若しくはRNAであるかどうかに関係なく、一本鎖若しくは二本鎖核酸として存在しうることもまた本発明内にある。典型的には、発明の核酸は、一次配列により規定された二次構造を表しかつ従って三次構造もまた形成しうる一本鎖核酸である。発明の核酸は、しかしながら、相互に対し相補的若しくは部分的に相補的である2本の鎖が相互にハイブリダイズされるという意味で二本鎖でもまたありうる。これは、核酸がL体よりむしろ天然に存在するD体で存在する場合ににとりわけ有利であることができる安定性を核酸に賦与する。

40

【0137】

発明の核酸は修飾しうる。こうした修飾は核酸の単一ヌクレオチドに關することができ、そして当該技術分野で公知である。こうした修飾の例は、とりわけ、Venkatesan (2003); Kusser (2000); Aurup (1994); Cummin

50

s (1 9 9 5) ; E a t o n (1 9 9 5) ; G r e e n (1 9 9 5) ; K a w a s a k i (1 9 9 3) ; L e s n i k (1 9 9 3) ; および M i l l e r (1 9 9 3) に記述されている。こうした修飾は、それらより核酸がなる個々のヌクレオチドの 2 ' 位の H 原子、F 原子または O - C H 3 基若しくは N H 2 基であり得る。また、本発明の核酸は最低 1 個の L N A ヌクレオチドを含み得る。一態様において、本発明の核酸は L N A ヌクレオチドよりなる。

【 0 1 3 8 】

一態様において、本発明の核酸は多分割の核酸でありうる。本明細書で使用されるところの多分割の核酸は、最低 2 種の核酸鎖よりなる核酸である。これらの最低 2 種の核酸鎖は一機能単位を形成し、該機能単位は標的分子に対するリガンドである。該最低 2 種の核酸鎖は、2 本の鎖を生成するように核酸を切断すること、若しくは発明のすなわち全体的核酸の第一の部分に対応する一核酸および該全体的核酸の第二の部分に対応する別の核酸を合成することのいずれかにより、発明の核酸のいずれかに由来しうる。切断および合成の双方を、上で例示されたところの 2 種以上の鎖が存在する多分割の核酸を生成するために応用しうるということが認められるべきである。言い換えれば、該最低 2 種の核酸鎖は、典型的には、相補的でありかつ相互にハイブリダイズする 2 本の鎖と異なるとは言え、多様な核酸部分の間のある程度の相補性が存在しうる。

【 0 1 3 9 】

最後に、本発明の核酸の完全に閉鎖したすなわち環状構造が実現され、すなわち、本発明の核酸は好ましくは共有結合により閉鎖され、それによりより好ましくはこうした共有結合は本明細書に開示されるところの核酸配列の 5 ' 端と 3 ' 端の間で作成されることもまた、本発明内にある。

【 0 1 4 0 】

本発明者は、本発明の核酸が非常に好都合な K_D 値範囲を表すことを発見した。

【 0 1 4 1 】

結合定数を決定することの可能性は、当業者にもまた既知であるいわゆる *biacore* 装置の使用である。本明細書で使用されるところの親和性を、実施例に記述されるところの「プルダウンアッセイ」の使用によってもまた測定した。本場合に M C P - 1 である標的による核酸の間の結合の強度を表すための適切な一尺度は、それ自体同様にその測定方法が当業者に既知であるいわゆる K_D 値である。

【 0 1 4 2 】

本発明の核酸はある種の K_D 値を特徴とする。好ましくは、本発明の核酸により示される K_D 値は $1 \mu M$ より下である。約 $1 \mu M$ の K_D 値は、標的への核酸の非特異的結合に特徴的であると言われる。当業者により認められるであろうとおり、本発明の核酸のような化合物の群の K_D 値はある範囲内にある。約 $1 \mu M$ という上述された K_D は該 K_D 値の好ましい上限である。標的結合核酸の K_D の好ましい下限は約 10 ピコモル濃度若しくはそれ以上であり得る。M C P - 1 への個々の核酸の結合の K_D 値が好ましくはこの範囲内にあることが本発明内にある。好ましい範囲は、この範囲内のいずれかの第一の数およびこの範囲内のいずれかの第二の数を選ぶことにより定義し得る。好ましい上値は 250 nM および 100 nM であり、好ましい下値は 50 nM、10 nM、1 nM、100 pM および 10 pM である。

【 0 1 4 3 】

本発明の核酸分子はいかなる長さも有しうるが、但しそれらは標的分子になお結合することが可能である。本発明の核酸の好ましい長さが存在することが当該技術分野で認められるであろう。典型的には、該長さは 15 と 120 ヌクレオチドの間である。15 と 120 の間のいずれの整数も本発明の核酸に可能な長さであることが当業者により認められるであろう。本発明の核酸の長さのより好ましい範囲は、約 20 ないし 100 ヌクレオチド、約 20 ないし 80 ヌクレオチド、約 20 ないし 60 ヌクレオチド、約 20 ないし 50 ヌクレオチド、および約 30 ないし 50 ヌクレオチドの長さである。

【 0 1 4 4 】

本明細書に開示される核酸は、好ましくは高分子量部分でありかつ／若しくは好ましくはとりわけ動物の身体、好ましくはヒト身体内での滞留時間に関して核酸の特徴を改変することを可能にする部分を含んでなることが、本発明内にある。こうした修飾のとりわけ好ましい一態様は本発明の核酸のPEG化およびHES化である。本明細書で使用されるところのPEGはポリ（エチレングリコール）を、およびHESはヒドロキシエチルデンプンを示す。好ましく本明細書で使用されるところのPEG化は、こうした修飾が本発明の核酸に結合されるPEG部分よりなる、本発明の核酸の修飾である。好ましく本明細書で使用されるところのHES化は、こうした修飾が本発明の核酸に結合されるHES部分よりなる、本発明の核酸の修飾である。これらの修飾、ならびにこうした修飾を使用する核酸の修飾方法は、欧州特許出願第EP 1 306 382号明細書（その開示はこれによって引用することによりそっくりそのまま組み込まれる）に記述されている。

10

【0145】

好ましくは、高分子量部分よりなる若しくはそれを含んでなる修飾の分子量は、とりわけこうした高分子量であるPEGの場合は約2,000から200,000Daまで、好ましくは20,000ないし120,000Daであり、また、とりわけこうした高分子量部分であるHESの場合は好ましくは約3,000から180,000Daまで、より好ましくは5,000から130,000Daまでである。HES修飾の方法は、例えば独国特許出願第DE 1 2004 006 249.8号明細書（その開示はこれによって引用することによりそっくりそのまま組み込まれる）に記述されている。

20

【0146】

PEGおよびHESのいずれも、特許出願第WO 2005 074993号および第PCT/EP 02/11950号明細書にさらに記述されるところから直鎖若しくは分枝状いずれとしても使用しうることが本発明内にある。こうした修飾は、原則として、本発明の核酸分子にそのいずれの位置でも行い得る。好ましくは、こうした修飾は、該核酸分子の5'末端ヌクレオチド、3'末端ヌクレオチド、および／若しくは5'ヌクレオチドと3'ヌクレオチドの間のいずれかのヌクレオチドのいずれでもなされる。

【0147】

該修飾、ならびに好ましくはPEGおよび／若しくはHES部分は、本発明の核酸分子に直接若しくはリンカーを通じてのいずれでも結合し得る。本発明の核酸分子が1個若しくはそれ以上の修飾、好ましくは1個若しくはそれ以上のPEGおよび／若しくはHES部分を含んでなることもまた本発明内にある。一態様において、個々のリンカー分子は、1個以上のPEG部分若しくはHES部分を本発明の核酸分子に結合する。本発明とともに使用されるリンカーは、それ自身直鎖若しくは分枝状いずれでもあり得る。この種類のリンカーは当業者に既知であり、そして特許出願第WO 2005 074993号および第PCT/EP 02/11950号明細書にさらに記述されている。

30

【0148】

いずれかの論理により束縛されることを願わず、好ましくは生理学的に許容できるポリマーおよびより具体的には本明細書に開示されるポリマーのような高分子量部分で本発明の核酸を修飾することにより、排泄のキネティックが変化されるようである。より具体的には、こうした修飾された発明の核酸の増大された分子量により、およびとりわけL形態の場合の代謝にさらされない核酸により、動物の身体、好ましくは哺乳動物の身体およびより好ましくはヒト身体からの排泄が低下されるようである。排泄は典型的に腎を介して起こるため、本発明者は、かように修飾された核酸の糸球体濾過速度が、身体中の滞留時間の増大をもたらすこの種類の高分子量修飾を有しない核酸に比較して有意に低下されると推定する。それと関係して、こうした高分子量修飾にもかかわらず、本発明の核酸の特異性が有害な様式で影響を及ぼされないことにとりわけ注目すべきである。その限りにおいて、本発明の核酸は、徐放を提供する製薬学的製剤が徐放を提供するために必ずしも必要とされないような、製薬学的有効成分から通常期待され得ない驚くべき特徴を有する。むしろ、高分子量部分を含んでなるそれらの修飾された形態の本発明の核酸は、であるから、徐放製剤として既に使用され得る。その限りにおいて、本明細書に開示される核酸分

40

50

子の修飾（１個若しくは複数）およびかように修飾された核酸分子ならびにそれらを含んでなるいずれの組成物も、独特な、好ましく制御された薬物動態およびそれらの生物分布を提供しうる。これは循環中の滞留時間および組織への分布もまた包含する。こうした修飾は特許出願第 P C T / E P 0 2 / 1 1 9 5 0 号明細書にさらに記述される。

【 0 1 4 9 】

しかしながら、本明細書に開示される核酸がいかなる修飾および具体的には P E G 化若しくは H E S 化のような高分子量修飾を含まないこともまた本発明内にある。こうした態様は、核酸が身体中のいずれかの標的器官若しくは組織への優先的分布を示す場合にとりわけ好ましい。こうした分布プロファイルを伴う核酸剤は、全身濃度を低く保ちつつ標的組織中の有効局所濃度の確立を可能にするとみられる。これは、経済的観点から有益であるのみならず、しかしまた核酸剤への他の組織の不必要な曝露も低下させて、かように副作用の潜在的危険を低下させる、低用量の使用を可能にするとみられる。

【 0 1 5 0 】

本発明の核酸ともまた本明細書で称される発明の核酸、および／若しくは本発明のアンタゴニストは、医薬品の生成若しくは製造に使用しうる。本発明のこうした医薬品若しくは製薬学的組成物は、場合によってはさらなる製薬学的有効成分と一緒に発明の核酸の最低１種を含有し、それにより発明の核酸は好ましくは製薬学的有効成分それ自身として作用する。こうした医薬品は、好ましい態様において最低１種の製薬学的に許容できる担体を含んでなる。こうした担体は、例えば、水、緩衝液、P B S、ブドウ糖溶液、好ましくは５％ブドウ糖塩類平衡溶液、デンプン、糖、ゼラチン若しくはいずれかの他の許容できる担体物質でありうる。こうした担体は一般に当業者に既知である。本発明の医薬品の若しくはそれに関するいかなる態様、使用およびアスペクトも本発明の製薬学的組成物にもまた応用可能であり、かつ、逆もまた真であることが、当業者により認められるであろう。

【 0 1 5 1 】

その処置および／若しくは予防のために、本発明の若しくはそれにより製造される核酸、製薬学的組成物および医薬品が、それぞれの発病機序における M C P - 1 の直接若しくは間接いずれかの関与から生じる適応症、疾患および障害。しかしながらまた、その発病機序において M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 および／若しくはエオタキシンが直接若しくは間接的にいずれかで関与する適応症、疾患および障害を処置および予防し得る。とりわけ、本発明の核酸を、その限りにおいて、すなわちそれぞれ M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 およびエオタキシンに若しくはそれらとそれぞれ相互作用および結合する、M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 およびエオタキシンがより広範な意味で関わる疾患に使用し得ることが、当業者に明らかであろう。

【 0 1 5 2 】

より具体的には、こうした使用は、とりわけ、それが単核細胞浸潤を特徴とするヒト疾患で重要な役割を演じていることを示唆する M C P - 1 の発現パターンから生じる。こうした細胞浸潤は多くの炎症性および自己免疫疾患に存在する。動物モデルにおいて、M C P - 1 は、局所虚血後の脳 (K i m 1 9 9 5 ; W a n g 1 9 9 5) および実験的自己免疫性脳脊髄炎の間 (H u l k o w e r 1 9 9 3 ; R a n s o h o f f 1 9 9 3 ; B a n i s o r 2 0 0 5) で発現されることが示されている。M C P - 1 は、卒中および多発性硬化症のようなこれらの動物モデルにより具体的に説明される疾患過程で単核細胞を標的とする重要なケモカインでありうる。

【 0 1 5 3 】

証拠の大部分は、単球走化性および従って慢性炎症における M C P - 1 / C C R 2 系の独特の役割を支持して議論している。すなわち (i) M C P - 1 若しくは C C R 2 欠損マウスは、それ以外は正常に見える一方で顕著に低下されたマクロファージ走化性応答を示す (K u z i e l 1 9 9 7 ; K u r i h a r a 1 9 9 7 ; B o r i n g 1 9 9 7 ; L u 1 9 9 8) 。 (i i) 、 i n v i t r o での他のケモカインでの機能的余剰にもかかわらず、M C P - 1 エフェクター機能単独の喪失は、数種の炎症モデルで単球輸送を

減じるのに十分である (Lloyd 1997; Furuichi 2003; Egashira 2002; Galasso 2000; Ogata 1997; Kennedy 1998; Gonzalo 1998; Kitamoto 2003)。(iii)、MCP-1 レベルは多くの炎症性疾患で上昇される。事実、MCP-1 は、関節リウマチ (Koch 1992; Hosaka 1994; Akahoshi 1993; Harigai 1993; Rollins 1996)、腎疾患 (Wada 1996; Viedt 2002)、血管形成術後の再狭窄 (Economou 2001)、アレルギーおよび喘息 (Alam 1996; Holgate 1997; Gonzalo 1998)、癌 (Salcedo 2000; Gordillo 2004)、アテローム硬化症 (Nelken 1991; Yla-Herttuala 1991; Schwartz 1993; Takeya 1993; Boring 1998)、乾癬 (Vestergaard 2004)、神経系の炎症 (Huang 2001)、アトピー性皮膚炎 (Kaburagi 2001)、大腸炎 (Okuno 2002)、子宮内膜症 (Jolicœur 2001)、ブドウ膜炎 (Tuailion 2002)、網膜障害 (Nakazawa 2007)、特発性肺線維症およびサルコイドーシス (Iyonaaga 1994) ならびに多発性筋炎/皮膚筋炎 (De Bleecker 2002) のような、明らかな炎症成分を伴うおよび伴わない多くの疾患である役割を演じていると考えられている。

【0154】

抗 MCP-1 剤若しくは CCR2 アンタゴニストでの治療的介入は、過剰の炎症性単球輸送に影響を及ぼすとみられるが、しかし、食細胞の基礎的輸送を節約して、それにより全身免疫抑制および感染の増大された危険を回避しうる (Dawson 2003)。

【0155】

加えて、炎症過程の分子機序および局所で分泌される炎症メディエーターの相互作用に関する増大する知識に基づき、腎疾患の治療のための新たな標的が同定された (Holdsworth 2000; Segerer 2000)。適切な動物モデルで特異的アンタゴニストを用いる発現および介入に関する確実なデータが存在する標的の1つが、MCP-1 である。このタンパク質は、腎の炎症の部位への免疫細胞動員に対し、広範に非重複性の役割を有する。腎への免疫細胞の浸潤は、多様な形態の腎疾患の発症における構造的腎損傷および腎機能の低下の主要な機序であると考えられている。

【0156】

全部の型の腎細胞は *in vitro* での刺激に際して、MCP-1 を包含するケモカインを発現し得 (Segerer 2000)、サイトカイン、酸素ラジカル、免疫複合体および脂質メディエーターを包含する、*in vitro* で MCP-1 発現を誘発する刺激の長い一覧が存在する。

【0157】

ラットおよびマウスの健康な腎では MCP-1 は発現されないが、しかし、免疫複合体型系球体腎炎、急速進行性系球体腎炎、増殖性系球体腎炎、糖尿病性腎症、閉塞性腎症若しくは急性腎尿細管壊死を包含する腎の炎症の急性および慢性のげっ歯類モデルの経過の間に、容易に上方制御される (Segerer 2000; Anders 2003)。げっ歯類での MCP-1 の発現データはヒト腎生検で見出されるそれぞれの発現と良好に相関する (Rovin 1994; Cockwell 1998; Wada 1999)。さらに、ヒト腎における腎発現は、疾患の活動性と関連しており、そして適切な治療が疾患の寛解を誘導した場合に低下する (Amann 2003)。

【0158】

系球体単核細胞浸潤は、糖尿病性腎症を伴う患者におけるびまん性系球体硬化症の発症と関連している。MCP-1 は、系球体内の単球およびリンパ球の動員および蓄積で重要な役割を演じている (Banba 2000; Morii 2003)。

【0159】

局所で産生される MCP-1 は、腎毒性血清誘発性腎炎 (NSN) を伴うトランスジェ

10

20

30

40

50

ニックマウスを使用する実験で示されたとおり、尿細管間質損傷の開始および進行にとりわけ関与しているようである。MCP-1は、主として、間質病変中の血管内皮細胞、尿細管上皮細胞および浸潤した単核細胞中で検出された。尿細管上皮細胞のMCP-1媒介性の活性化は、MCP-1が尿細管間質炎症（進行性腎疾患の特質）に寄与するという概念と矛盾しない（Wada 2001; Viedt 2002）。

【0160】

一方でMCP-1、ならびに他方でMCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンの間の相同性により、本発明の核酸、それらのうち少なくともそれぞれMCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンと相互作用若しくはそれらに結合するものは、典型的に、MCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンがそれぞれ直接若しくは間接的にいずれかで関与しているいかなる疾患の処置、予防および/若しくは診断に使用し得る。好ましく本明細書で使用されるところの関与するは、疾患に関与するそれぞれの分子が該疾患の根底にある発病機序に関してその機能の1、数種若しくは全部を発揮することを予防される場合に、該疾患が治癒される、若しくはその程度が低下される、若しくはその大発生が予防されるであろうことを意味しており、それぞれ該症状および指標が、疾患に罹っていないか若しくはこうした疾患を発症する危険にさらされていない被験体でみられるもの（1種若しくは複数）と同一若しくはそれらにより近くなるような、こうした疾患の少なくとも症状若しくはいずれかの指標がそれぞれ解消および改善されることができる。

【0161】

もちろん、本発明のMCP-1結合核酸はヒト若しくはマウスMCP-1と相互作用するか若しくはそれに結合するため、当業者は、本発明のMCP-1に結合する核酸を、ヒトおよび動物の本明細書に記述されるところのいずれかの疾患の処置、予防および/若しくは診断に容易に使用し得ることを一般に理解するであろう。

【0162】

単球走化性タンパク質（MCP）ファミリーのこれらのメンバーすなわちMCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンは、従って、MCP-1と高程度の配列類似性を共有する。独占的でないとは言え、エオタキシン、MCP-2、-3および-4は、ヒト好酸球上の特徴的ケモカイン受容体CCR3を介して相互作用する（Heath 1997）。CCR3受容体は、皮膚T細胞リンパ腫（Kleinhans 2003）、神経膠芽腫（Kouno 2004）若しくは腎細胞癌（Johrer 2005）のような腫瘍状態で上方制御される。

【0163】

より具体的には、上昇されたレベルのエオタキシンは喘息診断および損なわれた肺機能と直接関連する（Nakamura 1999）。アレルギー性炎症の部位のエオタキシンの上昇された発現は、アトピー性および非アトピー性双方の喘息患者で観察されている（Ying 1997; Ying 1999）。また、MCP-2および-4をコードするmRNAは多様な組織中で構成的に発現されるが、これらの状況でのそれらの生理学的機能はしかしながら未知である。血漿MCP-2濃度は敗血症においてMCP-1と一緒に上昇され（Bossink 1995）、MCP-3発現は喘息患者で起こる（Humbert 1997）。最後に、MCP-4はアテローム硬化症の血管の管腔表面で見出され得る（Berkhout 1997）。

【0164】

従って、その処置および/若しくは予防に本発明の医薬品を使用しうる疾患および/若しくは障害および/若しくは疾患に罹った状態は、限定されるものでないが、炎症性疾患、自己免疫疾患、自己免疫性脳脊髄炎、卒中、急性および慢性多発性硬化症、慢性炎症、関節リウマチ、腎疾患、再狭窄、血管形成術後の再狭窄、急性および慢性アレルギー反応、一次的および二次的免疫学的若しくはアレルギー反応、喘息、結膜炎、気管支炎、癌、アテローム硬化症、アテローム硬化性心血管系心不全若しくは卒中、乾癬、乾癬性関節炎、神経系の炎症、アトピー性皮膚炎、大腸炎、子宮内膜症、ブドウ膜炎、黄斑変性、網膜

剥離、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、網膜色素変性、増殖性硝子体網膜症、および中心性漿液性網脈絡膜症を包含する網膜障害；特発性肺線維症、サルコイドーシス、多発性筋炎、皮膚筋炎、免疫抑制の回避、感染症のリスクを低下させること、敗血症、腎の炎症、糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、閉塞性腎症、急性尿細管壊死、およびびまん性糸球体硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性気管支炎、ベーチェット病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、川崎病後の早発性アテローム硬化症、心筋梗塞、肥満、慢性肝疾患、ペイロニー病、急性脊髄損傷、肺若しくは腎移植、心筋炎、アルツハイマー病、およびニューロパシー、乳癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、過誤腫、結腸直腸癌、結腸腺腫、膵炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）ならびにクローン病若しくは潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患を挙げることができる。

10

【0165】

さらなる一態様において、医薬品はさらなる製薬学的有効成分を含んでなる。こうしたさらなる製薬学的有効成分は、とりわけ、限定されるものでないが、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤およびアンジオテンシン受容体阻害薬のような血圧および糖尿病を制御することが既知のものを挙げることができる。さらなる製薬学的有効成分は、さらなる一態様において、慢性炎症の部位への炎症細胞の浸潤を低下させるか若しくは慢性炎症の状況で存在しかつ組織損傷に至る過剰増殖性免疫応答を全般に抑制する化合物の1種でもまたあり得る。こうした化合物は、限定されるものでないがステロイド若しくは免疫抑制薬を挙げることができ、そして、好ましくは、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ヒドロコルチゾン、デキサメサゾンのようなコルチコステロイド、およびシクロホスファミド、シクロスポリン、クロラムブシル、アザチオプリン、タクロリムス若しくはミコフェノール酸モフェチルのような全身性免疫抑制薬を含んでなる群から選択される。加えて、T細胞共刺激のより特異的な阻害剤、例えばCD154若しくはCD40若しくはCD28若しくはCD86若しくはCD80の阻害剤、または抗CD20剤のようなTおよび/若しくはB細胞枯渇剤が、さらなる態様において有用である。最後に、さらなる製薬学的有効成分は、ケモカインアゴニスト若しくはアンタゴニスト、またはケモカイン受容体アゴニスト若しくはアンタゴニストであり得るいずれかの他のケモカインの活性の調節物質でありうる。あるいは、若しくは加えて、こうしたさらなる製薬学的有効成分は本発明のさらなる核酸である。あるいは、該医薬品は、MCP-1と異なる標的分子に結合するか若しくは本発明の核酸の1種と異なる機能を表す最低1種のさらなる核酸を含んでなる。

20

30

【0166】

該医薬品が、あるいは、若しくは加えて、原則として前記疾患の処置のための医薬品の使用に関して開示される疾患のいずれかの予防に使用されることが、本発明内にある。それぞれのマーカーは、従って、すなわち、それぞれの疾患について当業者に既知である。好ましくはそれぞれのマーカーはMCP-1である。あるいは、および/若しくは加えて、それぞれのマーカーはMCP-2、MCP-3、MCP-4およびエオタキシンを含んでなる群から選択される。マーカーのなおさらなる一群は、例えば抗dsDNA抗体若しくはリウマチ因子のような血漿中の自己反応性抗体を含んでなる群から選択される。

【0167】

本発明の医薬品の一態様において、こうした医薬品は、本明細書に開示される疾患、とりわけ本発明の医薬品を使用すべきであるもののいずれかのための他の処置とともにの使用のためである。

40

【0168】

「併用療法」（若しくは「共療法」）は、本発明の医薬品、およびこれらの治療薬の共作用から有益な効果を提供することを意図している特定の処置レジメンの一部としての最低1種の第二の剤、すなわち本発明の医薬品および前記第二の剤の投与を包含する。該組合せの有益な効果は、限定されるものでないが、治療薬の組合せから生じる薬物動態若しくは薬力学的共作用を挙げることができる。典型的に組合せでのこれらの治療薬の投与は、規定された時間（通常は選択される組合せに依存して分、時間、日若しくは週）にわ

50

たり実施する。

【0169】

「併用療法」は、本発明の組合せを偶発的にかつ自由裁量によりもたらす別個の単剤療法レジメンの一部としてこれらの治療薬の2種若しくはそれ以上の投与を包含することを意図しうるが、しかし一般にそうではない。「併用療法」は、これらの治療薬の連続的様式（すなわち各治療薬を異なる時間で投与する）での投与、ならびにこれらの治療薬若しくは該治療薬の最低2種の実質的に同時の様式での投与を包含することを意図している。実質的に同時の投与は、例えば、各治療薬の固定された比を有する単一カプセル剤、若しくは該治療薬のそれぞれについて複数の単一カプセル剤で被験体に投与することにより達成し得る。

10

【0170】

各治療薬の連続的若しくは実質的に同時の投与は、限定されるものでないが、局所経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、および粘膜組織を通る直接吸収を挙げることができるいずれかの適切な経路により遂げることができる。治療薬は同一経路若しくは異なる経路により投与し得る。例えば、選択される組合せの第一の治療薬を注入により投与することができる一方、組合せの他の治療薬を局所投与し得る。

【0171】

あるいは、例えば、全部の治療薬を局所で投与しうるか、若しくは全部の治療薬を注入により投与しうる。治療薬を投与する順序は別の方法で示されない限り厳密に決定的に重要でない。「併用療法」はまた、上述されたところの治療薬の他の生物学的有効成分とのさらなる組合せでの投与も包含し得る。併用療法が薬物以外の処置をさらに含んでなる場合、該薬物以外の処置は、該治療薬および薬物以外の処置の組合せの共作用からの有益な効果が達成される限りは、いかなる適する時点でも実施しうる。例えば、適切な場合には、有益な効果は、薬物以外の処置がおそらく数日若しくはなお数週間だけ治療薬の投与から一時的に除去される場合になお達成される。

20

【0172】

上の一般的用語で概説されたとおり、本発明の医薬品は、原則として当業者に既知のいかなる形態でも投与し得る。好ましい一投与経路は全身投与、より好ましくは非経口投与により、好ましくは注入による。あるいは、該医薬品は局所投与しうる。他の投与経路は、筋肉内、腹腔内および皮下、経口、鼻内、気管内若しくは肺を含んでなり、有効性を確保しつつ最も少なく侵襲性である投与経路が好ましい。

30

【0173】

非経口投与は、一般に、皮下、筋肉内若しくは静脈内注入（*injection*）および注入（*infusion*）に使用する。加えて、非経口投与のための1アプローチは、当業者に公知である、一定水準の投薬量が維持されることを保証する徐放（*slow-release*）すなわち徐放（*sustained-release*）系の埋植を使用する。

【0174】

さらに、本発明の好ましい医薬品は、適する鼻内ベヒクル、吸入剤の局所使用を介して鼻内の形態で、若しくは、当業者に公知の経皮皮膚貼付剤の形態を使用する経皮経路を介して投与し得る。経皮送達系の形態で投与されるためには、投薬量の投与はもちろん、投薬レジメンを通じて間欠的であるよりはむしろ連続的であることができる。他の好ましい局所製剤は、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、エアゾルスプレー剤およびゲル剤を包含し、ここで有効成分の濃度は典型的には0.01%から15%（*w/w*若しくは*w/v*）までの範囲にわたることができる。

40

【0175】

本発明の医薬品は、一般に、限定されるものでないが、製薬学的に許容できる媒体に溶解若しくは分散された本発明の核酸分子を挙げることができる治療の有効成分（1種若しくは複数）の有効量を含むことができる。製薬学的に許容できる媒体若しくは担体は、いずれかのおよび全部の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤なら

50

びに吸収遅延剤などを包含する。製薬学的有効成分のためのこうした媒体および剤の使用は当該技術分野で公知である。補助的有効成分もまた本発明の医薬品に組み込み得る。

【0176】

さらなる一アスペクトにおいて、本発明は製薬学的組成物に関する。こうした製薬学的組成物は、本発明の核酸の最低1種および好ましくは製薬学的に許容できるベヒクルを含んでなる。こうしたベヒクルは、当該技術分野で使用されるかつ／若しくは既知のいかなるベヒクル若しくはいかなる結合剤でもあり得る。より具体的には、こうした結合剤若しくはベヒクルは、本明細書に開示される医薬品の製造に関して論考されたところのいずれかの結合剤若しくはベヒクルである。さらなる一態様において、製薬学的組成物はさらなる製薬学的有効成分を含んでなる。

10

【0177】

医薬品および製薬学的組成物の製造法は、本開示に照らして当業者に既知であろう。典型的には、こうした組成物は、液体溶液若しくは懸濁液いずれかとしての注射剤として；注入の前の液体中の溶液若しくは懸濁液に適する固体形態物；経口投与のための錠剤若しくは他の固形物として；持続放出カプセル剤として；または点眼薬、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、吸入剤などを包含する現在使用されるいずれかの他の形態で製造しうる。手術野の特定領域を処置するために外科医、内科医若しくは医療従事者による生理的食塩水に基づく洗浄液のような無菌製剤の使用もまたとりわけ有用でありうる。組成物は微小装置、微小粒子若しくはスポンジを介してもまた送達しうる。

20

【0178】

処方に際して、医薬品は投薬処方と適合性の様式で、および薬理学的に有効であるような量で投与することができる。製剤は、上述された注入可能な溶液の型のような多様な投薬形態物で容易に投与されるが、しかし、薬物放出カプセルなどもまた使用し得る。

【0179】

本情況において、投与されるべき有効成分の量および組成物の容量は処置される個体若しくは被験体に依存する。投与に必要とされる有効成分の特定の量は実務者の判断に基づき、そして各個体に特有である。

【0180】

有効成分を分散させるのに必要とされる医薬品の最少量を典型的に利用する。適する投与レジメンは変動可能でもまたあるが、しかし、最初に該化合物を投与すること、および結果をモニターすること、ならびにその後さらなる制御された用量をさらなる間隔で与えることにより、類型化されるとみられる。

30

【0181】

例えば、錠剤若しくはカプセル剤（例えばゼラチンカプセル剤）の形態での経口投与のため、有効成分すなわち本発明の核酸分子および／若しくはいずれかのさらなる製薬学的有効成分（本明細書で治療薬（1種若しくは複数）または有効成分（1種若しくは複数）ともまた称される）を、エタノール、グリセロール、水などのような経口の非毒性の製薬学的に許容できる不活性担体と組み合わせ得る。さらに、所望の若しくは必要な場合は、適する結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤もまた混合物に組み込み得る。適する結合剤は、デンプン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび／若しくはポリビニルピロリドン、ブドウ糖若しくは乳糖のような天然の糖、トウモロコシ甘味料、アカシアゴム、トラガカントガム若しくはアルギン酸ナトリウムのような天然および合成のガム、ポリエチレングリコール、蠟などを包含する。これらの投薬形態物で使用される滑沢剤は、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、シリカ、タルク、ステアリン酸、そのマグネシウム若しくはカルシウム塩および／またはポリエチレングリコールなどを包含する。崩壊剤は、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガムデンプン、寒天、アルギン酸若しくはそのナトリウム塩、または発泡混合物などを制限なしに包含する。希釈剤は、例えば乳糖、デキストロース、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、

40

50

セルロースおよび／若しくはグリシンを包含する。

【0182】

本発明の医薬品はまた、徐放 (timed release) および徐放 (sustained release) の錠剤若しくはカプセル剤、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投薬形態物でも投与し得る。坐剤は脂肪乳剤若しくは懸濁剤から有利に製造する。

【0183】

製薬学的組成物若しくは医薬品は滅菌することができ、かつ／または保存剤、安定剤、湿潤剤若しくは乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を調節するための塩および／若しくは緩衝剤のような補助物質を含有しうる。加えてそれらは他の治療上貴重な物質もまた含有しうる。該組成物は、慣習的混合、造粒若しくはコーティング法に従って製造され、そして典型的には約 0.1% ないし 75%、好ましくは約 1% ないし 50% の有効成分を含有する。

10

【0184】

液体、とりわけ注入可能な組成物は、例えば、溶解すること、分散することなどにより製造し得る。有効成分は、例えば水、生理的食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどのような製薬学的に純粋な溶媒に溶解若しくはそれらと混合して、それにより注入可能な溶液若しくは懸濁液を形成する。加えて、注入前に液体に溶解するのに適する固体の形態物を処方し得る。

【0185】

固体組成物については、賦形剤は製薬学的等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、ブドウ糖、ショ糖、炭酸マグネシウムなどを包含する。上で定義された有効成分は、担体として例えばポリアルキレングリコール、例えばプロピレングリコールを使用して、坐剤としてもまた処方しうる。いくつかの態様において、坐剤は有利には脂肪乳剤若しくは懸濁剤から製造する。

20

【0186】

本発明のそれぞれ医薬品および核酸分子は、小型単層小胞、大型単層小胞および多層小胞のようなリポソーム送達系の形態でもまた投与し得る。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミン若しくはホスファチジルコリンを含有する多様なリン脂質から形成し得る。いくつかの態様において、脂質成分の薄膜を薬物の水性溶液で水和させて、薬物を被包化する脂質層（当業者に公知であるもの）を形成する。例えば、本明細書に記述される核酸分子を、当該技術分野で既知の方法を使用して構築される親油性化合物若しくは非免疫原性の高分子量化合物との複合体として提供し得る。加えて、リポソームは細胞殺傷を標的としかつそれを内的に媒介するための細胞傷害剤を保有するために、それらの表面上にこうした核酸分子を有しうる。核酸と会合した複合体の一例が米国特許第 6,011,020 号明細書に提供されている。

30

【0187】

本発明のそれぞれ医薬品および核酸分子は、標的を定めることができる薬物担体としての可溶性ポリマーともまた結合しうる。こうしたポリマーは、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、若しくはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンを包含し得る。さらに、本発明のそれぞれ医薬品および核酸分子は、薬物の放出制御を達成することにおいて有用な一分類の生物分解性ポリマー、例えばポリ乳酸、ポリ-ε-カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびヒドロゲルの架橋若しくは両親媒性ブロックコポリマーに結合しうる。

40

【0188】

所望の場合は、投与されるべきそれぞれ製薬学的組成物および医薬品は、少量の、湿潤若しくは乳化剤、pH 緩衝剤、ならびに例えば酢酸ナトリウムおよびオレイン酸トリエタノールアミンのような他の物質のような非毒性の補助物質もまた含有しうる。

50

【 0 1 8 9 】

本発明のそれぞれ核酸分子および医薬品を利用する投薬レジメンは、患者の種類、種、年齢、重量、性および医学的状态；処置されるべき状態の重症度；投与経路；患者の腎および肝機能；ならびに使用される特定のアプトマー若しくはその塩を包含する多様な因子に従って選択する。通常熟練した医師若しくは獣医師は、該状態の進行を予防する、打ち消す若しくは停止するのに必要とされる薬物の有効量を容易に決定かつ処方し得る。

【 0 1 9 0 】

本発明の核酸の有効血漿濃度は、好ましくは、本明細書に開示される疾患のいずれかの処置において 5 0 0 f M から 5 0 0 μ M までの範囲にわたる。

【 0 1 9 1 】

本発明のそれぞれ核酸分子および医薬品は、好ましくは単一の連日用量、2 若しくは 3 日毎、週 1 回、2 週毎、単一の月 1 回の用量、または 3 か月毎で投与しうる。

【 0 1 9 2 】

本明細書に記述されるところの医薬品が本明細書に開示される製薬学的組成物を構成することは本発明内にある。

【 0 1 9 3 】

さらなる一アスペクトにおいて、本発明はこうした処置を必要とする被験体の処置方法に関し、該方法は、本発明の核酸の最低 1 種の製薬学的有効量の投与を含んでなる。一態様において、被験体は疾患に罹っているか、若しくはこうした疾患を発症する危険にさらされており、該疾患は本明細書に開示されるもののいずれか、とりわけ、医薬品の製造のための本発明の核酸のいずれかの使用とともに開示される疾患のいずれかである。

【 0 1 9 4 】

本発明の核酸ならびにアンタゴニストが医薬品として若しくは医薬品の製造のためのみならず、しかしまた化粧の目的上、とりわけ炎症を起こした局所皮膚病変における M C P - 1 の関与に関しても使用し得ることが理解されるべきである。従って、その処置若しくは予防のために本発明の核酸、医薬品および / 若しくは製薬学的組成物を使用し得るさらなる状態若しくは疾患は、炎症を起こした局所皮膚病変である。

【 0 1 9 5 】

本明細書で好ましく使用されるところの診断薬若しくは診断剤若しくは診断手段は、M C P - 1、好ましくは本明細書に記述されるところの M C P - 1、およびより好ましくは本明細書に記述される多様な障害および疾患に関して本明細書に記述されるところの M C P - 1 を直接若しくは間接的にのいずれかで検出するのに適する。しかしながら、本発明の核酸分子が M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 およびエオタキシンのいずれか、数種若しくは全部にもまた結合している程度まで、こうした核酸分子はそれぞれ疾患および障害の診断にもまた使用し得、該発病機序は、M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 および / 若しくはエオタキシンを伴う過剰発現若しくは活性亢進と直接若しくは間接的にのいずれかで結び付けられるか若しくは関連付けられる。該診断薬は、本明細書に記述されるそれぞれ障害および疾患のいずれかの検出および / 若しくは経過観察に適する。こうした検出は、M C P - 1 への本発明の核酸の結合により可能である。こうした結合は、直接若しくは間接的にのいずれでも検出し得る。それぞれの方法および手段は当業者に既知である。とりわけ、本発明の核酸は、本発明の核酸、好ましくは M C P - 1 に結合する核酸の検出を可能にする標識を含みうる。こうした標識は、好ましくは放射活性、酵素および蛍光標識を含んでなる群から選択される。原則として、抗体のため開発された全部の既知のアッセイを本発明の核酸に採用し得る一方、標的に結合する抗体が標的に結合する核酸に置換される。未標識の標的に結合する抗体を使用する抗体アッセイにおいて、検出は、好ましくは、放射活性、酵素および蛍光標識で修飾されかつ標的に結合する抗体にその F c フラグメントで結合する二次抗体によりなされる。核酸、好ましくは本発明の核酸の場合、該核酸はこうした標識で修飾され、好ましくはこうした標識は、ビオチン、C y - 3 および C y - 5 を含んでなる群から選択され、また、こうした標識は、こうした標識に向けられた抗体、例えば抗ビオチン抗体、抗 C y 3 抗体若しくは抗 C y 5 抗体により検出される

10

20

30

40

50

か、または、標識がビオチンである場合、標識はビオチンに天然に結合するストレプトアビジン若しくはアビジンにより検出される。こうした抗体、ストレプトアビジン若しくはアビジンは、順に、好ましくはそれぞれの標識、例えば放射活性、酵素若しくは蛍光標識で（二次抗体のように）修飾される。

【 0 1 9 6 】

さらなる一態様において、本発明の核酸分子は第二の検出手段により検出若しくは分析され、前記検出手段は分子ビーコンである。分子ビーコンの方法論は当業者に既知である。簡潔には、分子ビーコンともまた称される核酸プローブは、検出されるべき核酸サンプルに対する逆相補配列であり、そして、これのため、検出されるべき核酸サンプルの一部にハイブリダイズする。核酸サンプルへの結合に際して、分子ビーコンのフルオロフォア基が分離され、それが蛍光シグナルの変化、好ましくは強度の変化をもたらす。この変化は存在する核酸サンプルの量と相関する。

【 0 1 9 7 】

本発明の核酸を使用する M C P - 1 の検出は、とりわけ、本明細書で定義されるところの M C P - 1 の検出を可能にすることができると認められるであろう。

【 0 1 9 8 】

M C P - 1 の検出に関して、好ましい一方法は以下の段階を含んでなる：

- (a) M C P - 1 の存在について試験されるべきであるサンプルを提供する段階、
- (b) 本発明の核酸を提供する段階、
- (c) 好ましくは反応容器中でサンプルを核酸と反応させる段階

これに際して、段階 (a) は段階 (b) の前に実施し得るか、若しくは段階 (b) は段階 (a) の前に実施し得る。

【 0 1 9 9 】

好ましい一態様において、サンプルの核酸との反応の検出に存するさらなる一段階 d) が提供される。好ましくは、段階 b) の核酸は表面に固定される。該表面は反応チューブのような反応容器の表面、プレートの壁、若しくは例えばビーズのようなこうした反応容器に含有される装置の表面でありうる。核酸の表面への固定は、限定されるものでないが非共有若しくは共有結合を挙げることができる当業者に既知のいずれの手段によっても行い得る。好ましくは、該結合は表面と核酸の間の共有化学結合を介して確立される。しかしながら、核酸が間接的に表面に固定され、こうした間接的固定がさらなる成分若しくは一対の相互作用パートナーの使用を伴うこともまた本発明内にある。こうしたさらなる成分は、好ましくは、相互作用パートナーともまた称される固定されるべき核酸と特異的に相互作用しかつ従って表面への核酸の結合を媒介する化合物である。相互作用パートナーは、好ましくは核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含んでなる群から選択される。好ましくは、相互作用パートナーは抗体、より好ましくはモノクローナル抗体である。あるいは、相互作用パートナーは核酸、好ましくは機能的核酸である。より好ましくは、こうした機能的核酸は、アプトマー、シュビーゲルマー、および該核酸に少なくとも部分的に相補的である核酸を含んでなる群から選択される。さらなる代替の一態様において、表面への核酸の結合は多分割の相互作用パートナーにより媒介される。こうした多分割の相互作用パートナーは、好ましくは一対の相互作用パートナー、若しくは第一のメンバーおよび第二のメンバーよりなる相互作用パートナーであり、第一のメンバーは該核酸により含まれるか若しくはそれに結合され、そして第二のメンバーは表面に結合されるか若しくはそれにより含まれる。多分割の相互作用パートナーは、好ましくは、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびストレプトアビジン、ならびにビオチンおよびニュートラビジンを含んでなる相互作用パートナーの対の群から選択される。好ましくは、相互作用パートナーの対の第一のメンバーはビオチンである。

【 0 2 0 0 】

こうした方法の好ましい一結果は、M C P - 1 および核酸の固定された複合体の形成であり、より好ましくは前記複合体が検出される。該複合体から M C P - 1 が検出されることが一態様内にある。

【 0 2 0 1 】

本要件に適合するそれぞれの検出手段は、例えば M C P - 1 のその / それらの部分 (1 個若しくは複数) に特異的であるいずれかの検出手段である。とりわけ好ましい一検出手段は、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含んでなる群から選択される検出手段であり、その生成は当業者に既知である。

【 0 2 0 2 】

M C P - 1 の検出方法は、段階 c) を実施するのに好ましく使用される反応容器からサンプルが取り出されることもまた含んでなる。

【 0 2 0 3 】

該方法は、さらなる一態様において、M C P - 1 の相互作用パートナーを表面、好ましくは上で定義されたところの表面に固定する段階もまた含んでなり、該相互作用パートナーは、本明細書のとおり、かつ、好ましくはそれぞれの方法に関して上のとおり定義され、ならびにより好ましくはそれらの多様な態様において核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含んでなる。本態様において、とりわけ好ましい一検出手段は本発明の核酸であり、こうした核酸は好ましくは標識若しくは未標識でありうる。こうした核酸が標識される場合、それは直接若しくは間接的に検出され得る。こうした検出は、好ましくは、核酸、ポリペプチド、タンパク質、および本明細書に記述される多様な態様における態様を含んでなる群から選択もまたされる第二の検出手段の使用もまた伴いうる。こうした検出手段は好ましくは本発明の核酸に特異的である。より好ましい一態様において、第二の検出手段は分子ビーコンである。核酸若しくは第二の検出手段のいずれかまたは双方は、好ましい一態様において検出標識を含みうる。検出標識は、好ましくはビオチン、プロモデスオキシウリジン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識、UV 標識、放射標識およびキレート剤分子を含んでなる群から選択される。あるいは、第二の検出手段は、好ましくは該核酸により含有されるか、それにより含まれるか、若しくはそれに結合される検出標識と相互作用する。とりわけ好ましい組合せは後に続くとおりである：

検出標識がビオチンであり、そして第二の検出手段がビオチンに向けられた抗体であるか、または

検出標識がビオチンであり、そして第二の検出手段がアビジン若しくはアビジンを保有する分子であるか、または

検出標識がビオチンであり、そして第二の検出手段がストレプトアビジン若しくはストレプトアビジンを保有する分子であるか、または

検出標識がビオチンであり、そして第二の検出手段がニュートラビジン若しくはニュートラビジンを保有する分子であるか、または

検出標識がプロモデスオキシウリジンであり、そして第二の検出手段がプロモデスオキシウリジンに向けられた抗体であるか、または

検出標識がジゴキシゲニンであり、そして第二の検出手段がジゴキシゲニンに向けられた抗体であるか、または

検出標識がキレート剤であり、そして第二の検出手段が放射核種であり、前記検出標識が核酸に結合されていることが好ましい。この種の組合せは、核酸が表面に結合されている態様にもまた応用可能であることが認められるべきである。こうした態様において、検出標識が相互作用パートナーに結合されていることが好ましい。

【 0 2 0 4 】

最後に、第二の検出手段が第三の検出手段を使用して検出されることもまた本発明内にあり、好ましくは、第三の検出手段は、より好ましくは第二の検出手段の検出に際して酵素反応を示す酵素であるか、若しくは、第三の検出手段は放射線、より好ましくは放射核種により放射される放射線を検出するための手段である。好ましくは、第三の検出手段は、第二の検出手段を特異的に検出かつ / 若しくはそれと相互作用している。

【 0 2 0 5 】

また、M C P - 1 の相互作用パートナーが表面上に固定されかつ本発明の核酸が好ましくは相互作用パートナーと M C P - 1 の間で形成される複合体に添加される態様において

10

20

30

40

50

、サンプルを、反応、より好ましくは段階 c) および / 若しくは d) を実施する反応容器から取り出し得る。

【 0 2 0 6 】

一態様において、本発明の核酸は蛍光部分を含んでなり、そして該蛍光部分の蛍光は、複合体形成に際して、核酸および M C P - 1 と遊離 M C P - 1 の間で異なる。

【 0 2 0 7 】

さらなる一態様において、該核酸は本発明の核酸の誘導体であり、該核酸の該誘導体はアデノシンを置き換えるアデノシンの最低 1 個の蛍光誘導体を含んでなる。好ましい一態様において、アデノシンの蛍光誘導体はエテノアデノシンである。

【 0 2 0 8 】

さらなる一態様において、本発明の核酸の誘導体および M C P - 1 よりなる複合体は、蛍光を使用して検出される。

【 0 2 0 9 】

該方法の一態様において、シグナルは段階 (c) 若しくは段階 (d) で創製され、そして、好ましくは、該シグナルはサンプル中の M C P - 1 の濃度と相関する。

【 0 2 1 0 】

好ましい一アスペクトにおいて、アッセイは 9 6 ウェルプレートで実施することができ、ここで成分は上述されたとおり反応容器に固定され、そしてウェルが反応容器として作用する。

【 0 2 1 1 】

上で言われたことは、少なくとも、本発明の核酸が M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 および / 若しくはエオタキシンに若しくはそれらともまた結合している程度まで、M C P - 2、M C P - 3、M C P - 4 および / 若しくはエオタキシンにもまた当てはまるものが、当業者により認められるであろう。

【 0 2 1 2 】

発明の核酸はドラッグデザインのための出発原料としてさらに使用しうる。基本的に 2 つの可能なアプローチが存在する。1 アプローチは化合物ライブラリーのスクリーニングである一方、こうした化合物ライブラリーは好ましくは低分子量化合物ライブラリーである。一態様において、スクリーニングはハイスループットスクリーニングである。好ましくは、ハイスループットスクリーニングは、標的に基づくアッセイにおける化合物の迅速で効率的な試行錯誤評価である。最良の場合、分析は比色測定により実施される。それとともに使用されるところのライブラリーは当業者に既知である。

【 0 2 1 3 】

あるいは、本発明の核酸は薬物の合理的設計に使用しうる。好ましくは、合理的ドラッグデザインは製薬学的リード構造の設計である。X 線結晶学若しくは核磁気共鳴分光法のような方法により典型的に同定される標的の三次元構造から出発して、コンピュータプログラムを使用して多くの異なる化合物の構造を含有するデータベース全体を検索する。該選択はコンピュータによりなされ、同定された化合物をその後実験室で試験し得る。

【 0 2 1 4 】

薬物の合理的設計は本発明の核酸のいずれからも開始することができ、そして発明の核酸の構造に類似、若しくは発明の核酸の構造の結合を媒介する部分に同一である構造、好ましくは三次元構造を必要とする。いかなる場合も、こうした構造は発明の核酸と同一若しくは類似の結合の特徴をなお示す。薬物の合理的設計のさらなる一段階において若しくは代替の一段階としてのいずれかで、神経伝達物質に結合する核酸のそれらの部分の好ましくは三次元の構造が、ヌクレオチドおよび核酸と異なる化学基により模倣される。この模倣により、核酸と異なる化合物を設計し得る。こうした化合物は好ましくは小分子若しくはペプチドである。

【 0 2 1 5 】

当業者に既知である競合アッセイを使用することによるような化合物ライブラリーのスクリーニングの場合、適切な M C P - 1 アナログ、M C P - 1 アゴニスト若しくは M C P

10

20

30

40

50

- 1 アンタゴニストを見出しうる。こうした競合アッセイは後に続くとおり設定しうる。標的に結合する L - 核酸である発明の核酸、好ましくはシュピーゲルマーを固相に結合する。MCP - 1 アナログを同定するため、標識 MCP - 1 をアッセイに添加しうる。潜在的なアナログが、それぞれの標識により得られるシグナルの減少と一緒に進むとみられるシュピーゲルマーへの MCP - 1 分子の結合と競合するとみられる。アゴニスト若しくはアンタゴニストのスクリーニングは、当業者に既知のところの細胞培養物アッセイの使用を必要としうる。

【0216】

本発明のキットは、発明の核酸の最低 1 若しくは数種を含みうる。加えて、該キットは最低 1 若しくは数種の陽性若しくは陰性対照を含みうる。陽性対照は、例えば MCP - 1、とりわけそれに対して発明の核酸が選択されるか若しくはそれが好ましくは液体の形態で結合するものでありうる。陰性対照は、例えば、MCP - 1 に類似の生物物理特性に関して定義されるがしかし発明の核酸により認識されないペプチドでありうる。さらに、前記キットは 1 若しくは数種の緩衝剤を含みうる。多様な成分を乾燥若しくは凍結乾燥した形態でまたは溶液に溶解してキットに含有しうる。該キットは、順に該キットの 1 若しくは数種の成分を含有しうる 1 若しくは数個の容器を含みうる。さらなる一態様において、該キットは該キットおよびその多様な成分をどのように使用するかに関する情報を使用者に提供する説明書若しくは説明書リーフレットを含んでなる。

【0217】

本発明の核酸の製薬学および生物分析的測定は、基本的に、ヒトおよびヒト以外の身体の数種の体液、組織および器官におけるその薬物動態および生物動力学的 (biodynamic) プロファイルの評価のためである。こうした目的上、本明細書に開示される若しくは当業者に既知の検出方法のいずれかを使用しうる。本発明のさらなる一アスペクトにおいて、本発明の核酸の検出のためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイが提供される。該検出アッセイ内で捕捉プローブおよび検出プローブを使用する。捕捉プローブは本発明の核酸の第一の部分に、および検出プローブは第二の部分に相補的である。双方すなわち捕捉および検出プローブは、DNA ヌクレオチド、修飾 DNA ヌクレオチド、修飾 RNA ヌクレオチド、RNA ヌクレオチド、LNA ヌクレオチドおよび / 若しくは PNA ヌクレオチドにより形成し得る。

【0218】

これゆえに、捕捉プローブは本発明の核酸の 5' 端に相補的な配列伸長を含んでなり、また、検出プローブは本発明の核酸の 3' 端に相補的な配列伸長を含んでなる。この場合、捕捉プローブはその 5' 端を介して表面若しくはマトリックスに固定され、それにより、捕捉プローブはその 5' 端で直接、またはその 5' 端と表面若しくはマトリックスの間のリンカーを介して固定し得る。しかしながら、原則としてリンカーは捕捉プローブの各ヌクレオチドに連結し得る。リンカーは、当業者の親水性リンカー、または D - DNA ヌクレオチド、修飾 D - DNA ヌクレオチド、D - RNA ヌクレオチド、修飾 D - RNA ヌクレオチド、D - LNA ヌクレオチド、PNA ヌクレオチド、L - RNA ヌクレオチド、L - DNA ヌクレオチド、修飾 L - RNA ヌクレオチド、修飾 L - DNA ヌクレオチドおよび / 若しくは L - LNA ヌクレオチドにより形成し得る。

【0219】

あるいは、捕捉プローブは本発明の核酸の 3' 端に相補的な配列伸長を含んでなり、また、検出プローブは本発明の核酸の 5' 端に相補的な配列伸長を含んでなる。この場合、捕捉プローブがその 3' 端を介して表面若しくはマトリックスに固定され、それにより、捕捉プローブはその 3' 端で直接、またはその 3' 端と表面若しくはマトリックスの間のリンカーを介して固定し得る。しかしながら、原則としてリンカーは本発明の核酸に相補的である配列伸長の各ヌクレオチドに連結し得る。リンカーは、当業者の親水性リンカー、または D - DNA ヌクレオチド、修飾 D - DNA ヌクレオチド、D - RNA ヌクレオチド、修飾 D - RNA ヌクレオチド、D - LNA ヌクレオチド、PNA ヌクレオチド、L - RNA ヌクレオチド、L - DNA ヌクレオチド、修飾 L - RNA ヌクレオチド、修飾 L -

DNAヌクレオチドおよび/若しくはL-LNAヌクレオチドにより形成し得る。

【0220】

本発明の核酸にハイブリダイズしうる捕捉および検出プローブのヌクレオチドの数は変動可能であり、そして捕捉および/若しくは検出プローブならびに/または本発明の核酸それ自身のヌクレオチドの数から依存し得る。本発明の核酸にハイブリダイズしうる捕捉および検出プローブのヌクレオチドの総数は、本発明の核酸により含まれるヌクレオチドの最大数であるべきである。検出および捕捉プローブのヌクレオチドの最少数(2ないし10ヌクレオチド)が、本発明の核酸のそれぞれ5'端若しくは3'端へのハイブリダイゼーションを可能にするはずである。本発明の核酸と、分析されるサンプル中に存在する他の核酸の間の高い特異性および選択性を実現するために、捕捉および検出プローブのヌクレオチドの総数は、本発明の核酸により含まれるヌクレオチド若しくはその最大数であるべきである。

10

【0221】

さらに、検出プローブは、好ましくは本明細書に前述されたところの検出され得るマーカ分子若しくは標識を保有する。該標識若しくはマーカ分子は、原則として検出プローブの各ヌクレオチドに連結し得る。好ましくは、標識若しくはマーカは検出プローブの5'端若しくは3'端に配置され、それにより本発明の核酸に相補的である検出プローブ内のヌクレオチドとラベルの間にリンカーを挿入し得る。リンカーは、当業者の親水性リンカー、またはD-DNAヌクレオチド、修飾D-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、修飾D-RNAヌクレオチド、D-LNAヌクレオチド、PNAヌクレオチド、L-RNAヌクレオチド、L-DNAヌクレオチド、修飾L-RNAヌクレオチド、修飾L-DNAヌクレオチドおよび/若しくはL-LNAヌクレオチドにより形成し得る。

20

【0222】

本発明の核酸の検出は後に続くとおり実施し得る。すなわち、本発明の核酸は、捕捉プローブにその端の一方で、および検出プローブに他端でハイブリダイズする。その後、未結合の検出プローブを例えば1若しくは数回の洗浄段階により除去する。好ましくは標識若しくはマーカ分子を保有する結合した検出プローブの量をその後測定し得る。

【0223】

好ましく本明細書で使用されるところの処置という用語は、好ましい一態様において、加えて若しくはあるいは予防および/若しくは経過観察を含んでなる。

30

【0224】

好ましく本明細書で使用されるところの疾患および障害という用語は、それとは反対に示されない場合は互換性の意味で使用する。

【0225】

本明細書で使用されるところの含んでなるという用語は、好ましくはこうした用語により続けられる若しくは記述される主題を制限することを意図していない。しかしながら、代替の一態様において、含んでなるという用語は含有することという意味で、そして従ってこうした用語により続けられる若しくは記述される主題を制限するとして理解されるべきである。

40

【0226】

本明細書で使用されるところの多様な配列番号、本発明の核酸分子の化学的性質、および標的分子MCP-1、それらの実際の配列ならびに内的参照番号を以下の表に要約する。

【0227】

【表 2】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
1	L-タンパク質	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTI VAKEICADPKQKW QDSMDHLDKQQTPTKT	ヒト MCP-1, huMCP-1 CCL2
2	L-タンパク質	QPDAVNAPLTCCYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPCKEAVFVTKLKREVCADPKKEW QTYIKNLDNRQMRSEPTTLFKTASALRSSAPLNVLKTRKSEANASTTSTTSSTSVGVT SVTVN	マウス MCP-1, mCCL2, mMCP-1, マウス MCP-1 (Mus musculus)
3	L-タンパク質	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTI VAKEICADPKQKW QDSMDHLDKQIQTPKP	サル MCP-1 (Macaca mulatta)
4	L-タンパク質	QPDAINSPVTCCTLTSTSKISMQRMSYRRVTSSKCPKEAVIFKTIAGKEICAEPPKQKW QDSISHLDKKNQTPKP	ブタ MCP-1 (Sus scrofa)
5	L-タンパク質	QPDALISPVTCCTLTSTSKISMQRMSYRRVTSSKCPKEAVIFKTVLNKEICADPKQKW QDSMAHLDKKSQTQTA	イヌ MCP-1 (Canis familiaris)
6	L-タンパク質	QPDAVNSPVTCCTTFTNKTISVKRRLMSYRRINSTKCPKEAVIFMTKLAKGICADPKQKW QDAIANLDKKMQTPKTLTSYSTTQEHNTNLSSTRTPSTTSL	ウサギ MCP-1 (Oryctolagus cuniculus)
7	L-タンパク質	QPVGINSTTCCYRFINKKIPKQRLSYRRITSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKW QDFMKHLDKKTQTPKL	ヒト MCP-3, CCL7, huMCP-3
8	L-タンパク質	GPASVPTTCCFNLANRKIPQLRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKDICADPKKKWQD SMKYLDQKSPTPKP	ヒト エオタキシン/CCL11
9	L-タンパク質	QPDVSVIPITCCFNVINRKIPQIRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKERWV RDSMKHLDQIFQNLKP	ヒト MCP-2, CCL8, huMCP-2
10	L-RNA	AGCGUGCCCGAGUGGACGGGGACGGACCCUGCAAUAAUGCACGCU	169-B1trc
11	L-RNA	AGCGUGCCCGAGUGGACGGGGACGGACCCUGCAAUUGCACGCU	169-F3trc
12	L-RNA	AGCGUGCCCGAGUGGACGGGGACGGACCCUGUAAUAAUGCACGCU	169-C1trc
13	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGACGGGGACGGACCCUGCAAUAAUGCGCGCU	169-A3trc
14	L-RNA	AGCGUGCCCGAGUAGCAGGGGGGCGGACCCUGCAAUAAUGCACGCU	169-B2trc
15	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGAGAGGGGGGCGGGAUCUACAAUUGCACGCU	176-B12trc
16	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGACAGGGGGGCGGACCCUGCAUUUGCACGCU	176-D9trc

【表 3】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
17	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCAAGGGGGCGGACCUGUAUUUGCAGCGU	176-B10trc
18	L-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCAAGGGGGCGGACCUGCAAAUUGCAGCGU	169-F2trc
19	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCAAGGGGGCGGACCUGCAAUUGCAGCGU	176-B9trc
20	L-RNA	AGCAUGCCCGGUGUGGCAAGGGGGCGGACCUGCAUUUGCAUGCU	176-H9trc
21	L-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUAAGGGGGCGGACCUAUAUUUGCAGCGU	176-E10trc
22	L-RNA	AGUGUGCCAGCUGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACACACU	176-G9trc
23	L-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACACACU	176-F9trc
24	L-RNA	AGUGUGCGAGCGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACAUACU	176-C11trc
25	L-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACAUACU	176-E11trc
26	L-RNA	AGUAUGCCAGCGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACAUACU	176-D10trc
27	L-RNA	AGUGUGCCAGUGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACACACU	176-H10trc
28	L-RNA	AGCGUGCCAGUGUGAUGGGGGCGGACCCCAUUUACACGCU	176-C9trc
29	L-RNA	ACGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCGU	180-B1-001
30	L-RNA	ACGCACCUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCGC	180-A4-002
31	L-RNA	ACGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCGU	180-D1-002
32	L-RNA	GCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCGU	180-D1-011
33	L-RNA	ACGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGC	180-D1-012
34	L-RNA	GCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGC	180-D1-018
35	L-RNA	CGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCGU	180-D1-034
36	L-RNA	CGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCCGGCUCUGCG	180-D1-035

【表 4】

37	L-RNA	GCACGUCCUCCACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUCUCGCG	180-D1-036 = NOX-E3
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
38	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCGAAUGCUGGCAGCAC	178-A8
39	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCUAAUGCUGGCAGCAC	178-F7
40	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCGAAUGCUGGCAGCAC	178-G7
41	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACUGCCAGUGGGUCAGAGCUAGCAGCAC	178-C6
42	L-RNA	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCCUAAAGACAGGCCAGCCGGCAGCAC	178-E7
43	L-RNA	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCCUAAAGACAGGCCAGCCGGCAGCAC	178-G6
44	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUGACAGCCUAAUGCUGGCAGCAC	178-A7
45	L-RNA	GUGCUGCGGAGUAAAAACUCCCUAAAGACAGGCCUAGAGCCGGCAGCAC	178-C7
46	L-RNA	GUGCUGCGGCGUGAAAAACGCCUCUGCGACUGCCCCUUUUGCAGGCAGCAC	178-E5
47	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-F1
48	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAACUACCUUGACAGCCGAAUGCUGGCAGCAC	181-B2
49	L-RNA	GUACUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-C2
50	L-RNA	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-A6
51	L-RNA	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACAGCCGACAGCCGGCAGCAC	178-D6
52	L-RNA	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-D5
53	L-RNA	GUGCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-A2
54	L-RNA	GGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCC	178-D5-020
55	L-RNA	GGCGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCC	178-D5-027
56	L-RNA	GUGCUGCGUAGUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-D5-030

【表 5】

57	L-RNA	GUGCGGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-002
58	L-RNA	GUGCCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-004
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内の参照
59	L-RNA	GUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-005
60	L-RNA	GUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-006
61	L-RNA	UGCGGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-007
62	L-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-008
63	L-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-011
64	L-RNA	GGUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-012
65	L-RNA	UGCGGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGC-CA	181-A2-015
66	L-RNA	GCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGC	181-A2-016
67	L-RNA	GUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCAC	181-A2-017
68	L-RNA	GG-GCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCC	181-A2-018
69	L-RNA	GAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGGCUC	181-A2-019
70	L-RNA	CGGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCG	181-A2-020
71	L-RNA	CCGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCCG	181-A2-021
72	L-RNA	CAGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCUG	181-A2-022
73	L-RNA	CUGCGUAGUGAGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAG	181-A2-023
74	L-RNA	AGCGUGUAGUGAAGUGGGUGGCGAGGUAAAGGACACGCU	184-B8trc
75	L-RNA	AGCGUGUAGCGGUGUGGGUGGUAGGUAAAGGCCACGCU	184-C6trc
76	L-RNA	AGCGUGAUAAGAAGAGCGGGUGGUAGGUAAAGGUCAGGCU	184-H5trc

【表 6】

77	L-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	184-A7trc
78	L-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	187-A5trc
79	L-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	187-H5trc
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内の参照
80	L-RNA	CCGCUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCGG	174-D4-004
81	L-RNA	GCGCGAGCAGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGACUCGCGUC	166-A4-002
82	L-RNA	CGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACG	187-A5trc-001
83	L-RNA	GUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACAC	187-A5trc-002
84	L-RNA	CGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCACG	187-H5trc-002
85	L-RNA	GUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCAC	187-H5trc-003
86	L-RNA	UGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCA	187-H5trc-004
87	L-RNA	GGACGAGUGACAAUGAUUAACCUCCUGACUAAACGUGCGGGCGACAGG	177-B3
88	L-RNA	GGACCUAUCGCUAAGACAAACGCGCAGUCUACGGGACAUCUCCCGGACAGG	177-C1
89	L-RNA	GGACAAUUGUUACCCCGAGAGAGACAAUAGAGACAACCUCCUGAAGACAGG	177-C2
90	L-RNA	GGACGAAAGUGAGAAAUGAUACAACCUCCUGUUGCGGAAUCCGGACAGG	177-E3
91	L-RNA	GGACGUAAAAGACGCUAACCCGAAAGAAUGUCAGGAGGUGAGACCGACAGG	177-D1
92	L-RNA	GGACUAGAAACUACAAUAGCGGCCAGUUGCACCGCGUUUAUCAACGACAGG	177-E1
93	L-RNA	GGACUAGUCAGCCAGUGUGUAUACCGGACGCGGUGUUUUUACUGACAGG	177-A1
94	L-RNA	GGACUGUCCGGAGUGUGAAACUCCCCGAGACCGCCAGAGCGGGGACAGG	177-G3
95	L-RNA	GGACUUCUAUCCAGGUGGGUGGUAGUAUGUAAAGAGAUAGAAGUGACAGG	177-C3
96	L-RNA	GGACGAGCGGAACAAUGAUUAACCUCCUGACGGAAAGAGAUCCGACAGG	177-A2

【表 7】

97	L-RNA	CCUGUGCUACACGCAGUAAGAAGUGAACGUUCAGUAUGUGUCACAGG	170-E4trc
98	L-RNA	CGUGAGCCAGGCACCGAGGGCGUUAACUGGCUGAUUGGACACGACACG	166-D2trc
99	L-RNA	CGUGAACAUUGCAAGCUAAGCGGGGCGUGUUGGUUGCUUGGCCCGCCACG	174-A2trc
100	L-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAACCCACGUA AAAUCAACCUAAUGGGCCGCGACG	174-E2trc
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内の参照
101	L-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAACCCACGUA AAAUCAACCUAAUGGGCCGCGACG	183-G3trc
102	L-RNA	CGUGAACAUUCAAGCUAAGCGGGGCGUGUUGGUUGCUUGGCCCGCCACG	183-B2trc
103	L-RNA	CGUGCCGAGGGCGCGACCGGCUUACUUAAGAGAGGCUUUGGCCACCCACG	166-B2trc
104	L-RNA	CGUGAUAAACAGCCGUCGGUCAAGAAAAACAAGUUCGGGGCGCGACG	166-G3trc
105	L-RNA	CGUGGGUGGCGCACCGAGGGCGAAAAAGCCACCAGUAAGAUAGACCG	166-D1trc
106	L-RNA	CGUGUGAUUCUCCUUGGGGUGAUUAGCUUAGAGACUUCUCCACACG	183-H2trc
107	L-RNA	GCACCUUGCCUAAUACACGUGCCGGCUAGCUAAUACUCGUCGCCG	167-A7trc
108	L-RNA	GCACGACUUGGGCGACCCAGUGAUACUUAAGAGAGCAAGUCGUCGGC	167-C7trc
109	L-RNA	GCGCGCGCUCAGUAAGAAAUUGAAAGUUCAGAAUGUCGUCGCCG	167-B5trc
110	L-RNA	AGUGUGGCGAGGCUAAGGAGAUUUUCCGAGACCCACGCU	184-D7trc
111	L-RNA	AGUGUGGCGAGACUAUGGAUAGACUCCGAGACCCACGCU	184-D6trc
112	L-RNA	AGCGUGAGGCGACCGGGAUUACUUAAGAGAGUCACGCU	184-E5trc
113	L-RNA	AGCGUGAAGGGGACCGCGUUACUUAACAGAGAUUCACGCU	184-G6trc
114	L-RNA	AGCGUGUGAUGUAUGUAGCACCGUAUCAGAGGACACGCU	184-B7trc
115	L-RNA	AGCGUGAGGCGACCGGUGUUUCGUAAGAGAGUCACGCU	184-B6trc
116	L-RNA	5' PEG-GCACGUCUCCUACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUUCGCG	NOX-E36-5' PEG

【表 8】

117	L-RNA	GCAGUCCUCACCGGUGCAAGUGAACCGGUGGUCUGCG-3' PEG	NOX-E36-3' PEG
118	L-RNA	GAGUAGCGGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCCUUUGAUGAACCGGCGCAUUC	188-A3-001
119	L-RNA	GAUGGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCCUUUGAUGAACCGGCGCAUUC	188-A3-004
120	L-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCCUUUGAUGAACCGGCGCAUUC	188-A3-005
121	L-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCCUUUGAUGAACCGGCGCAUUC	188-A3-006
配列番号	RNA/ ペプチド	配列	内的参照
122	L-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCCUUUGAUGAACCGGCGCA	188-A3-007 = mNOX-E
123	L-RNA	GCUGGUUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCACCGC	189-G7-001
124	L-RNA	CUGGUUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCACCGC	189-G7-002
125	L-RNA	UGGUUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCACCGC	189-G7-003
126	L-RNA	GCCGGUUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCACCGC	189-G7-007
127	L-RNA	GCCGGUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCGCGCGC	189-G7-008
128	L-RNA	GCGCGUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCGCGCGC	189-G7-010
129	L-RNA	GGGCUACCGAGGGGGGCGGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUGUCGCGCGC	189-G7-012
130	D-タンパク質	バイオシン- QPDANAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVAKEICADPKQKWV QDSMDHLDKQTQTPKT	バイオニル化 ヒト D-MCP-1
131	D-タンパク質	バイオシン- QPDANAPLTCCYSFTSKMIPMSRLESYKRITSSRCPKEAVFVTKLKREVCADPKKEWV QTYIKNLDNRQMRSEP-Biotin	バイオニル化 マウス D-MCP-1
132	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCGAGGGGGACGCGACCGUCAAUAUAGCAGCGU	169-B1trc
133	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCGAGGGGGACGCGACCGUCAAUAUAGCAGCGU	169-F3trc
134	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCGAGGGGGACGCGACCGUCAAUAUAGCAGCGU	169-C1trc

【表 9】

135	D-RNA	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGACGCGACCCUGCAAUAAUAGCGGCU	169-A3trc
136	D-RNA	AGCGUGCCCCGGAGUAGCAGGGGGCGCGACCCUGCAAUAAUAGCACGCU	169-B2trc
137	D-RNA	AGCGUGCCCCGGUGUGGUAGGGGGCGCGAUCUACAAUUGCACGCU	176-B12trc
138	D-RNA	AGCGUGCCCCGGUGUGACAGGGGGCGCGACCCUGCAUUUGCACGCU	176-D9trc
139	D-RNA	AGCGUGCCCCGGUGUGGCAGGGGGCGCGACCCUGAUUUUGCACGCU	176-B10trc

【表 10】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内の参照
140	D-RNA	AGCGUGCCCGGAGUGGCGAGGGGGGGCGGCGGACCGCAAAUUGCACGCU	169-F2trc
141	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGCGAGGGGGGGCGGCGGACCGCAAUUGCACGCU	176-B9trc
142	D-RNA	AGCAUGCCCGGUGUGGCGAGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUGCAUGCU	176-H9trc
143	D-RNA	AGCGUGCCCGGUGUGGUGAGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUGCACGCU	176-E10trc
144	D-RNA	AGUGUGCCAGCUGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACACACU	176-G9trc
145	D-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACACACU	176-F9trc
146	D-RNA	AGUGUGCGAGCGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACAUACU	176-C11trc
147	D-RNA	AGUGUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACAUACU	176-E11trc
148	D-RNA	AGUAUGCCAGCGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACAUACU	176-D10trc
149	D-RNA	AGUGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACACACU	176-H10trc
150	D-RNA	AGCGUGCCAGUGUGAUGGGGGGGCGGCGGACCGCAUUUUACACGCU	176-C9trc
151	D-RNA	ACGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGGCGCUCUGCGU	180-B1-001
152	D-RNA	ACGCACCUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGGCGCUCUGCGC	180-A4-002
153	D-RNA	ACGCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGGCGCUCUGCGU	180-D1-002
154	D-RNA	GCACGUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGGCGCUCUGCGU	180-D1-011

【表 1 1】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
155	D-RNA	ACGCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCUGGGCUCUCG	180-D1-012
156	D-RNA	GCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCUGGGCUCUCG	180-D1-018
157	D-RNA	CGCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCUGGGCUCUCGU	180-D1-034
158	D-RNA	CGCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCUGGGCUCUCGG	180-D1-035
159	D-RNA	GCACGUCUCCUACCCGGUGCAAGUGAAGCCUGGGCUCUCGG	(D-) 180-D1-036, (D-) NOX-E36
160	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCGAAUGCGCAGCAC	178-A8
161	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCUAAUGCGCAGCAC	178-F7
162	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAAUGACAGCCGAAUGCGCAGCAC	178-G7
163	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAACUACUGCCAGUGGUCAGAGCUAGCAGCAC	178-C6
164	D-RNA	GUGCUGCGAGUUAAAAACUCCUAAAGACAGGCCAGAGCCGGCAGCAC	178-E7
165	D-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAACUCCUAAAGACAGGCCAGAGCCGGCAGCAC	178-G6
166	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGGAAGACUACCUAUGACAGCCUAAUGCGCAGCAC	178-A7
167	D-RNA	GUGCUGCGGAGUUAAAAACUCCUAAAGACAGGCCAGAGCCGGCAGCAC	178-C7
168	D-RNA	GUGCUGCGGCGUAAAAACGCCUUGCGACUGCCCUUUUAGCAGGCAGCAC	178-E5
169	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-F1
170	D-RNA	GUGCUGCGUAGUGAAAAGACUACCUUGUGACAGCCGAAUGCGCAGCAC	181-B2
171	D-RNA	GUACUGCGUAGUUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-C2
172	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-A6
173	D-RNA	GUGCUGCGUAGUUAAAAACUACCGACAGGCCUAGAGCCGGCAGCAC	178-D6

【表 1 2】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
174	D-RNA	GUGCUGGUAGUUAAAAACUACCAGCGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	178-D5
175	D-RNA	GUGCUGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAGCAC	181-A2
176	D-RNA	GGCUGCGUAGUUAAAAACUACCAGCGACUGGCUAGAGCCGGCAGGCC	178-D5-020
177	D-RNA	GGCGGUAGUUAAAAACUACCAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGGCC	178-D5-027
178	D-RNA	GUGCUGGUAGUUAAAAACUACCAGCGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	178-D5-030
179	D-RNA	GUGCUGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	181-A2-002
180	D-RNA	GUGCUGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	181-A2-004
181	D-RNA	GUGCUGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	181-A2-005
182	D-RNA	GUGCUGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	181-A2-006
183	D-RNA	UGCGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCA	181-A2-007
184	D-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAGC	181-A2-008
185	D-RNA	GCUGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCAGC	181-A2-011
186	D-RNA	GGUGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCACC	181-A2-012
187	D-RNA	UGCGGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGC-CA	181-A2-015
188	D-RNA	GCGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCGC	181-A2-016
189	D-RNA	GUGCUGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGGCAC	181-A2-017
190	D-RNA	GG-GCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCCC	181-A2-018
191	D-RNA	GAGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCUC	181-A2-019
192	D-RNA	CGGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGCCG	181-A2-020

【表 13】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
193	D-RNA	CCGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCGG	181-A2-021
194	D-RNA	CAGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCUG	181-A2-022
195	D-RNA	CUGCGUAGUGAGAAACUACCAACGACUGGCUAGAGCCGGCAG	181-A2-023
196	D-RNA	AGCGUGUUAGUGAAGUGGGUGGCAGGUAAAGGACACGCU	184-B8trc
197	D-RNA	AGCGUGUAGCGGUGUGGGUGGUAGGUAAAGGCCACGCU	184-C6trc
198	D-RNA	AGCGUGAUAGAAAGAGCGGGUGGUAGGUAAAGGUCAGGCU	184-H5trc
199	D-RNA	AGCGUGUUAGGUAGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	184-A7trc
200	D-RNA	AGCGUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	187-A5trc
201	D-RNA	AGCGUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACGCU	187-H5trc
202	D-RNA	CCGCUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCGG	174-D4-004
203	D-RNA	GCGCGAGCAGGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGACUCGCGGUC	166-A4-002
204	D-RNA	CGUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACACG	187-A5trc-001
205	D-RNA	GUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGACAC	187-A5trc-002
206	D-RNA	CGUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCACG	187-H5trc-002
207	D-RNA	GUGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCAC	187-H5trc-003
208	D-RNA	UGUUAGGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAAGGGCA	187-H5trc-004
209	D-RNA	GGACGAGAGUGACAAUUGAUUAUAAACCUCCUGACUAAACGCGGACAGG	177-B3
210	D-RNA	GGACCUAUCGCUAAGACAACCGCGCAGUCUACGGGACAUUCCCGCGGACAGG	177-C1
211	D-RNA	GGACAAUUGUUACCCCGGAGAGAGACAAUUGAGACAACCUCCUGAAGACAGG	177-C2
212	D-RNA	GGACGAAAGUGAGAAUUGAUUACAACCUCCUGUUGCGGAAUCCGGACAGG	177-E3

【表 1 4】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
213	D-RNA	GGACGUAAGAGCGCUACCCGAAAGAAUGUCAGGAGGGUAGACCGACAGG	177-D1
214	D-RNA	GGACUAGAAACUACAUAAGCGGCCAGUUGCACCCGCUUAUCAACGACAGG	177-E1
215	D-RNA	GGACUAGUCAGCCAGUGUGUAUAUCGGACCGGGUUUAUUUACUGACAGG	177-A1
216	D-RNA	GGACUGUCCGGAGUGUGAAACUCCCCGAGACCGCCAGAAAGCGGGGACAGG	177-G3
217	D-RNA	GGACUUCUAUCCAGGUGGGUGUAUAGUAAGAGAUAGAAGUGACAGG	177-C3
218	D-RNA	GGACGAGAGCGAACAUAUGAUUAUAAACCUCCUGACGGAAAGAGAUAGACAGG	177-A2
219	D-RNA	CCUGUGCUACACGCGAGUAAGAAAGUGAACGUUCAGUAUGUGGCACAGG	170-E4trc
220	D-RNA	CGUGAGCCAGGCACCGAGGGCGUUAACUGGCUGAUUGGACACGACAGG	166-D2trc
221	D-RNA	CGUGAACAUCAAGCUAAGCGGGGCGUGUUGGUUGCUUGGCCCGCCACG	174-A2trc
222	D-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAACCGUAAAACCUAAUUGGGCCGCGCAGG	174-E2trc
223	D-RNA	CGUGCAGAGAGAGACCAACCGUAAAACCUAAUUGGGCCGCGCAGG	183-G3trc
224	D-RNA	CGUGAACAUCAAGCUAAGCGGGGCGUGUUGGUUGCUUGGCCCGCCACG	183-B2trc
225	D-RNA	CGUGCCGAGGCGCGACCGAGCGGUUACUUAGAGAGGCUUUGGCACCCAGG	166-B2trc
226	D-RNA	CGUGAUAAACAGCCGUCGGUCAAGAAACAAAGUUCGGCGCGCGCAGG	166-G3trc
227	D-RNA	CGUGGGUGGCGCACCGAGGGCGGAAAGCCACAGUAAAGAUAGACCG	166-D1trc
228	D-RNA	CGUGUGAUCUCCUUUGGGUGAUUAGCUUAGAGACUCCACACG	183-H2trc
229	D-RNA	GCACCUUCGCCUAAUACACGUGCCGCGUAGCUAAUACUCGUCCGC	167-A7trc
230	D-RNA	GCACGACUUGGGCGACCGAGUGAUACUUAGAGAGCAAGUCGUCGGC	167-C7trc
231	D-RNA	GCGCGGCUCAGUAAAGAAAUUGAAAGUUCAGAAUUGUCGUCGCGC	167-B5trc
232	D-RNA	AGUGUGGCGAGGCUAAGGAGAUUUCGAGACCACGCU	184-D7trc

【表 15】

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
233	D-RNA	AGUGUGGCAGACUAUGGAUAGACUCCGAGACCACGCU	184-D6trc
234	D-RNA	AGCGUGAGGCGACCAGCGGAUUACUUAGAGAGUCACGCU	184-E5trc
235	D-RNA	AGCGUGAAGGGGACCAGCGUUACUUACAGAGUUCACGCU	184-G6trc
236	D-RNA	AGCGUGUGAUGUAUGUAGCACCCGUAUCAGAGGACACGCU	184-B7trc
237	D-RNA	AGCGUGAGGCGACCCGUGUUUCGUAGAGAGUCACGCU	184-B6trc
238	D-RNA	5' PEG-GCACGUCCUCACCCGUGCAAGUGAACCCGUGGUCUGCG	NOX-E36-5' PEG
239	D-RNA	GCACGUCCUCACCCGUGCAAGUGAACCCGUGGUCUGCG-3' PEG	NOX-E36-3' PEG
240	D-RNA	GAGUUGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGCGGCCAUUC	188-A3-001
241	D-RNA	GAUGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGCGGCCAUUC	188-A3-004
242	D-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGCGGCCAUUC	188-A3-005
243	D-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGCGGCCAUUC	188-A3-006
244	D-RNA	GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGCGGCCCA	(D-) 188-A3-007 = (D-mNOX-E36
245	D-RNA	GCUGGUUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCACCAGC	189-G7-001
246	D-RNA	CUGGUUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCACCAG	189-G7-002
247	D-RNA	UGGUUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCACCACCA	189-G7-003
248	D-RNA	GCCGGUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCACCGGC	189-G7-007
249	D-RNA	GCCGGCUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCGCGGC	189-G7-008
250	D-RNA	GCGCGUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCGCGGC	189-G7-010
251	D-RNA	GGGCCUACCGAGGGGCGUCGUUGGAGUUUGGUUGGUUCCGCGGC	189-G7-012
252	レタンパク質	QPDVAVNAPLTCCYSFTGKMIPIMSRLENYKRITSSRCPKAEVFTVKLKREICADPNKEWVQ	ラット MCP-1

【表 16】

		KYIRKLDQNQVRSET	
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
253	L-RNA	5' PEG-GGCGACAUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGGGCCA	mNOX-E36-5' PEG
254	L-RNA	GGCGACAUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCUUUGAUGAAUCCGGGCCA-3' PEG	mNOX-E36-3' PEG
255	L-DNA	5' -GAGGGACGTGC- (スパーサー-18) ₂ -NH ₄ ⁺ -3'	NOX-E36 捕捉 プローブ
256	L-DNA	5' - ビオチン - (スパーサー-18) ₂ -CGCAGAGCC	NOX-E36 検出 (-イオン) プローブ
257	L-タンパク質	KSMQVPFSCCFSAEQEIPLRAILCYRNTSSICSNEGLIFKLKRGKEACALDTVGVQVRHRKM LRHCPSKRK	CCL1/I-309
258	L-タンパク質	SLAADTPTACCFSTSRQIPQNFIAFYFETSSQCSKPGVIFLTRSRQVCADPSEEWQKYVSD LELSA	CCL3/MIP-1α
259	L-タンパク質	APMGSDPPTACCFSTARKLPNRFVVDYYETSSLCSPAVVFQTKRSKQVCADPSESQWQYVY DLELN	CCL4/MIP-1β
260	L-タンパク質	SPYSSDTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKCSNPVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINS LEMS	CCL5/RANTES
261	L-タンパク質	FNPGLAQPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQRLKSYVITTSRCPOKAVIFRTKLGEICADPKEK WVQNYMKHLGRKAHTLKT	CCL13/MCP-4
262	L-タンパク質	TKTESSSRGPYPHSECCFTYTYKIQRIMDYETNSQCSKPGIVFITKRGHSVCTNPSPDKWV QDYIKDMKEN	CCL14/HCC-1
263	L-タンパク質	ASVATELRQCCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLNPAASPVKIIE KMLNSDKSN	CXCL1/GROα
264	L-タンパク質	APLATELRQCCLQTLQGIHLKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNQKACLNPAASPVMVKIIE KMLKNGKSN	CXCL2/GROβ
265	L-タンパク質	ASVVTELRQCCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPPHCAQTEVIATLKNKKACLNPAASPVMVKIIE KILNKGSTN	CXCL3/GROγ

【表 17】

266	L-タンパク質	EAEEDGDLQCLCVKTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNRKRKICLDLQAPLYKKII KKLLES	CXCL4/PF4
配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
267	L-タンパク質	GPAAVLRELRCVCLQTTOGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKNKGEICLDPEA PFLKKVVIQKILDGKNKEN	CXCL5/ENA-78
268	L-タンパク質	GPVSAVLTELRCCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVVASLKNKGQVCLDPEA PFLKKVVIQKILDSGNKKN	CXCL6/GCP-2
269	L-タンパク質	SSTKGQTKRNLAKGKEESLSDSLYAEELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIKGTHCNQVE VIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQKKLAGDESAD	CXCL7/NAP-2
270	L-タンパク質	EGAVLPRSAKELRCQCIKTYSKPFFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDBGRELCLD PKENWVQRVVEKFLKRAENS	CXCL8/IL-8
271	L-タンパク質	TPVVRKGRCSISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEIIATLKNQVQTCNLNPDSD VKELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKKHQKKVLKVRKSQRSRQKKTT	CXCL9/MIG
272	L-タンパク質	VPLSRTVRCCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGKRCNLNPESK AIKNLLKAVSKERSKRSP	CXCL10/IP-10
273	L-タンパク質	FPMFKRGRCLCIGPGVKA VKVADIEKASIMYPNNCDKIEVIIITLKENKGQRCNLNPKSK QARLIKKVERKNF	CXCL11/I-TAC
274	L-タンパク質	KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQ EYLEKALNKRFKM	CXCL12α/SDF-1α
275	L-タンパク質	KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQ EYLEKALNKRFKM	CXCL12β/SDF-1β
276	L-タンパク質	QHHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQASC GKRAIIILETRQHR LFCADPKEQWVK	CX ₃ CL1/フラクタルカイン

【表 18】

		DAMQHLD RQAAALTRNG	
	L-タンパク質	VGSEVSDKRTC VSLTTQRLPVSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCADPQATWVRDV	XCL1/リンホタケチン
277		VRSMDRKSNTNRNMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTG	

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内的参照
278	L-RNA	5'-ピオチン -GCACGUCUCCUACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGUCUCGCG	ピオチニル化 NOX-E36
279	L-RNA	5'-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGU AGCGCUGUGCAGAGCU	POC
280	L-RNA	5'-PEG-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGU AGCGCUGUGCAGAGCU-3'	POC-PEG
281	L-DNA	5'-CCAATGTCGCC-(スペーサー 18) ₂ -NH ₄ ⁺ -3'	mNOX-E36 捕捉 プローブ
282	L-DNA	5'-ピオチン -(スペーサー 18) ₂ -CGCAGAGCC	mNOX-E36 検出 (-イオン) プローブ
283	L-タンパク質	QPDAINSPVTCCYTFTGKKISSQRLGSYKRVTSKCPKEAVIFKTLAKEIC ADPEQKWVQDAVKQLDKKAQTPKP	ウマ MCP-1 (Equus caballus)
284	L-タンパク質	QPDAINSQVACCYTFSKKISMQRMLMNYRRVTSSKCPKEAVIFKTLGKELC ADPKQKWVQDSINYLNNKNQTPKP	ウシ MCP-1 (Bos Taurus)
285	L-タンパク質	QPDAVNAPLTCCYSFTGKMIPMSRLNYKRITSSRCPEAVVFTKLKREIC ADPNKEWQKYIRKLDQNQVRSETTVFYKIASTLRTSAPLNVNLTHKSEANA STLFSTTTSSTSVETSMTEN	ラット MCP-1 (Rattus norvegicus)

[実施例]

【実施例 1】

【0245】

ヒト MCP - 1 を結合する核酸

ビオチニル化ヒト D - MCP - 1 を標的として使用して、ヒト MCP - 1 に結合する数種の核酸を生成し得、それらのヌクレオチド配列を図 1 から 7 に描く。該核酸は、ビオチニル化ヒト D - MCP - 1 を用いる競合若しくは直接プルダウンアッセイを使用してアプタマーすなわち D - 核酸レベル (実施例 4) で、または Biacore 2000 装置を使用する表面プラズモン共鳴測定 (実施例 7)、in vitro 細胞培養物 Ca⁺⁺ 放出アッセイ (実施例 5) 若しくは in vitro 走化性アッセイ (実施例 6) によりシ

10

【0246】

かように生成した核酸は多様な配列モチーフを表し、4 種の主な型を図 1 および 2 (1 A / 1 B 型)、図 3 (2 型)、図 4 および 5 (3 型) ならびに図 6 (4 型) に定義する。相互とおよび本明細書に記述される多様な配列モチーフと関係し得ない、付加的な MCP - 1 に結合する核酸を図 7 に列挙する。ヌクレオチド配列モチーフの定義のため、紛らわしいヌクレオチドの I U P A C 略語を使用する。すなわち、

S	強	G 若しくは C ;
W	弱	A 若しくは U ;
R	プリン	G 若しくは A ;
Y	ピリミジン	C 若しくは U ;
K	ケト	G 若しくは U ;
M	イミノ	A 若しくは C ;
B	A でない	C 若しくは U 若しくは G ;
D	C でない	A 若しくは G 若しくは U ;
H	G でない	A 若しくは C 若しくは U ;
V	U でない	A 若しくは C 若しくは G ;
N	全	A 若しくは G 若しくは C 若しくは U。

20

【0247】

それとは反対に示されない場合、いかなる核酸配列若しくはそれぞれ伸長およびボックスの配列も 5 ' 3 ' の方向で示す。

30

【0248】

1 A 型の MCP - 1 に結合する核酸 (図 1)

図 1 に描かれるとおり、1 A 型の MCP - 1 に結合する核酸の全配列は、数個の配列伸長若しくはボックスを含んでなり、これにより、

【0249】

【化 1】

ボックス B1A および B1B

40

【0250】

は相互とハイブリダイズし得る 5 ' および 3 ' 末端伸長である。しかしながら、こうしたハイブリダイゼーションは生理学的条件下で実際に存在するところの分子で必ずしも示されない。

【0251】

【化 2】

ボックス B2、B3、B4、B5 およびボックス B6 はボックス B1A およびボックス B1B

50

【 0 2 5 2 】

により隣接される。

【 0 2 5 3 】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ビオチニル化ヒト D - M C P - 1 を用いる直接および競合プルダウンアッセイを使用して、アプタマーレベルで特徴付けした（実施例 4）。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し（実施例 3）、そして、天然の配置の M C P - 1（L - M C P）を使用して *in vitro* 細胞培養物 Ca^{++} 放出アッセイにて試験した（実施例 5）。

【 0 2 5 4 】

定義されるボックスの配列は、M C P - 1 に対する結合親和性に影響する 1 A 型の M C P - 1 に結合する核酸間で異なりうる。1 A 型の M C P - 1 に結合する核酸として要約される多様な M C P - 1 に結合する核酸の結合分析に基づき、

【 0 2 5 5 】

【 化 3 】

ボックス B1A、B2、B3、B4、B5、B6 および B1B、

【 0 2 5 6 】

ならびに下述されるところのそれらのヌクレオチド配列は、個々にかつより好ましくはそっくりそのまま、M C P - 1 への結合に不可欠である。

【 0 2 5 7 】

【 化 4 】

- ・ボックス B1A および B1B は 5' および 3' 末端伸長であるは相互とハイブリダイズし得、ここで B1A は AGCRUG、好ましくは AGCGUG であり；また、ここで、B1B は CRYGCU、好ましくは CACGCU であり；
- ・CCCGGW、好ましくは CCCGGU であるボックス B2；
- ・GUR、好ましくは GUG であるボックス B3；
- ・RYA、好ましくは GUA であるボックス B4；
- ・GGGGGRCGCGAYC、好ましくは GGGGGGCGCGACC であるボックス B5；
- ・UGCAAUAAUG 若しくは URYAWUUG、好ましくは UACAUUUG であるボックス B6。

【 0 2 5 8 】

図 1 に描かれるとおり、176 - E10trc と称される核酸分子は、M C P - 1 に対する最良の結合親和性を有し（アプタマーとしてプルアッセイで 5 nM の K_D を伴い、ならびにシュピーゲルマーとして *in vitro* 細胞培養物 Ca^{++} 放出アッセイで 4 ~ 5 nM の IC_{50} を伴う）、そして従って、最適配列、ならびに

【 0 2 5 9 】

【 化 5 】

配列要素 B1A、B2、B3、B4、B5、B6 および B1B

【 0 2 6 0 】

の最適の組合せを構成しうる。

【 0 2 6 1 】

1 B 型の M C P - 1 に結合する核酸（図 2）

図 2 に描かれるとおり、1 B 型の全配列は数個の配列伸長若しくはボックスを含んでなり、これにより

【 0 2 6 2 】

【 化 6 】

ボックスB1AおよびB1B

【 0 2 6 3 】

は相互とハイブリダイズし得る 5' および 3' 末端伸長であり、ならびに

【 0 2 6 4 】

【 化 7 】

ボックスB2、B3、B4、B5およびボックスB6はボックスB1AおよびボックスB1B

10

【 0 2 6 5 】

により隣接される。しかしながら、こうしたハイブリダイゼーションは、生理学的条件下で実際に存在するところの分子で必ずしも示されない。

【 0 2 6 6 】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ピオチニル化ヒト D - MCP - 1 を用いる直接および競合プルダウンアッセイを使用して、アプタマーレベルで特徴付けした（実施例 4）。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し（実施例 3）、そして、天然の配置の MCP - 1（L - MCP）を使用して *in vitro* 細胞

20

培養物 Ca^{++} 放出アッセイにて試験した（実施例 5）。

【 0 2 6 7 】

定義されるボックスの配列は、MCP - 1 に対する結合親和性に影響する 1 B 型の MCP - 1 に結合する核酸間で異なりうる。1 B 型の MCP - 1 に結合する核酸として要約される多様な MCP - 1 に結合する核酸の結合分析に基づき、

【 0 2 6 8 】

【 化 8 】

ボックスB1A、B2、B3、B4、B5、B6およびB1B、

30

【 0 2 6 9 】

ならびに下述されるところのそれらのヌクレオチド配列は、個々にかつより好ましくはそっくりそのまま、MCP - 1 への結合に不可欠である。

【 0 2 7 0 】

【 化 9 】

- ・相互とハイブリダイズし得るボックスB1AおよびB1B、ここでB1AはAGYRUG、好ましくはAGCGUGであり；またここでB1BはCAYRCU、好ましくはCACGCUであり；
- ・CCAGCU若しくはCCAGY、好ましくはCCAGUであるボックスB2；
- ・GUGであるボックスB3；
- ・AUGであるボックスB4；
- ・GGGGGGCGCGACCであるボックスB5；
- ・CAUUUUA若しくはCAUUUA、好ましくはCAUUUUAであるボックスB6。

40

【 0 2 7 1 】

図 2 に描かれるとおり、176 - C9trc と称される核酸は、MCP - 1 に対する最良の結合親和性を有し（アプタマーとしてプルダウンアッセイで 5 nM の K_D を伴い、ならびにシュピーゲルマーとして *in vitro* 細胞培養物 Ca^{++} 放出アッセイで 4 ~ 5 nM の IC_{50} を伴う）、そして従って、最適配列、ならびに

50

【 0 2 7 2 】

【 化 1 0 】

配列要素B1A、B2、B3、B4、B5、B6およびB1B

【 0 2 7 3 】

の最適の組合せを構成しうる。

【 0 2 7 4 】

2 型の MCP - 1 に結合する核酸 (図 3)

図 3 に描かれるとおり、2 型の全配列は数個の配列伸長若しくはボックスを含んでなり、これにより

【 0 2 7 5 】

【 化 1 1 】

ボックスB1AおよびB1B

【 0 2 7 6 】

は相互とハイブリダイズし得る 5' および 3' 末端伸長であり、ならびにボックス B 2 は中央配列要素である。しかしながら、こうしたハイブリダイゼーションは、生理学的条件下で実際に存在するところの分子で必ずしも示されない。

【 0 2 7 7 】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ビオチニル化ヒト D - MCP - 1 を用いる直接および競合プルダウンアッセイを使用して、アプタマーレベルで特徴付けした (実施例 4)。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し (実施例 3)、そして、天然の配置の MCP - 1 (L - MCP) を使用して *in vitro* 細胞培養物 Ca⁺⁺ 放出 (実施例 5) 若しくは *in vitro* 走化性アッセイ (実施例 6) にて試験した。

【 0 2 7 8 】

定義されるボックスの配列は、MCP - 1 に対する結合親和性に影響する 3 型の MCP - 1 に結合する核酸間で異なりうる。2 型の MCP - 1 に結合する核酸として要約される多様な MCP - 1 に結合する核酸の結合分析に基づき、

【 0 2 7 9 】

【 化 1 2 】

ボックスB1A、B2およびB1B、

【 0 2 8 0 】

ならびに下述されるところのそれらのヌクレオチド配列は、個々にかつより好ましくはそっくりそのまま、MCP - 1 への結合に不可欠である。

【 0 2 8 1 】

【 化 1 3 】

・相互とハイブリダイズし得る 5' および 3' 末端伸長、ボックス B1A および B1B、ここで B1A は ACGCA でありかつ B1B は UGCGU であるか、または B1A は CGCA でありかつ B1B は UGCG であるか、または B1A は GCA でありかつ B1B は UGCG 若しくは UGC であり; 好ましくは B1A は GCA でありかつ B1B は UGCG であり;

・ボックス B2、CSUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGYGGCUC、好ましくは GUCCUCACCGGUGCAAGUGAAGCCGUGGCUC

【 0 2 8 2 】

10

20

30

40

50

図 3 に描かれるとおり、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 (= NOX-E36) のような 180-D1-002 の誘導体は、アプタマーとしてブルダウン若しくは競合ブルダウンアッセイで $< 1 \text{ nM}$ の K_D を伴い MCP-1 に対する最良の結合親和性を有し、そして従って、最適配列、ならびに

【0283】

【化14】

配列要素B1A、B2およびB1B

10

【0284】

の最適の組合せを構成しうる。

【0285】

核酸分子 D-NOX-E36 (D-180-D1-036 ; 配列番号 159) について、室温 (RT) で $890 \pm 65 \text{ pM}$ および 37 で $146 \pm 13 \text{ pM}$ の解離定数 (K_D) が測定された (実施例 4 ; 図 9)。それぞれのシュピーゲルマー-NOX-E36 (180-D1-036 ; 配列番号 37) は、*in vitro* Ca^{++} 放出アッセイで 3 ~ 4 nM (実施例 5 ; 図 12) および *in vitro* 走化性アッセイで約 0.5 nM (実施例 6 ; 図 15) の阻害濃度 (IC_{50}) を表した。NOX-E36 の PEG 化誘導体、NOX-E36-3'PEG および NOX-E36-5'PEG については、 Ca^{++} 放出アッセイで約 3 nM (実施例 5 ; 図 25 および 図 27 A) ならびに走化性アッセイで $< 1 \text{ nM}$ (実施例 6 ; 図 26 および 図 27 B) の IC_{50} が測定された。

20

【0286】

3 型の MCP-1 に結合する核酸 (図 4 および 5)

図 4 および 5 に描かれるとおり、3 型の全配列は数個の配列伸長若しくはボックスを含んでなり、これにより 3 対のボックスが 3 型の MCP-1 に結合する核酸について特徴付けられている。

【0287】

【化15】

30

ボックスB1AおよびB1B

【0288】

ならびにボックス B2A および B2B ならびにボックス B5A および B5B の双方は、相互とハイブリダイズする能力を有する。しかしながら、こうしたハイブリダイゼーションは、生理学的条件下で実際に存在するところの分子で必ずしも示されない。これらの潜在的にハイブリダイズされる配列要素間に、ハイブリダイズしないヌクレオチドが配置され、

【0289】

【化16】

40

ボックスB3、B4およびB6

【0290】

と定義される。

【0291】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ピオチニル化ヒト D-MCP-1 を用いる直接および競合ブルダウンアッセイを使用して、アプタマーレベルで特徴付けした (実施例 4)。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し (実施例 3)、そして天然の配置の MCP-1 (L-MCP) を使用して *in vitro* 走化性

50

アッセイ（実施例 6）にて、若しくは *Biacore* 測定（実施例 7）を介して試験した。

【0292】

定義されるボックスの配列は、MCP-1 に対する結合親和性に影響する 3 型の MCP-1 に結合する核酸間で異なりうる。3 型の MCP-1 に結合する核酸として要約される多様な MCP-1 に結合する核酸の結合分析に基づき、

【0293】

【化 17】

ボックス B1A、B2A、B3、B2B、B4、B5A、B6、B5B、B1B、

10

【0294】

ならびに下述されるところのそれらのヌクレオチド配列は、個々にかつより好ましくはそっくりそのまま、MCP-1 への結合に不可欠である。

【0295】

【化 18】

・相互とハイブリダイズし得る 5' および 3' 末端伸長、ボックス B1A および B1B、ここで、B1A は GURCUGC でありかつ B1B は GCAGCAC であり；好ましくは B1A は GUGCU GC でありかつ B1B は GCAGCAC であるか；

20

または、B1A は GKSYGC でありかつ B1B は GCRSMC であり；好ましくは B1A は GUG CGC でありかつ B1B は GCGCAC であるか；

または、B1A は KBBSC でありかつ B1B は GSVVM であり；好ましくは B1A は KKSSC でありかつ B1B は GSSMM であるか；

または、B1A は BNGC でありかつ B1B は GCNV であり；好ましくは B1A は SNGC でありかつ B1B は GCNS であり；最も好ましくは B1A は GGGC でありかつ B1B は GCCC であり；

・相互にハイブリダイズし得る伸長、ボックス B2A および B2B、ここで B2A は GKMGU でありかつ B2B は ACKMC であり；好ましくは B2A は GUAGU でありかつ B2B は ACUAC であり；

30

・*KRRAR*、好ましくは *UAAAA* 若しくは *GAGAA* であるボックス *B3*；

・*CURYGA* 若しくは *CUWAUGA* 若しくは *CWRMGACW* 若しくは *UGCCAGUG*、好ましくは *CAGCGACU* 若しくは *CAACGACU* であるボックス *B4*；

・相互とハイブリダイズし得る伸長 *B5A* および *B5B*、ここで *B5A* は *GGY* でありかつ *B5B* は *GCYR* である一方、*GCY* は *B5A* のヌクレオチドとハイブリダイズし得るか；若しくは *B5A* は *CWGC* でありかつ *B5B* は *GCWG* であり；好ましくは *B5A* は *GGC* でありかつ *B5B* は *GCCG* であり；

40

・*YAGA* 若しくは *CKAAU* 若しくは *CCUUUAU*、好ましくは *UAGA* であるボックス *B6*。

【0296】

図 4 および 5 に描かれるとおり、178-D5 と称される核酸およびその誘導体 178-D5-030、ならびにその誘導体 181-A2-002、182-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 を含む 181-A2 は MCP-1 に対する最良の結合親和性を有する。178-D5 および 178-D5-030 は、アプタマーとして直接若しくは競合プルダウンアッセイ（実施例 4）にておよそ 500 pM の K_D を伴い評

50

価された。同一の実験の設定で、181-A2はおよそ100 pMの K_D を伴い測定された。Biacore分析(実施例7)により、181-A2およびその誘導体のMCP-1に対する K_D は200~300 pMであることが決定された。培養細胞を用いる Ca^{+} 放出および走化性アッセイ(それぞれ実施例5および6)において、178-D5および181-A2双方についておよそ500 pMの IC_{50} が測定された。従って、178-D5ならびに181-A2およびそれらの誘導体は、最適配列、ならびに

【0297】

【化19】

配列要素B1A、B2A、B3、B2B、B4、B5A、B6、B5BおよびB1B

10

【0298】

の最適の組合せを構成しうる。

【0299】

4型のMCP-1に結合する核酸(図6)

図6に描かれるとおり、4型の全配列は数個の配列、伸長若しくはボックスを含んでなり、これにより

【0300】

【化20】

ボックスB1AおよびB1B

20

【0301】

は相互とハイブリダイズし得る5'および3'末端伸長であり、また、ボックスB2は中央配列要素である。

【0302】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ビオチニル化ヒトD-MCP-1を用いる直接プルダウンアッセイを使用してアプタマーレベルで特徴付けした(実施例4)。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し(実施例3)、そして天然の配置のMCP-1(L-MCP)を使用して、*in vitro*細胞培養物 Ca^{+} 放出(実施例5)および/若しくは走化性アッセイ(実施例6)で試験した。

30

【0303】

定義されたボックスの配列は、4型のMCP-1に結合する核酸間で異なることがあり、それはMCP-1への結合親和性に影響する。4型のMCP-1に結合する核酸として要約される多様なMCP-1に結合する核酸の結合分析に基づき、

【0304】

【化21】

ボックスB1A、B2およびB1B、

40

【0305】

ならびに下述されるところのそれらのヌクレオチド配列は、個別に個々にかつより好ましくはそっくりそのまま、MCP-1への結合に不可欠である。

【0306】

【化 2 2】

・相互とハイブリダイズし得る5' および3' 末端伸長、ボックスB1AおよびB1B、ここでB1AはAGCGUGDUでありかつB1BはGNCASGCUであるか;若しくはB1AはGCGC GAGでありかつB1BはCUCGCGUCであるか;若しくはB1AはCSKSUUでありかつB1BはGRSMSGであるか;若しくはB1AはGUGUUでありかつB1BはGRCACであるか;若しくはB1AはUGUUでありかつB1BはGGCAであり;好ましくはB1AはCSKS UUでありかつB1BはGRSMSGであり;最も好ましくはB1AはCCGCUUでありかつB1BはGGGCGGであり;ならびに

10

・AGNDRDGBKGGURGYARGUAAAAG若しくはAGGUGGGUGGUAGUAAAGUAAA G若しくはCAGGUGGGUGGUAGAAUGUAAAGA、好ましくはAGGUGGGUGGUAG UAAGUAAAGであるボックスB2。

【0307】

図6に描かれるとおり、174-D4-004および166-A4-002と称される核酸はMCP-1に対する最良の結合親和性を有し(シュピーゲルマーとして*in vitro*細胞培養物Ca⁺⁺放出アッセイで2~5nMのIC₅₀を伴う)、そして、従って、最適配列、ならびに

【0308】

20

【化 2 3】

配列要素B1A、B2およびB1B

【0309】

の最適の組合せを構成しうる。

【0310】

加えて、MCP-1に結合する核酸の1~4型について示されたところのヌクレオチド配列要素の組合せにより記述され得ない、29種の他のMCP-1に結合する核酸が同定された。これらの配列を図7に列挙する。

【0311】

30

図1から7に示される配列のいずれも、その切断型を包含するがしかしその伸長型もまた包含する本発明の核酸であることが理解されるべきであるが、但し、しかしながらそれぞれかように切断および伸長された核酸分子は標的に結合することがなお可能である。

【実施例2】

【0312】

マウスMCP-1を結合する核酸

標的としてピオチニル化マウスD-MCP-1を使用して、それに結合する数種の核酸分子を生成し得た。これらの核酸分子の配列分析の結果を図8から採用し得る。

【0313】

該核酸を、それらの結合挙動に関してそれらを等級付けするために、ピオチニル化マウスD-MCP-1を使用するプルダウンアッセイを使用してアプタマーレベルで特徴付けした(実施例4)。選択した配列をシュピーゲルマーとして合成し(実施例3)、そして天然の配置のMCP-1(L-MCP)を使用して、*in vitro*細胞培養物Ca⁺⁺放出(実施例5)および走化性アッセイ(実施例6)で試験した。

40

【0314】

図8に描かれるとおり、D-188-A3-001およびD-189-G7-001ならびにそれらの誘導体は、プルダウンアッセイにてナノモル濃度以下のK_DでD-MCP-1を結合する(図8)。

【0315】

D-mNOX-E36(=D-188-A3-007;配列番号244)について、3

50

7 で 0.1 ~ 0.2 nM の解離定数 (K_D) が測定された (実施例 4 ; 図 10)。それぞれのシュピーゲルマー-mNOX-E36 (188-A3-007 ; 配列番号 122) は、*in vitro* Ca^{++} 放出アッセイ (実施例 5 ; 図 13) でおよそ 12 nM、および *in vitro* 走化性アッセイ (実施例 6 ; 図 16) でおよそ 7 nM の阻害濃度 (IC_{50}) を表した。mNOX-E36 の PEG 化誘導体 mNOX-E36-3'PEG (配列番号 254) について、 Ca^{++} 放出アッセイでおよそ 8 nM (実施例 5、図 29) および走化性アッセイでおよそ 3 nM (実施例 6 ; 図 31) の IC_{50} が測定された。

【0316】

図 1 から 7 に示される配列のいずれも、その切断型を包含するがしかしその伸長型もまた包含する本発明の核酸であることが理解されるべきであるが、但し、しかしながらそれぞれかように切断および伸長された核酸分子は標的に結合することがなお可能である。

【実施例 3】

【0317】

アプタマーおよびシュピーゲルマーの合成および誘導体化

小スケール合成

アプタマーおよびシュピーゲルマーは、2' TBDMS RNA ホスホルアミダイト化学 (M. J. Damha, K. K. Ogilvie, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, S. Agrawal 編, p. 81-114, Humana Press Inc., 1993) を使用して、ABI 394 合成機 (Applied Biosystems, 米国カリフォルニア州フォスターシティ) を用いる固相合成により製造した。D および L-配置の rA(N-Bz)-、rC(Ac)-、rG(N-ibu)- および rU- ホスホルアミダイトは ChemGenes、マサチューセッツ州ウィルミントンから購入した。アプタマーおよびシュピーゲルマーはゲル電気泳動により精製した。

【0318】

大スケール合成および修飾

シュピーゲルマー-NOX-E36 は、2' TBDMS RNA ホスホルアミダイト化学 (M. J. Damha, K. K. Ogilvie, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 *Protocols for oligonucleotides and analogs*, S. Agrawal 編, p. 81-114, Humana Press Inc., 1993) を使用して、Aektapilot 100 合成機 (Amersham Biosciences ; General Electric Healthcare, フライブルク) を用いる固相合成により製造した。L-rA(N-Bz)-、L-rC(Ac)-、L-rG(N-ibu)- および L-rU- ホスホルアミダイトは ChemGenes、マサチューセッツ州ウィルミントンから購入した。5'-アミノ修飾物質は American International Chemicals Inc. (米国マサチューセッツ州フラミンガム) から購入した。未修飾シュピーゲルマーの合成は L-リボ G 修飾 CPG 孔径 1000 (Link Technology、英国グラスゴー) 上で開始し ; 3'-NH₂ 修飾シュピーゲルマーには 3'-Aminomodifier-CPG、1000 (ChemGenes、マサチューセッツ州ウィルミントン) を使用した。カップリング (周期あたり 15 分) のため、アセトニトリル中 0.3 M ベンジルチオテトラゾール (CMS-Chemicals、英国アピンドン) および 3.5 等量のアセトニトリル中のそれぞれの 0.1 M ホスホルアミダイト溶液を使用した。酸化-キャッピング周期を使用した。オリゴヌクレオチド合成のためのさらなる標準的溶媒および試薬は Biosolve (オランダ・ファルケンスワルト) から購入した。シュピーゲルマーは DMT-ON で合成し ; 脱保護後に、Source 15 RPC 媒体 (Amersham) を使用する調製的 RP-HPLC (Wincott F. ら (1995) *Nucleic Acids Res* 23:2677) を介してそれを精製した。5' DMT 基を 80% 酢酸で除去した (RT で 30 分)。その後、水性 2

10

20

30

40

50

M NaOAc 溶液を添加し、そして 5 K 再生セルロースメンブレン (Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード) を使用する接線流濾過によりシュビーゲルマーを脱塩した。

【0319】

NOX-E36 の PEG 化

シュビーゲルマーの *in vivo* での血漿滞留時間を延長するため、シュビーゲルマー-NOX-E36 を 3' 端若しくは 5' 端で 40 kDa のポリエチレングリコール (PEG) 部分に共有結合した。

【0320】

NOX-E36 の 3' - PEG 化

PEG 化 (PEG 化方法の技術的詳細は欧州特許出願第 EP 1 306 382 号明細書を参照されたい) のため、精製した 3' アミノ修飾シュビーゲルマーを H₂O (2.5 ml)、DMF (5 ml) および緩衝液 A (5 ml; クエン酸・H₂O [7 g]、ホウ酸 [3.54 g]、リン酸 [2.26 ml] および 1 M NaOH [343 ml] を混合すること、ならびに 1 l の最終容量まで H₂O を添加することにより調製した; pH = 8.4 を 1 M HCl で調節した) の混合物に溶解した。

【0321】

シュビーゲルマー溶液の pH を 1 M NaOH で 8.4 にもたらした。その後、40 kDa の PEG-NHS エステル (Nektar Therapeutics、アラバマ州ハンツビル) を、75 ないし 85 % の最大収率に達するまで、0.6 等量の 4 部分で 37 で 30 分毎に添加した。反応混合物の pH は、PEG-NHS エステルの添加の間、1 M NaOH で 8 ~ 8.5 に保った。

【0322】

反応混合物を 4 ml 尿素溶液 (8 M)、4 ml 緩衝液 A および 4 ml 緩衝液 B (H₂O 中 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) と混和し、そして 95 °C に 15 分間加熱した。PEG 化したシュビーゲルマーをその後、アセトニトリル勾配 (緩衝液 B; 緩衝液 C: アセトニトリル中 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) を使用して、Source 15 RPC 媒体 (Amersham) を用いる RP-HPLC により精製した。過剰の PEG は 5 % 緩衝液 C、PEG 化されたシュビーゲルマーは 10 ~ 15 % 緩衝液 C で溶離した。 > 95 % (HPLC により評価されるところの) の純度を伴う生成物画分を合わせ、そして 40 ml の 3 M NaOAc と混合した。PEG 化シュビーゲルマーを接線流濾過 (5 K 再生セルロースメンブレン、Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード) により脱塩した。

【0323】

NOX-E36 の 5' - PEG 化

PEG 化 (PEG 化方法の技術的詳細は欧州特許出願第 EP 1 306 382 号明細書を参照されたい) のため、精製した 5' アミノ修飾シュビーゲルマーを H₂O (2.5 ml)、DMF (5 ml) および緩衝液 A (5 ml; クエン酸・H₂O [7 g]、ホウ酸 [3.54 g]、リン酸 [2.26 ml] および 1 M NaOH [343 ml] を混合すること、ならびに 1 l の最終容量まで水を添加することにより調製した; pH = 8.4 を 1 M HCl で調節した) の混合物に溶解した。

【0324】

シュビーゲルマー溶液の pH を 1 M NaOH で 8.4 にもたらした。その後、40 kDa の PEG-NHS エステル (Nektar Therapeutics、アラバマ州ハンツビル) を、75 ないし 85 % の最大収率に達するまで、0.25 等量の 6 部分で 37 で 30 分毎に添加した。反応混合物の pH は、PEG-NHS エステルの添加の間、1 M NaOH で 8 ~ 8.5 に保った。

【0325】

反応混合物を、4 ml 尿素溶液 (8 M)、および 4 ml 緩衝液 B (H₂O 中 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) と混和し、そして 95 °C に 15 分間加熱した。PEG 化した

10

20

30

40

50

シュビーゲルマーをその後、アセトニトリル勾配（緩衝液B；緩衝液C：アセトニトリル中0.1M酢酸トリエチルアンモニウム）を使用して、Source 15RPC媒体（Amersham）を用いるRP-HPLCにより精製した。過剰のPEGは5%緩衝液C、PEG化されたシュビーゲルマーは10～15%緩衝液Cで溶離した。>95%（HPLCにより評価されるところの）の純度を伴う生成物画分を合わせ、そして40mlの3M NaOAcと混合した。PEG化シュビーゲルマーを接線流濾過（5K再生セルロースメンブレン、Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード）により脱塩した。

【実施例4】

【0326】

結合定数の測定（ブルダウンアッセイ）

直接ブルダウンアッセイ

D-MCP-1に対するアプタマーの親和性をそれぞれ20若しくは37でのブルダウンアッセイ形式で測定した。アプタマーは、 $[- ^3 ^2 P]$ 標識ATP（Hartmann Analytic、独国ブラウンシュヴァイク）を使用してT4ポリヌクレオチドキナーゼ（Invitrogen、独国カールスルーエ）により5'-リン酸標識した。標識アプタマーの比放射活性は200,000～800,000cpm/pmolであった。アプタマーを、低濃度で平衡に達せさせるため、変性および再生後に、変動する量のビオチニル化D-MCP-1と一緒に選択緩衝液（20mMトリス-HCl pH7.4；137mM NaCl；5mM KCl；1mM MgCl₂；1mM CaCl₂；0.1% [w/vol] Tween-20）中20pM濃度で37で4～12時間インキュベートした。選択緩衝液は、使用されるプラスチック器具若しくは固定マトリックスの表面での結合パートナーの吸着を予防するため、10μg/mlヒト血清アルブミン（Sigma-Aldrich、独国シュタインハイム）および10μg/ml酵母RNA（Ambion、米国オースティン）を補充した。ビオチニル化D-MCP-1の濃度範囲は8pMから100nMまでに設定し；総反応容量は1mlであった。ペプチドおよびペプチド-アプタマー複合体を、選択緩衝液で前平衡させかつ6μlの総容量に再懸濁した1.5μlのストレプトアビジンUltraLink Plus粒子（Pierce Biotechnology、米国ロックフォード）に固定した。粒子をサーモミキサー中それぞれの温度で30分間懸濁に保った。固定された放射活性を、上清を分離することおよび適切な洗浄後にシンチレーションカウンターで定量した。結合の割合をビオチニル化D-MCP-1の濃度に対してプロットし、そして1：1の化学量論を推定してソフトウェアアルゴリズム（GRAFIT；Erithacus Software；英国サリー）を使用することにより、解離定数を得た。

【0327】

競合ブルダウンアッセイ

多様なD-MCP-1結合アプタマーを比較するため、競合等級付けアッセイを実施した。この目的上、利用可能な最も擬似のアプタマーを放射活性標識し（上を参照されたい）、そして参照としてはたらい。変性および再生後に、競合なしでニュートラビジンアガロース若しくはストレプトアビジンUltraLink Plus（双方ともPierceから）上での固定および洗浄後にペプチドへの5～10%結合をもたらした条件で、1ml選択緩衝液中37でビオチニル化D-MCP-1とともにそれをインキュベートした。結合反応に対応させるため、過剰の変性および再生した未標識D-RNAアプタマーバリエントを、標識参照アプタマーとともに異なる濃度（例えば2、10および50nM）まで添加した。試験されるべきアプタマーは標的結合について参照アプタマーと競合し、かようにそれらの結合の特徴の依存において結合シグナルを低下させた。本アッセイで最も活性と見出されたアプタマーは、その後、さらなるアプタマーバリエントの競合分析のための新たな参照としてはたらい得た。

【実施例5】

【0328】

10

20

30

40

50

Ca⁺⁺放出アッセイにおける阻害濃度の決定

THP-1細胞(DSMZ、ブラウンシュヴァイク)を、10%ウシ胎児血清に加え50単位/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシンおよび50μM -メルカプトエタノールを含有したGlutaMAX(Invitrogen)を含むRPMI 1640培地中、37℃かつ5%CO₂で、0.3×10⁶/mlの細胞密度で一夜培養した。

【0329】

シュピーゲルマーは、0.2ml薄型(low profile)96チューブプレート中で、1mg/mlウシ血清アルブミン、5mMプロベネシドおよび20mM HEPESを含有するハンス平衡塩類溶液(HBSS)(HBSS+)中37℃で15ないし60分間、組換えヒトMCP-1(Bachem)と一緒にインキュベートした(「刺激溶液」)。

10

【0330】

カルシウム指示薬色素を負荷するため、細胞を300×gで5分間遠心分離し、4ml指示薬色素溶液(HBSS+中10μM fluo-4[Molecular Probes]、0.08%プルロニック127[Molecular Probes])に再懸濁し、そして37℃で60分間インキュベートした。その後、11mlのHBSS+を添加し、そして細胞を上のとおり遠心分離し、15mlのHBSS+で1回洗浄し、そしてその後1.1×10⁶/mlの細胞密度を生じるようにHBSS+に再懸濁した。この細胞懸濁液90μlを黒色96ウェルプレートの各ウェルに添加した。

20

【0331】

蛍光シグナルの測定は、Fluostar Optima多検出プレートリーダー(BMG)にて485nmの励起波長および520nmの発光波長で行った。数サンプルの同時測定のため、96ウェルプレートの1(垂直)行のウェルを一緒に記録した。4秒の遅れを伴う最初の3個の読み取りをベースラインの測定のため行なった。その後記録を中断し、そしてプレートを装置から動かした。多チャンネルピペットを使用して、10μlの刺激溶液をウェルに添加し、その後プレートを再度装置に動かしかつ測定を継続した。合計で4秒の時間間隔を伴う20記録を実施した。

【0332】

各ウェルについて、最大蛍光とベースライン値の間の差違を決定し、そしてMCP-1濃度に対し、若しくは、シュピーゲルマーによるカルシウム放出の阻害に関する実験ではシュピーゲルマーの濃度に対しプロットした。

30

【0333】

ヒトMCP-1の半最大有効濃度(EC₅₀)の決定

多様なhMCP-1濃度でのTHP-1細胞の刺激、ならびに最大およびベースラインシグナルの間の差違をプロットすることの後に、約2~4nMの半有効濃度(EC₅₀)を示すヒトMCP-1の用量応答曲線を得た(図11)。この濃度を、シュピーゲルマーによるCa⁺⁺放出の阻害に関するさらなる実験に使用した。

【0334】

マウスMCP-1の半最大有効濃度(EC₅₀)の決定

40

多様なmMCP-1濃度でのTHP-1細胞の刺激、ならびに最大およびベースラインシグナルの間の差違をプロットすることの後に、約5nMの半有効濃度(EC₅₀)を示すマウスMCP-1の用量応答曲線を得た(図28)。この濃度を、シュピーゲルマーによるCa⁺⁺放出の阻害に関するさらなる実験に使用した。

【実施例6】

【0335】

走化性アッセイにおける阻害濃度の測定

上述されたとおり増殖させた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回洗浄しかつ3×10⁶細胞/mlで再懸濁した。この懸濁液100μlを、5μm孔をもつTransw

50

ell インサート (Corning、#3421) に添加した。下区画で、MCP-1 を $600\mu\text{l}$ の HBH 中の多様な濃度のシュピーゲルマーと一緒に、細胞の添加前に 37°C で 20 ないし 30 分間前インキュベートした。細胞を 37°C で 3 時間移動させた。その後インサートを取り出し、そしてリン酸緩衝生理食塩水中 $440\mu\text{M}$ レサズリン (Sigma) $60\mu\text{l}$ を下区画に添加した。 37°C で 2.5 時間のインキュベーション後に、Fluostar Optima 多検出プレートリーダー (BMG) にて 544nm の励起波長および 590nm の発光波長で蛍光を測定した。

【0336】

ヒト MCP-1 の半最大有効濃度 (EC_{50}) の測定

多様なヒト MCP-1 濃度への THP-1 細胞の 3 時間の移動後に、約 1nM の最大有効濃度およびより高濃度での低下された活性化を示すヒト MCP-1 の用量応答曲線を得た (図 14)。シュピーゲルマーによる走化性の阻害に関するさらなる実験に、 0.5nM の MCP-1 濃度を使用した。

【0337】

マウス MCP-1 の半最大有効濃度 (EC_{50}) の測定

多様なマウス MCP-1 濃度への THP-1 細胞の 3 時間の移動後に、約 $1\sim 3\text{nM}$ の最大有効濃度およびより高濃度での低下された活性化を示すマウス MCP-1 の用量応答曲線を得た (図 30)。シュピーゲルマーによる走化性の阻害に関するさらなる実験に、 0.5nM のマウス MCP-1 濃度を使用した。

【実施例 7】

【0338】

表面プラズモン共鳴測定による結合分析

7.1 NOX-E36、181-A2-018 および mNOX-E36 の特異性評価

Biacore 2000 装置 (Biacore AB、スウェーデン・ウプサラ) を使用して、ヒト MCP-1 および関係するタンパク質への核酸の結合を分析した。アミン基を介してカップリングを達成するべきであった場合に、該タンパク質を水に対し $1\sim 2$ 時間透析して (Millipore VSWP 混合セルロースエステル; 孔径 $0.025\mu\text{M}$) 妨害するアミンを除去した。Pioneer F1 若しくは CM4 センサーチップ (Biacore AB) を、 0.4M NHS および 0.1M EDC の $1:1$ 希釈の $5\mu\text{l}/\text{分}$ の流速での $35\mu\text{l}$ 注入により、タンパク質カップリング前に活性化した。ケモカインをその後、装置応答が $1000\sim 2000\text{RU}$ (相対単位) の範囲になるまで、 $2\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で $0.1\sim 1.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で注入した。未反応 NHS エステルは $35\mu\text{l}$ の塩酸エタノールアミン溶液 ($\text{pH} 8.5$) の $5\mu\text{l}/\text{分}$ の流速での注入により非活性化した。センサーチップを結合緩衝液で 2 回プライミングし、そしてベースラインが安定に見えるまで $1\sim 2$ 時間、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ で平衡化した。全部のタンパク質について、速度論的パラメータおよび解離定数を、選択緩衝液 (トリス-HCl、 20mM ; NaCl、 137mM ; KCl、 5mM ; CaCl_2 、 1mM ; MgCl_2 、 1mM ; Tween 20、 $0.1\% [w/v]$; $\text{pH} 7.4$) 中 1000 、 500 、 250 、 125 、 62.5 、 31.25 および 0nM の濃度の一連のシュピーゲルマーの注入により評価した。全実験において、分析は、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で 180 の会合時間および 360 秒の解離時間を定義する Kinject コマンドを使用して 37°C で実施した。データ解析および解離定数 (K_D) の計算は、ラングミュアの $1:1$ 化学量論的当てはめアルゴリズムを使用して BIAevaluation 3.0 ソフトウェア (BIACORE AB、スウェーデン・ウプサラ) を用いて行った。

【0339】

7.1.1 NOX-E36 および 181-A2-018 (ヒト MCP-1 特異的核酸)

ヒト MCP-1 についてのみ全部のセンサー図を描き (それぞれ図 17 および 20); 他のタンパク質については、明瞭さのため、 125nM のシュピーゲルマー濃度で得られたセンサー図のみ示す (図 18 / 19 および 21 / 22)。

【0340】

10

20

30

40

50

NOX - E 3 6 ・ h M C P - 1 の相互作用の分析：組換えヒトMCP - 1を、1 3 8 1 RU（相対単位）の装置応答が確立されるまで、製造元の推奨（アミンカップリング処置）に従って、Pioneer F 1センサーチップに固定した。ヒトMCP - 1へのNOX - E 3 6結合の測定された解離定数（ K_D ）は約8 9 0 p Mであった（図1 7）。

【0 3 4 1】

1 8 1 - A 2 - 0 1 8 ・ h M C P - 1 の相互作用の分析：組換えヒトMCP - 1を、3 1 1 1 RU（相対単位）の装置応答が確立されるまで、製造元の推奨（アミンカップリング処置）に従って、CM 4センサーチップに固定した。ヒトMCP - 1への1 8 1 - A 2 - 0 1 8結合の測定された解離定数（ K_D ）は約3 7 0 p Mであった（図2 0）。

【0 3 4 2】

NOX - E 3 6および1 8 1 - A 2 - 0 1 8の特異性を決定するため、多様なヒトMCP - 1ファミリータンパク質、ならびにヒトエオタキシンを、Pioneer F 1およびCM 4センサーチップに固定した（hMCP - 1、1 7 5 4 RU；hMCP - 2、1 5 5 8 RU；hMCP - 3、1 2 9 0 RU；エオタキシン、1 5 2 3 RU）。速度論的分析は、NOX - E 3 6が5 ~ 1 0 n Mの解離定数（ K_D ）でエオタキシンおよびhMCP - 2に結合することを示し；hMCP - 3は認識されなかった（図1 8および2 4 A）。1 8 1 - A 2 - 0 1 8は、対照的に、エオタキシン、hMCP - 2およびhMCP - 3を、しかしわずかにより低い親和性で結合する（1 0 ~ 2 0 n M；図2 1および2 4 A）。

【0 3 4 3】

NOX - E 3 6および1 8 1 - A 2 - 0 1 8の種間交差反応性を、Pioneer F 1およびCM 4センサーチップ上のヒト（1 4 6 0 RU）、サル（1 2 1 8 RU）、ブタ（1 4 2 8 RU）、イヌ（1 2 2 4 RU）、ウサギ（1 2 4 4 RU）、ラット（1 2 6 7 RU）およびマウス（1 3 6 1 RU）からのアミノカップリング固定したMCP - 1を使用して評価した。速度論的分析は、NOX - E 3 6が、0 . 8 9 ~ 1 . 2 n Mの比較可能な解離定数（ K_D ）でヒト、サル、ブタおよびイヌMCP - 1に結合する一方、マウス、ラットおよびウサギからのMCP - 1は認識されなかったことを示した（図1 9および2 4 A）。1 8 1 - A 2 - 0 1 8は、0 . 5 ~ 0 . 6 n Mの比較可能な解離定数（ K_D ）でヒトおよびサルMCP - 1に結合する一方、ブタ、ウサギおよびイヌMCP - 1ははるかにより低い親和性で結合される。ラットおよびマウスMCP - 1はNOX - A 2 - 0 1 8により認識されなかった（図2 2および2 4 A）。

【0 3 4 4】

多様な種からのMCP - 1タンパク質および緊密に関係するヒトタンパク質の配列、ならびにそれらの間の同一アミノ酸パーセントでの相同性の程度を図2 3に描き；NOX - E 3 6および1 8 1 - A 2 - 0 1 8の計算された K_D 値を表形式で図2 4 Aに表示する。

【0 3 4 5】

7 . 1 . 2 mNOX - E 3 6（マウスMCP - 1特異的核酸）

mNOX - E 3 6の結合挙動を解析するため、3 7 5 9 RUの合成ピオチニル化マウスD - MCP - 1（フローセル3）および3 3 2 6 RUのピオチニル化ヒトD - MCP - 1（フローセル4）を、それぞれストレプトアビジン結合したセンサーチップ（Biacore AB、独国フライブルク）に固定した。5 0 0、2 5 0、1 2 5、6 2 . 5、3 1 . 2 5および0 n MのmNOX - E 3 6アプタマー（D - RNA）溶液を、1 8 0秒の会合時間および3 6 0秒の解離時間を規定するKinjectコマンドを使用して注入した。フローセル1は緩衝液およびデキストランマトリックス対照（Biacore SAチップ表面）として使用した一方、フローセル2では、アプタマーの非特異的結合を測定するため非特異的D - ペプチドを固定した。図3 2は、2 0 0 ~ 3 0 0 p Mの計算された解離定数（ K_D ）を伴うマウスD - MCP - 1への結合のD - NOC - E 3 6のキネティックのセンサー図を示す。mNOX - E 3 6はヒトD - MCP - 1を結合せず（図3 3）；明瞭さのため、1 2 5 n Mのシュピーゲルマーで得られたセンサー図のみを示す。

【0 3 4 6】

7 . 2 NOX - E 3 6の選択性評価

10

20

30

40

50

NOX-E36の選択性を、ストレプトアビジン(SAチップ)に5'ビオチニル化NOX-E36を固定することにより表面プラズモン共鳴分析により評価した。フローセル(FC)1上の352RUのNOX-E36、およびFC2上の等量の5'末端ビオチニル化した非機能的対照シュビーゲルマー(POC)を、ストレプトアビジン/ビオチン結合により固定した。FC3を、デキストラン-SAセンサー表面への非特異的結合を測定するための表面对照として使用した。

【0347】

全4サブグループ(CC、CCX、CCX₃CおよびXC)からの100nMのヒトケモカインの一群を360秒間注入し、そして複合体を10μl/分の流速および37で360秒間解離させた。会合後(応答1;相互作用の程度)および解離後(応答2:相互作用の親和性)の応答単位をプロットした。各注入後に、チップ表面を240秒の0.1%

Tweenを含む1M塩化ナトリウムで再生し;固定したシュビーゲルマーをその後、生理学的条件(泳動緩衝液)で2分間再フォールディングさせた。各ケモカインの注入を3回反復した。CCCL1、CCCL2、CCCL6およびCCCL9は、リボ核酸およびチップデキストラン表面への非特異的結合を示した。固定したNOX-E36への特異的高親和性結合は、CCCL2/MCP-1、CCCL8/MCP-2、CCCL11/エオタキシン、CCCL3/MIP1 およびCCCL7/NAP-2についてのみ検出し得た(図24B)。MCP-2およびエオタキシンがNOX-E36により結合されるという知見は、62および70%のこれらのケモカインとMCP-1の間の比較的高い相同性により驚くべきでなく、期待されなかった陽性、CCCL3/MIP-1 およびCCCL7/NAP-2について、機能障害の*in vitro*試験はそれぞれ実施されたか若しくは現在確立されつつある。

【0348】

最後に、NOX-E36およびCCCL2/MCP-1、CCCL8/MCP-2、CCCL11/エオタキシン、CCCL3/MIP1、CCCL7/NAP-2、CCCL7/MCP-3およびCCCL13/MCP-4の間の相互作用の速度論的パラメータを「反転」系で測定した。ここで、ケモカインを固定し、そして遊離NOX-E36を注入した(詳細なプロトコルについては7.1を参照されたい)。速度論的データを図24Cに要約する。

【0349】

7.3 *in vitro*での抗MIP-1 機能性の評価

Biacore測定はMIP-1 とのNOX-E36の交差反応性を示した。機能的な細胞培養物に基づく*in vitro*アッセイを使用することにより、MIP-1 へのNOX-E36の単なるBiacore結合もまた機能性、例えば拮抗作用に変わるかどうかを確認すべきである。

【0350】

これを達成するため、MIP-1 により刺激され得るTHP-1細胞を用いる走化性実験を実施した。上述されたとおり増殖させた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、そして 3×10^6 細胞/mlで再懸濁した。この懸濁液100μlを、5μm孔をもつTranswellインサート(Corning、#3421)に添加した。下区画中で、MIP-1 を600μlのHBH中の多様な濃度のシュビーゲルマーと一緒に、細胞の添加前に37で20ないし30分間前インキュベートした。細胞を37で3時間移動させた。その後、インサートを取り出し、そしてリン酸緩衝生理的食塩水中440μMレサズリン(Sigma)60μlを下区画に添加した。37で2.5時間のインキュベーション後に、Fluostar Optima多検出プレートリーダー(BMG)で544nmの励起波長および590nmの発光波長にて蛍光を測定した。

【0351】

多様なヒトMIP-1 濃度へのTHP-1細胞の3時間の移動後に、約1nMの半最大有効濃度およびより高濃度での低下された活性化を示すヒトMIP-1 の用量応答曲

10

20

30

40

50

線を得た(図24D)。シュピーゲルマーによる走化性の阻害に関するさらなる実験に、0.5 nMのMIP-1濃度を使用した。

【0352】

NOX-E36による走化性阻害の測定のための実験を、0.5 nMのMIP-1の刺激を用いて実施した。NOX-E36が、1 μM MIP-1の最高の試験した濃度まで、MIP-1誘発性の走化性を阻害しないことを明瞭に示し得た。陽性対照として、刺激としてのMCP-1伴うそれぞれの実験を同時に実施した(図24E)。

【実施例8】

【0353】

抗mMCP-1シュピーゲルマーでのMRL^{lpr/lpr}マウスにおける狼瘡様疾患の治療

10

炎症前メディエーターを阻害することは慢性炎症の処置のための成功裏の一アプローチとなっている(Steinman 2004)。TNFおよびインターロイキンに加え、C-ケモカインは炎症の部位への血管内空隙からの白血球動員を媒介するため、CC-ケモカインは特定の拮抗作用の重要な候補である(Baggiolini 1998、Luster 2005)。MCP-1(=CCL2)およびそのそれぞれのケモカイン受容体CCR2が全身性エリテマトーデスの臨床症状発現のような自己免疫性組織傷害で決定的な役割を演じているという非常に強力な証拠が存在する(GerardとRollins 2001)。例えば、Ccl2若しくはCcr2いずれかの遺伝子について欠損のMRL^{lpr/lpr}マウスは狼瘡様自己免疫から保護される(Perez de Lem 2005、Tesch 1999)。これゆえに、CCL2/CCR2系は例えばループス腎炎の有望な治療標的を表しうる。事実、遅延された遺伝子治療若しくはトランスフェクトした細胞の移入(双方ともNH₂切断型MCP-1のin situ産生をもたらす)は、MRL^{lpr/lpr}マウスにおける自己免疫性組織傷害を顕著に低下させた。しかしながら、こうした実験的アプローチは、抑制不可能なアンタゴニスト産生および腫瘍形成のためヒトで使用し得ない(Hasegawa 2003、Shimizu 2004)。従って、in vivoで好都合な薬物動態プロファイルをもつ新規CCL2アンタゴニストを開発することが必要なままである。本実施例において、抗mCCL2シュピーゲルマーmNOX-E36若しくはmNOX-E36-3'PEGでのマウスCCL2の阻害が、全身性エリテマトーデスのループス腎炎および他の疾患症状発現の処置に適しているとみられることが示される。mCCL2シュピーゲルマー治療の後期の開始は、治療的CCL2/CCR2阻害と関連するいかなる以前の問題にも依存せず、MRL^{lpr/lpr}マウスにおけるループス腎炎、自己免疫性気管支周囲炎および狼瘡様皮膚疾患を効果的に改善する。

20

30

【0354】

動物および実験プロトコル

10週齢雌性MRL^{lpr/lpr}マウスはHarlan Winkelmann(独国ボルヒェン)から得、そして12時間の明および暗周期での通常の収容条件で飼育した。水および標準的飼料(Ssniff、独国ゾースト)は任意に利用可能であった。14週齢時に、12マウスの群が、後に続くところの5%ブドウ糖中のシュピーゲルマーの皮下注入(注入容量4 ml/kg)を週あたり3回受領した:mNOX-E36、1.5 μmol/kg;mNOX-E36-3'PEG、0.9 μmol/kg;非機能的対照シュピーゲルマーPoC(5'-UAGGAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGUGCAGAGCU-3')、1.9 μmol/kg;PoC-PEG、0.9 μmol/kg;ベヒクル(5%ブドウ糖)。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEGの血漿濃度を、それぞれ注入3若しくは24時間後に後眼窩洞から週1回採取する血液サンプルから測定した。血漿サンプル中のシュピーゲルマー濃度は実施例8に記述されるところのサンドイッチハイブリダイゼーション法の変法により測定した。マウスは24週齢の終了時に頸部脱臼により殺した。

40

【0355】

50

全身性狼瘡の評価

皮膚病変を半定量的スコア (Schwartz 2005) により記録した。体重に対する脾および巨大な腸間膜リンパ節の重量比を、狼瘡関連リンパ球増殖症候群のマーカーとして計算した。血液および尿サンプルを各動物から試験期間の終了時に吸入エーテルを用いる全身麻酔下に後眼窩静脈叢からの出血により収集した。血液および尿サンプルを試験の終了時に各動物から収集し、そして尿アルブミン/クレアチニン比および血清 dsDNA 自己抗体 IgG アイソタイプ力価を前述された (Pawar 2006) とおり測定した。糸球体濾過速度 (GFR) を、単一ボラス注入 5、10、15、20、35、60 および 90 分後の血漿 FITC-イヌリン (Sigma-Aldrich、独国シュタインハイム) のクリアランスキネティクス (Qi 2004) により、24 週に測定した。蛍光を 485 nm の励起および 535 nm の発光での読取りで測定した。GFR は、非直線回帰曲線当てはめソフトウェア (GraphPad Prism、GraphPad Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用する 2 コンパートメントモデルに基づき計算した。血清サイトカイン濃度は、IL-6、IL-12p40 (OptEIA、BD Pharmingen) および IFN- γ (PBL Biomedical Labs、米国) のための商業的 ELISA を使用して測定した。全マウスから、腎および肺を 10% 緩衝ホルマリン中で固定し、加工しかつパラフィンに包埋した。銀および過ヨウ素酸シッフ染色のための 5 μ m 切片を慣例のプロトコル (Anders 2002) に従って調製した。腎病変の重症度を、ヒトループス腎炎について記述されたところの活動性および慢性性についての指標 (Austin 1984) を使用して等級付けし、また、腎間質傷害の形態計測を前述された (Anders 2002) とおり実施した。気管支周囲の炎症の重症度は 0 ~ 4 から半定量的に等級付けした。免疫染色のため、ホルマリン固定しかつパラフィン包埋した組織の切片を脱蠟しかつ再水和した。内因性ペルオキシダーゼを 3% 過酸化水素により阻害し、そして抗原の回収をオートクレーブオープン中で抗原回収溶液 (Vector、カリフォルニア州バーリングゲーム) 中で実施した。アビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector) を使用してビオチンをブロッキングした。スライドを一次抗体と 1 時間、次いでビオチニル化二次抗体 (抗ラット IgG、Vector) および ABC 試薬 (Vector) とインキュベートした。スライドはインキュベーション段階の間にリン酸緩衝生理的食塩水で洗浄した。金属増強を伴う 3'3' ジアミノベンジジン (DAB、Sigma、独国タウフキルヒェン) を検出系として使用して、黒色生成物をもたらした。メチルグリーンを対染色として使用し、スライドを脱水しかつ Histomount (Zymed Laboratories、カリフォルニア州サンフランシスコ) にマウントした。以下の一次抗体を使用した：ラット抗 Mac2 (マクロファージ、Cederlane、カナダ・オンタリオ州、50 倍)、抗マウス CD3 (100 倍、クローン 500A2、BD)、抗マウス IgG₁ (100 倍、M32015、Caltag Laboratories、米国カリフォルニア州バーリングゲーム)、抗マウス IgG_{2a} (100 倍、M32215、Caltag)、抗マウス C3 (200 倍、GAM/C3c/FITC、Nordic Immunological Laboratories、オランダ・ティルブルク)。陰性対照はそれぞれのアイソタイプ抗体とのインキュベーションを包含した。定量分析のため、糸球体細胞を切片あたり 15 個の皮質糸球体中で計数した。糸球体 Ig および C3c 沈着物を 15 個の皮質糸球体切片で 0 ~ 3 から評価した。

【0356】

RNA 調製およびリアルタイム定量的 (TaqMan) RT-PCR

各マウスからの腎組織を液体窒素中で急速凍結しかつ -80 °C で保存した。各動物について、全腎 RNA 調製および逆転写は記述された (Anders 2002) とおり実施した。プライマーおよびプローブは PE Biosystems、独国ヴァイターシュタットからであった。Cc12、Cc15 および 18S rRNA の検出に使用される使用したプライマー (300 nM)、PE Biosystems からの予め開発された TaqMan アッセイ試薬。

【0357】

フローサイトメトリー

全血および骨髓サンプルを試験終了時に全群のマウスから得た。フローサイトメトリーはFACS caliber 器械および以前に特徴付けされたMC21抗mCCR2抗体(Mack 2001)を使用して実施した。ビオチニル化抗ラットIgG抗体(BD Biosciences)を検出に使用した。ラットIgG_{2b}(BD Biosciences)をアイソタイプ対照として使用した。

【0358】

統計学的解析

データは平均±平均の標準誤差(SEM)として表した。群間の比較は一変量ANOVAを使用して実施した。事後Bonferroni補正を多重比較に使用した。 $p < 0.05$ という値を統計学的有意性を示すために考慮した。

10

【0359】

サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ

サンプル中のシュピーゲルマーの量を、Droletら 2000(Pharm Res 17:1503)により記述されたところのアッセイに基づくサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにより定量した。血液サンプルを、NOX-E36の血漿クリアランスを追跡するために同時に収集した。選択した組織を、シュピーゲルマー濃度を測定するため調製した。

20

【0360】

ハイブリダイゼーションプレート調製

シュピーゲルマー-mNOX-E36を、検証されていないサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイを使用して定量した。簡潔には、mNOX-E36捕捉プローブ(配列番号281)を、0.5Mリン酸ナトリウム、1mM EDTA、pH8.5中0.75mMで白色DNA-BIND 96ウェルプレート(Corning Costar、独国ヴィースバーデン)に4で一夜固定した。ウェルを2回洗浄し、そして0.25Mリン酸ナトリウム、1mM EDTA、pH8.5中0.5%w/v BSAで37で3時間ブロッキングし、再度洗浄しかつ使用まで4で保存した。ハイブリダイゼーション前にウェルを37に前加温し、そして前加温した洗浄緩衝液(3×SSC、0.5%[w/v]ドデシルサルコシンナトリウム、pH7.0;事前にラウロイルサルコシンナトリウムを含まずに20×ストック[3M NaCl、0.3M Na₃クエン酸]を調製し、そして相応して希釈する)で2回洗浄した。

30

【0361】

サンプル調製

全サンプルは2検体でアッセイした。血漿サンプルを氷上で融解し、ボルテックス攪拌しかつ冷却した卓上遠心機で短時間回転した。組織ホモジェネートをRTで融解し、そして最大速度かつRTで5分遠心分離した。5μlのみの各サンプルをアッセイのため取り出し、そしてその後保存のため冷凍庫に戻した。サンプルは、以下のスキームに従い、RTでハイブリダイゼーション緩衝液(洗浄緩衝液中8nM mNOX-E36検出プローブ[配列番号282])で希釈した:

40

30倍 5μlサンプル+145μlハイブリダイゼーション緩衝液
 300倍 20μlの30倍+180μlハイブリダイゼーション緩衝液
 3000倍 20μlの300倍+180μlハイブリダイゼーション緩衝液
 30000倍 20μlの3000倍+180μlハイブリダイゼーション緩衝液

【0362】

全サンプル希釈をアッセイした。mNOX-E36標準は0~4nM範囲にわたる8点較正曲線に連続希釈した。QCサンプルは調製およびアッセイしなかった。較正標準は試験内(in-study)サンプルのものに同一であった。

【0363】

ハイブリダイゼーションおよび検出

50

サンプルを95℃で10分間加熱しそして37℃に冷却した。シュピーゲルマーノ検出プローブ複合体を、固定した捕捉プローブに37℃で30分間アニーリングした。未結合のシュピーゲルマーは、洗浄緩衝液および1×TBS-T(20mMトリス-C1、137mM NaCl、0.1% Tween 20、pH7.5)でそれぞれ2回洗浄することにより除去した。ハイブリダイズした複合体を、1×TBS-T中5000倍希釈したストレプトアビジナルカリホスファターゼにより室温で1時間検出した。未結合の複合物を除去するため、ウェルを再度1×TBS-Tおよび20mMトリス-C1、1mM MgCl₂、pH9.8(各2回)で洗浄した。ウェルを最後に100mLのCSDP基質(Applied Biosystems、独国ダルムシュタット)で満たし、そして室温で45分間インキュベートした。化学発光をFLUOstar Optimaマイクロプレートリーダー(BMG Lab technologies、独国オッフエンブルク)で測定した。

【0364】

データ解析

以下のアッセイしたサンプル希釈を定量的データ解析に使用した：

ラットEDTA血漿 2000倍

【0365】

ベヒクル群(シュピーゲルマーを投与しなかった)から得たデータをバックグラウンドシグナルとして差し引いた。

【0366】

本明細書に記述されるところのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは、シュピーゲルマーNOX-36、NOX-E36-5'-PEGおよびNOX-E36-3'-PEGにもまた類似の様式で作用し、それによりそれぞれのNOX-E36捕捉プローブ(配列番号255)およびそれぞれのNOX-E36検出プローブ(配列番号256)を使用しなければならない(データは示されない)。

【0367】

結果

mNOX-E36-3'-PEGはMRL^{1pr/1pr}マウスの生存および腎疾患を改善する

雌性MRL^{1pr/1pr}マウスは、ヒトでのびまん性増殖性ループス腎炎に対する著しい類似性を伴う増殖性免疫複合体型系球体腎炎を発症しかつその後それで死亡する。本治療試験デザインでは、処置されるMRL^{1pr/1pr}マウスを、PEG化および未PEG化抗mCCl₂シュピーゲルマー、PEG化および未PEG化対照(「PoC」)シュピーゲルマー若しくはベヒクルで14から24週齢まで処置した。この時点で、ベヒクル、PoC若しくはPoC-PEG処置したMRL^{1pr/1pr}マウスは、系球体マクロファージ浸潤、ならびに系球体および間質Mac2陽性マクロファージならびに間質CD3陽性リンパ球よりなる混合型系球体周囲および間質炎症細胞浸潤を特徴とするびまん性増殖性系球体腎炎を示した(図34および35)。mNOX-E36-3'-PEGは、ループス腎炎の活動性および慢性性指標、ならびに腎の炎症の前述のマーカーを改善した(図35)。未PEG化分子mNOX-E36は慢性性指標ならびに間質マクロファージおよびT細胞数に対しより少なく効果的であった(図35)。進行した慢性腎疾患が、ベヒクル、PoCおよびPoC-PEG処置マウスでの尿細管萎縮および間質線維症の集密領域によりさらに具体的に説明された(図34)。これらの変化を定量化するための形態計測を応用して、PEG化および未PEG化mNOX-E36が、間質容量、尿細管細胞損傷および尿細管拡張(全部慢性腎疾患の重症度および予後のマーカーである)を低下させたことが見出された(図36)。mNOX-E36-3'-PEGは50%死亡率を改善したがしかし未PEG化mNOX-E36はしなかった(図37)。従って、mNOX-E36-3'-PEGは、MRL^{1pr/1pr}マウスの腎マクロファージおよびT細胞浸潤の数を低下させかつループス腎炎および(腎)生存を改善し得る。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'-PEGでの処置がMRL^{1pr/1pr}マウスでの腎内炎症

10

20

30

40

50

に影響を及ぼすかどうか研究するため、リアルタイムRT-PCRを実施して、腎疾患の進行の間にMRL^{lpr/lpr}マウスの腎において漸進性に上方制御されることが以前に示された(Perez de Lema 2001)炎症前ケモカインCCL2およびCCL5の発現レベルを評価した。14から24週齢までのmNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEGでの処置は、ベヒクル処置した対照に比較してCCL2およびCCL5 mRNAの腎発現を低下させた(図38)。

【0368】

抗CCL2シュピーゲルマーはMRL^{lpr/lpr}マウスにおける腎外自己免疫性組織傷害を低下させる

皮膚および肺もまたMRL^{lpr/lpr}マウスにおける自己免疫性組織傷害から一般に影響を受ける。ベヒクル処置したマウスにおいて、自己免疫性肺疾患は、中程度の細気管支周囲および血管周囲炎症細胞浸潤を特徴とし、また、皮膚病変がマウスの60%で観察された(図39、40および35)。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEG双方は、それぞれベヒクル、PoCおよびPoC-PEG処置したMRL^{lpr/lpr}マウスに比較して気管支周囲の炎症および皮膚疾患を低下させた(図39、40および35)。これゆえに、CCL2特異的シュピーゲルマーの効果はループス腎炎に制限されず、しかしMRL^{lpr/lpr}マウスにおける自己免疫性組織傷害の他の症状発現に及ぶ。

【0369】

MRL^{lpr/lpr}マウスにおけるmNOX-E36およびリンパ球増殖症候群、dsDNA自己抗体ならびに血清サイトカイン濃度

雌性MRL^{lpr/lpr}マウスは、大規模な脾腫大ならびに巨大な頸部、液窩、鼠径部および腸間膜リンパ節を特徴とするリンパ球増殖症候群を発症する。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEG双方は、MRL^{lpr/lpr}マウスの脾およびリンパ節の重量に対し影響を有しなかった(図41)。MRL^{lpr/lpr}マウスでの自己免疫は、dsDNAを包含する複数の核抗原に対する自己抗体の産生を特徴とする。24週齢MRL^{lpr/lpr}マウスでは、血清dsDNA IgG、IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}自己抗体が高レベルで存在した。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEG双方はこれらのDNA自己抗体のいずれに対しても影響を有しなかった(図41)。ベヒクル処置したMRL^{lpr/lpr}マウスでの狼瘡様疾患は、IFN-、IL-12p40およびIL-6の上昇された血清濃度を特徴とした。mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEG双方はこれらの炎症メディエーターのいずれに対しても影響を有しなかった(図41)。従って、双方のmNOX-E36バリエーションは、MRL^{lpr/lpr}マウスにおけるリンパ球増殖、抗dsDNA IgG産生および血清サイトカイン濃度に影響を及ぼさない。

【0370】

MRL^{lpr/lpr}マウスでのmNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEGの血漿濃度

mNOX-E36およびmNOX-E36-3'PEG血漿濃度を、MRL^{lpr/lpr}マウスの進行性腎疾患の間の薬物曝露をモニターするために、週間隔で測定した。注入3時間後のmNOX-E36および注入24時間後のmNOX-E36-3'PEGの血漿濃度中央値は試験を通じてそれぞれおよそ300 nMおよび1 μMであった(図42)。従って、PEG化はmNOX-E36の血漿濃度を増大させ、そして、MRL^{lpr/lpr}マウスの進行性腎疾患は双方のシュピーゲルマーの薬物動態を調節しなかった。

【0371】

mNOX-E36-3'PEGは骨髄からの単球の移動を阻害する

細菌感染の間の骨髄からの単球移動は、ケモカイン受容体CCRを関与させることが示された(Serbina 2006)が、しかし、自己免疫の状況でのCCL2の役割は仮説のままである。従って、24週齢MRL^{lpr/lpr}マウスのmNOX-E36-3'PEGおよびベヒクル処置群のマウスでの末梢血および骨髄のCCR2陽性単球集団

を検査した。mNOX-E36-3'PEGでの処置は骨髓中のCCR2陽性細胞の割合を13%から26%に増加させた一方、それは末梢血中のこの集団を26%から11%に減少させた(図43)。これらのデータは、MRL^{lpr/lpr}マウスの自己免疫疾患の間の骨髓からのCCR2陽性細胞の忌避のためのCCL2の役割を裏付ける。

【0372】

要約

シュピーゲルマー技術を応用して、mCCL2を*in vitro*および*in vivo*で強力に阻害する新規かつ特異的mCCL2アンタゴニストを創製した。事実、CCL2シュピーゲルマーでの処置の晩期の開始はMRL^{lpr/lpr}マウスにおける進行した狼瘡様自己免疫性組織傷害を顕著に改善した。これらのデータは、慢性炎症性組織損傷におけるCCL2の中心的役割を裏付け、かつ、CCL2シュピーゲルマーを自己免疫性組織傷害の新規治療薬と同定する。

10

【実施例9】

【0373】

抗mMCP-1シュピーゲルマーを用いる一側腎摘出糖尿病マウスにおける糖尿病性腎症の治療

糖尿病性腎症は、アンジオテンシン依存性の発症機序を標的とすることが疾患の進行を常に予防するわけでないため、末期腎疾患の第一位の原因のままである(Zimmer 2001; Ritz 1999; United States Renal Data System 2004; Svensson 2003)。これゆえに、他の処置戦略が、糖尿病性腎症の治療的装備に追加するために必要とされる。

20

【0374】

最近の実験的研究からのデータは糖尿病性腎症の腎内炎症への進行に関する(Galkina 2006; Mora 2005; Meyer 2003; Tuttle 2005)。例えば、ミコフェノール酸モフェチル、メトトレキサート若しくは照射は、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病性腎症を伴うラットで尿アルブミン排泄および糸球体硬化を低下させる(Yozai 2005; Utimura 2003)。それでもなお、糖尿病性腎症における腎内炎症の分子および細胞機序は乏しく特徴付けられているままである。糖尿病性腎症を伴う患者は、炎症の急性期マーカーの上昇された血清濃度を有するが、しかしこれは腎内炎症を表さないことがある(Dalla Vestra 2005; Navarro 2003)。糖尿病性腎症を伴う患者は、腎内炎症により特異的でありうる、高レベルのCC-ケモカイン、単球走化性タンパク質1(MCP-1/CCL2)を尿中に排泄する(Morii 2003; Tashiro 2002; Takebayashi 2006)。事実、MCP-1/CCL2は、高ブドウ糖濃度若しくは進行した糖化最終生成物のいずれかに曝露されたヒトメサングウム細胞により発現される(Ihm 1998; Yamagishi 2002)。CCL2は血管内から血管外区画すなわち糸球体および腎間質への白血球動員の複雑な多段階過程に関与している(Baggiolini 1998)。事実、マクロファージ浸潤は、ヒトならびに実験的糖尿病性糸球体硬化および尿管間質傷害における一般的所見である(Bohle 1991; Furuta 1993; Chow 2007)。Ccl2欠損の1型若しくは2型糖尿病マウスは、より少ない糸球体傷害を伴うより低い糸球体マクロファージ数を有する(Chow 2004; Chow 2006)。これらの研究で、1型および2型糖尿病性腎症の糸球体の病理学のCCL2の機能的役割もまた示された。これゆえに、CCL2は糖尿病性腎症の潜在的治療標的を表すとみられ、そして好都合な薬物動態プロファイルをもつ適するCCL2アンタゴニストがこの疾患の状況で検証されるべきである。本実施例において、われわれは進行した糖尿病性腎症を伴う2型糖尿病db/dbマウスにおけるPEG化抗CCL2シュピーゲルマー-mNOX-E36-3'PEGの効果を経験する。われわれは、抗CCL2シュピーゲルマーが糖尿病性腎症の処置に適しているとみられることを示した。

30

40

【0375】

50

動物および実験プロトコル

雄性の5週齢C57BLKS db/db若しくはC57BLKS野生型マウスはTaconic (デンマーク・リユー) から得、そして、試験の期間、12時間の暗/明周期ならびに食餌および水への制限されない到達を伴いフィルタートップケージに収容した。ケージ、敷きわら、巣(nestlet)、食餌および水は使用前にオートクレーブ処理により滅菌した。6週齢で、一腎摘出(「1K」マウス)若しくは擬似手術(「2K」マウス)を、db/dbおよび野生型マウスで、前述された(Bower 1980)とおり、1cmの脇腹切開により実施した。擬似手術群のマウスでは腎はin situに残した。10週後すなわち4月齢時に、1K db/dbマウスを、5%ブドウ糖中mNOX-E36-3'PEG若しくはPoC-PEG(用量0.9 μmol/kg; 注入容量1 ml/kg)いずれかの皮下注入を週あたり3回受領した2群に分割した。処置を8週間(6月齢まで)継続し、その時に動物を殺し、そして組織病理学的評価のため組織を得た。全実験手順は地域の政府当局により承認されていた。

【0376】

糖尿病性腎症の評価

全部の免疫組織学的研究は記述された(Anders 2002)とおりパラフィン包埋切片で実施した。以下の抗体を一次抗体として使用した: ラット抗Mac2(糸球体マクロファージ、Cederlane、カナダ・オンタリオ州、50倍)、抗Ki-67(細胞増殖、Dianova、独国ハンプルク、25倍)。組織病理学的評価のため、各マウスから腎の一部をリン酸緩衝生理食塩水中10%ホルマリン中で固定しかつパラフィンに包埋した。3 μm切片を、供給元(Bio-Optica、イタリア・ミラノ)の説明書に従って過ヨウ素酸シッフ試薬若しくは銀で染色した。糸球体硬化性病変は、後に続くところの盲検化した観察者による半定量的スコアを使用して評価した。すなわち、それぞれ0 = 病変なし、1 = < 25%硬化性、2 = 25 ~ 49%硬化性、3 = 50 ~ 74%硬化性、4 = 75 ~ 100%硬化性。15個の糸球体を切片あたり分析した。間質容量および尿細管拡張の指標は、前述された(Anders 2002)ところの10個の重ならない皮質野に100点の格子を重ね合わせるにより決定した。間質細胞数は、盲検化した観察者により15個の高倍率野(hpf、400倍)で測定された。RNA調製およびリアルタイム定量的(TaqMan)RT-PCRは脱パラフィンした糸球体から行った。溶解緩衝液(10 mM トリス-HCl、0.1 mM EDTA、2% SDSおよび20 μg/ml プロテイナーゼK)中60 °Cで16時間のインキュベーション後に、フェノール-クロロホルムに基づくRNA抽出を実施した。糸球体RNAを10 μlのRNAアーゼを含まない水に溶解した。全臓器および糸球体RNAからの逆転写およびリアルタイムRT-PCRを、記述された(Anders 2002、Cohen 2002)とおり実施した。ddH₂Oよりなる対照は標的およびハウスキーパー遺伝子について陰性であった。mCcl2、Gapdhおよび18S rRNAのオリゴヌクレオチドプライマー(300 nM)およびプローブ(100 nM)は、PEからの予め開発されたTaqManアッセイ試薬であった。プライマーおよびプローブはABI Biosystems、独国ヴァイターシュタットからであった。糸球体濾過速度(GFR)は、単一ボーラス注入の5、10、15、20、35、60および90分後の血漿FITC-イヌリン(Sigma-Aldrich、独国シュタインハイム)のクリアランスキネティクスにより測定した(Qi 2004)。蛍光は485 nmの励起および535 nmの発光での読取りで測定した。GFRは、非直線回帰曲線当てはめソフトウェア(GraphPad Prism、GraphPad Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ)を使用する2コンパートメントモデルに基づき計算した。全データは平均 ± SEMとして提示する。群の比較はANOVAを使用して実施し、そして事後Bonferroni補正を多重比較に使用した。p < 0.05という値を統計学的有意性を示すために考慮した。

【0377】

結果

10

20

30

40

50

mNOX-E36-3'PEGは、一側腎摘出db/dbマウスで糸球体マクロファージ数および全体的糸球体硬化を低下させる。

【0378】

機能的CCL2の欠如がdb/dbマウスでの減少した糸球体マクロファージ動員と関連し(Chow 2007)、また、mNOX-E36-3'PEGがin vitroおよびin vivoでCCL2媒介性のマクロファージ動員を阻害することが可能である場合、mNOX-E36-3'PEGは進行した2型糖尿病性腎症を伴うdb/dbマウスでの腎マクロファージ動員を損なうはずである。この仮説を試験するため、われわれは、一側腎摘出(「1K」)db/dbマウスで4月齢時点でmNOX-E36-3'PEG若しくはPoC-PEGでの皮下注入を開始した。処置は8週間継続し、その時に組織を糖尿病性腎症の評価のため収集した。その期間の間、mNOX-E36-3'PEG処置は、白血球若しくは血小板数、血糖値若しくは体重(非糖尿病性BLKSマウスと比較してdb/dbマウスの全群で双方とも顕著に増加した)に有意に影響を及ぼさなかった(データは示されない)。興味深いことに、mNOX-E36-3'PEGは1K db/dbマウスでCCL2の血清濃度を増大させ、CCL2アンタゴニストが循環中でCCL2を保持することを示した(図44)。われわれの仮説と一致して、mNOX-E36-3'PEGは、mNOX-E36-3'PEG処置したdb/dbマウスで糸球体内のKi-67陽性増殖細胞のより低い数を伴い、PoC-PEG若しくはベヒクル処置したdb/dbマウスと比較して、糸球体マクロファージ数を40%有意に低下させた(図45)。これらの知見は、1K db/dbマウスでの全体的糖尿病性糸球体硬化の有意の改善を伴った(図46)。事実、mNOX-E36-3'PEG処置は、1K db/dbマウスでの糖尿病性糸球体硬化を、齢をマッチさせた非腎摘出(「2K」)db/dbマウスに存在する糸球体硬化の程度まで低下させた(図46)。これらの知見は、mNOX-E36-3'PEGでのCCL2依存性糸球体マクロファージ動員の遅延された阻害が、2型糖尿病db/dbマウスで全体的な糖尿病性糸球体硬化を予防することを示す。

【0379】

mNOX-E36-3'PEGは1K db/dbマウスでGFRを改善する

1K db/dbマウスでの糖尿病性糸球体硬化に対するmNOX-E36-3'PEG処置の有益な効果は、より良好なGFRを伴うはずである。われわれは、db/dbマウスでGFRのマーカーとしてFITC-イヌリンのクリアランスキネティクスを分析した(Qi 2004)。db/dbマウスでの約250ml/分の通常のGFR(Qi 2004)に比較して、われわれは、PoC-PEGを注入した6月齢1K db/dbマウスで112±23ml/分であったの低下されたGFRを見出した(図47)。mNOX-E36-3'PEG処置は、GFRを1K db/dbマウスで231±30ml/分まで有意に改善し(p<0.001)、CCL2依存性の糸球体マクロファージ動員を阻害することが2型糖尿病マウスで腎機能もまた改善し得ることを示唆した。

【0380】

mNOX-E36-3'PEGは、1K db/dbマウスで間質マクロファージ数および尿細管間質傷害を低下させる

ヒトでの進行した糖尿病性腎症は有意の数の間質マクロファージおよび尿細管間質傷害を伴う(Bohle 1991)。2K db/dbマウスでは、間質マクロファージ浸潤および有意の尿細管間質傷害は8月齢前に起こらない(Chow 2007)。早期一側腎摘出はdb/dbマウスで尿細管間質の病状の発症を加速し(Ninichuk 2005)、従って、われわれは、間質マクロファージ、尿細管拡張および間質容量を6月齢の全群のマウスで尿細管間質損傷のマーカーとして定量化した。この時点で、1K db/dbマウスは、2K db/dbマウスと比較して、増大した数の間質マクロファージ、ならびに尿細管拡張および間質容量の有意の上昇を示した(図45、図48)。mNOX-E36-3'PEG処置は、1K db/dbマウスにおいて、間質マクロファージの数を53%、ならびに尿細管拡張および間質容量を低下させた(図45、図48)。従

って、CCL2 依存性の腎マクロファージ動員を阻害することは、2 型糖尿病 db / db マウスにおける尿細管間質傷害もまた予防する。

【0381】

mNOX - E36 - 3' PEG は 1K db / db マウスでの Ccl2 の腎発現を低下させる

マクロファージ浸潤は組織傷害における炎症反応、例えば局所 CCL2 発現を増幅する。われわれは従って、腎マクロファージの mNOX - E36 - 3' PEG 関連の減少が、より少ない腎 CCL2 発現と関連するであろうと仮説を立てた。われわれはリアルタイム RT - PCR を使用して db / db マウスでの CCL2 の mRNA 発現を定量した。mNOX - E36 - 3' PEG は、齢をマッチさせた Poc - PEG 処置マウスと比較して、6 月齢 1K db / db マウスの腎での CCL2 の mRNA レベルを低下させた (図 49)。CCL2 の空間的発現をさらに評価するため、われわれは腎切片での CCL2 タンパク質の免疫染色を実施した。1K db / db マウスにおいて、CCL2 の発現は、2K db / db 若しくは 2K 野生型マウスと比較して、糸球体、尿細管および間質細胞中で顕著に高められた (図 50)。mNOX - E36 - 3' PEG は、ベヒクル若しくは Poc - PEG 処置した 1K db / db マウスに比較して、全部のこれらの区画での CCL2 の染色を顕著に低下させた。これらのデータは、mNOX - E36 - 3' PEG で CCL2 依存性の腎マクロファージ動員を阻害することが、1K db / db マウスでの CCL2 の局所発現を低下させることを示す。

【0382】

要約

ヒト糖尿病性腎症の進行に炎症が寄与するという概念はますます受け入れられるようになり (Tuttle 2005)、この疾患を処置するための潜在的標的として MCP - 1 / CCL2 に焦点を合わせた。本実施例にて、われわれは、一側腎摘出糖尿病マウスの mNOX - E36 - 3' PEG での処置が、より少ない増殖糸球体細胞を伴い、6 月齢で糸球体 (および間質) マクロファージの数を低下させたことを示した。加えて、CCL2 mRNA の腎 / 糸球体発現が mNOX - E36 - 3' PEG 処置で顕著に低下された。さらに、治療群におけるより少数の糸球体マクロファージおよび糸球体増殖細胞は、全体的な糸球体硬化からの保護および糸球体濾過速度の有意の改善を伴った。糖尿病マウスでの糸球体の病状および腎機能に対する mNOX - E36 - 3' PEG の有益な効果は、糸球体傷害の他のモデルで他の CCL2 アンタゴニストを使用した研究 (Lloyd 1997、Hasegawa 2003、Tang 1996、Wenzel 1997、Fujinaka 1997、Schneider 1999) と矛盾しない。意外にも、CCL2 阻害の遅延された開始は、1K db / db マウスでより少ない尿細管間質の病状を伴い、間質マクロファージ数もまた低下させた。

【0383】

一緒に、これらのデータは、CCL2 を糖尿病性腎症の有望な治療標的として検証し、そして、シュピーゲルマーでの CCL2 阻害を開始することが、疾患の進行した状態でさえなお保護的でありうることを示唆する。

【0384】

参考文献

本明細書で列挙される文書の完全な書誌データ (それらの開示は引用することにより組み込まれる) は、それとは反対に示されない場合は、後が続くとおりである。

【0385】

【表 19】

Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K (1993). Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* **36**:762

Alam R, York J, Moyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N (1996). Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**:1398

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.

Amann B, Tinzmann R, Angelkort B (2003). ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care* **26**:2421

Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D (2002). A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J. Clin. Invest.* **109**:251 20

Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D (2003). Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.* **63**:401

Aurup H et al. (1994). *Nucleic Acids Res* **22**:20

Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE (1984). Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* **25**:689

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**:97

Baggiolini M (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**:565 30

Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K (2000). Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **58**:684

Banisori I, Leist TP, Kalman B (2005). Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J. Neuroinflammation* **2**:7

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**:640

【 0 3 8 6 】

【表 20】

Berkhout TA (1997). *J Biol Chem* **272**:16404

Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Muller CA, Muller GA (1991). The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis. *Pathol. Res. Pract.* **187**:251

Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV Jr, Broxmeyer HE, Charo IF (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* **100**:2552

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**:894

10

Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lusis AJ, Tsou CL, Charo IF (1996). Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J. Biol. Chem.* **271**:7551

Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J (1995). Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood* **86**:3841

Bower G, Brown DM, Steffes MW, Vernier RL, Mauer SM (1980). Studies of the glomerular mesangium and the juxtaglomerular apparatus in the genetically diabetic mouse. *Lab. Invest.* **43**:333

20

Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**:2752

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH (2007). Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologica* **50**:471

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH (2006). Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* **69**:73

30

Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH (2004). Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int.* **65**:116

Cockwell P, Howie AJ, Adu D, Savage CO (1998). *In situ* analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* **54**:827

Cohen CD, Gröne HJ, Gröne EF, Nelson PJ, Schlöndorff D, Kretzler M (2002). Laser microdissection and gene expression analysis on formaldehyde-fixed archival tissue. *Kidney Int.* **61**:125

Cummins LL et al. (1995). *Nucleic Acids Res* **23**:2019

40

Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Bruseghin M, Cernigoi AM, Saller A, Plebani M, Fioretto P (2005). Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16 Suppl 1**:S78

Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **7**:35

【0387】

【表 2 1】

De Bleeker JL, De Paepe B, Vanwalleghem IE, Schroder JM (2002). Differential expression of chemokines in inflammatory myopathies. *Neurology* **58**:1779

Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, Zack PM, Nixon K, Bolin R, Judkins MB, Farmer JA, Wolf JL, Gill SC, Bendele RA (2000). Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm. Res.* **17**:1503

Eaton BE et al. (1995). *Chem Biol* **2**:633

Eaton BE, Gold L, Hicke BJ, Janjic N, Jucker FM, Sebosta DP, Tarasow TM, Willis MC, Zichi DA (1997). *Bioorg Med Chem* **5**:1087

Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, Stefanadis C, Trikas A, Pitsavos C, Tentolouris C, Toutouza MG, Toutouzas P (2001). Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty. *Int. J. Cardiol.* **80**:55

Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A (2002). Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ. Res.* **90**:1167

Fujinaka H, Yamamoto T, Takeya M, Feng L, Kawasaki K, Yaoita E, Kondo D, Wilson CB, Uchiyama M, Kihara I (1997). Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**:1174

Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K-I, Hashimoto H, Ishiwata Y, Tomosugi N, Mukaida N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H (2003). Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**:1066

Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K (1993). The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* **21**:480

Galasso JM, Liu Y, Szaflarski J, Warren JS, Silverstein FS (2000). Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain. *Neuroscience* **101**:737

Galkina E, Ley K (2006). Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**:368-377

Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM (1993). Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J. Exp. Med.* **177**:1421

Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD (1996). Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* **157**:5613

Gerard C, Rollins, BJ. Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* **6**:1182

Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM, Wang JM (1997). Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors. *J. Biol. Chem.* **272**:11682

Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC (1998). The coordinated action of CC chemokines in

【表 2 2】

the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* **188**:157

Gordillo GM, Onat D, Stockinger M, Roy S, Atalay M, Beck FM, Sen CK (2004). A key angiogenic role of monocyte chemoattractant protein-1 in hemangioendothelioma proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**:C866

Green LS et al. (1995). *Chem Biol* **2**:683

Handel TM, Domaille PJ (1996). Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* **35**:6569

10

Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S (1993). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **69**:83

Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S (2003). Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* **48**:2555

Heath H, Qin S et al. (1997). Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* **99**:178

Holdsworth SR, Kitching AR, Tipping PG (2000). Chemokines as therapeutic targets in renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**:505

20

Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM (1997). Release of RANTES, MIP-1 α , and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**:1377

Hosaka S et al. (1994). *Clin Exp Immunol* **97**:451

Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM (2001). Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **193**:713

30

Hulkower K, Brosnan CF, Aquino DA, Cammer W, Kulshrestha S, Guida MP, Rapoport DA, Berman JW (1993). Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **150**:2525

Humbert M, Ying S, Corrigan C, Menz G, Barkans J, Pfister R, Meng Q, Van Damme J, Opdenakker G, Durham SR, Kay AB (1997). Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**:1

Ihm CG, Park JK, Hong SP, Lee TW, Cho BS, Kim MJ, Cha DR, Ha H (1998). A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells. *Nephron* **79**:33

40

Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Sakamoto O, Yoshimura T, Ando M, Takahashi K (1994). Monocyte chemoattractant protein-1 in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases. *Hum. Pathol.* **25**:455

Johrer K, Zelle-Rieser C, Perathoner A, Moser P, Hager M, Ramoner R, Gander H, Holtl L, Bartsch G, Greil R, Thurnher M (2005). Up-regulation of functional chemokine receptor CCR3 in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**:2459

【 0 3 8 9 】

【表 2 3】

Jolicoeur C, Lemay A, Akoum A (2001). Comparative effect of danazol and a GnRH agonist on monocyte chemotactic protein-1 expression by endometriotic cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **45**:86

Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* **179**:881

Kaburagi Y, Shimada Y, Nagaoka T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S (2001). Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , and eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* **293**:350

10

Kawasaki AM et al. (1993). *J Med Chem* **36**:831

Kennedy KJ, Strieter RM, Kunkel SL, Lukacs NW, Karpus WJ (1998). Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 α and monocyte chemotactic protein-1. *J. Neuroimmunol.* **91**:98

Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, Welch KM (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neuroimmunol.* **56**:127

Kitamoto S, Egashira K (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy for cardiovascular diseases. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **1**:393

20

Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, and Nestle FO (2003). Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* **101**:1487

Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM (1992). Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **90**:772

Kouno J, Nagai H, Nagahata T, Onda M, Yamaguchi H, Adachi K, Takahashi H, Teramoto A, and Emi M (2004). Up-regulation of CC chemokine, CCL3L1, and receptors, CCR3, CCR5 in human glioblastoma that promotes cell growth. *J Neurooncol* **70**:301

30

Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* **186**:1757

Kusser W (2000). *J Biotechnol* **74**:27-38

Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N (1997). Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **94**:12053

Lesnik EA et al. (1993). *Biochemistry* **32**:7832

Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TNC, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC (1997). 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. *J. Exp. Med.* **185**:1371

40

Lu BB, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *J. Exp. Med.* **187**:601

【 0 3 9 0 】

【表 2 4】

Lubkowski J, Bujacz G, Boque L, Domaille PJ, Handel TM, Wlodawer A (1997). The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat Struct Biol* 4:64

Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Bruhl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauer V, Pfistering J, Stangassinger M, Schlöndorff D (2001). Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol*. 166:4697

Martinelli R, Sabroe I, LaRosa G, Williams TJ, Pease JE. The CC chemokine eotaxin (CCL11) is a partial agonist of CC chemokine receptor 2b. *J Biol Chem* 276:42957

Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ (1989). Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167:1883

McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.

Meyer TW (2003). Immunosuppression for diabetic glomerular disease? *Kidney Int.* 63:377

Miller MD, Krangel MS (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 12:17

Miller LE et al. (1993). *J Physiol* 469:213

Mora C, Navarro JF (2005). The role of inflammation as a pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 5:399

Morii T, Fujita H, Narita T, Shimotomai T, Fujishima H, Yoshioka N, Imai H, Kakei M, Ito S (2003). Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. *J. Diabetes Complications* 17:11

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52:145

Nakamura H, Weiss ST, Israel E, Luster AD, Drazen JM, Lilly CM (1999). Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1952

Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, Matsubara A, Miyahara S, Nakao S, Yin Y, Benowitz L, Hafezi-Moghadam A, Miller JW (2007). Monocyte chemoattractant protein 1 mediated retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 104:2425

Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J (2003). Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Kidney Dis.* 42:53

Myers SJ, Wong LM, Charo IF (1995). Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270:5786

Needleman & Wunsch (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.

Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN (1991). Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 88:1121

【 0 3 9 1 】

【表 2 5】

Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ (1993). Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 72:415

Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B, de Lema GP, Murphy PM, Gao JL, Henger A, Kretzler M, Horuk R, Weber M, Krombach F, Schlöndorff D, Anders HJ (2005). Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:977

Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K, Takahashi K (1997). The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J. Pathol.* 182:106

10

Okuno T, Andoh A, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, Bamba T (2002). Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand. J. Gastroenterol.* 37:317

Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9:617

Pawar RD, Patole PS, Zecher D, Segerer S, Kretzler M, Schlöndorff D, Anders HJ (2006). Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:141

Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444

20

Perez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla mS, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlöndorff D, Luckow B (2005). Chemokine receptor CCR2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3592

Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1369

Ponath PD, Qin S, Ringler DJ, Clark-Lewis I, Wang J, Kassam N, Smith H, Shi X, Gonzalo JA, Newman W, Gutierrez-Ramos JC, Mackay CR (1996a). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* 97:604

30

Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR (1996b). Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J. Exp. Med.* 183:2437

Power CA, Meyer A, Nemeth K, Bacon KB, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Wells TN (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J. Biol. Chem.* 270:19495

Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris RC, Fogo AB, Breyer MD (2004). Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286:F590

40

Qin S, LaRosa G, Campbell JJ, Smith-Heath H, Kassam N, Shi X, Zeng L, Butcher EC, Mackay CR (1996). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur. J. Immunol.* 26:640

Ransohoff RM et al. (1993). *FASEB J* 7:592

【 0 3 9 2 】

【表 2 6】

Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996). Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α . *J. Biol. Chem.* **271**:17161

Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S (1999). End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am. J. Kidney Dis.* **34**:795-808

Rollins BJ, Stier P, Ernst T, Wong GG (1989). The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell Biol.* **9**:4687

Rollins BJ (1996). Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **2**:198

10

Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J (1994). Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab. Invest.* **71**:536

Ruffing N, Sullivan N, et al. (1998). CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T cells. *Cell Immunol* **189**:160

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Keinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* **96**:34

Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* **35**:3362

20

Schall TJ, Bacon KB (1994). Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:865

Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int.* **56**:135

Schwartz A, Paul K, Tschirner S, Menke J, Hansen T, Brenner W, Kelly VR, Relle M, Galle PR (2005). Interferon-beta: a therapeutic for autoimmune lupus in MRL-Fas^{lpr} mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**:3264

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA (1993). A modern view of atherogenesis. *Am. J. Cardiol.* **71**:9B

30

Seeger S, Nelson PJ, Schlöndorff D (2000). Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**:152

Shimizu S, Nakashima H, Masutani K, Inoue Y, Miyake K, Akahoshi M, Tanaka Y, Egashira K, Hirakata H, Otsuka T, Harada M (2004). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice. *Rheumatology (Oxford)* **43**:1121

Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* **2**: 482

Springer TA (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:827

40

Steinman L (2004). Immune therapy for autoimmune diseases. *Science* **305**:212

Svensson M, Sundkvist G, Arnqvist HJ, Björk E, Blohme G, Bolinder J, Henricsson M, Nystrom L, Torffvit O, Waernbaum I, Ostman J, Eriksson JW (2003). Signs of nephropathy may occur early in young adults with diabetes despite modern diabetes management: Results from the

【表 2 7】

nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetes Care* **26**:2903

Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y, Inukai T (2006). Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients. *J. Diabetes Complications* **20**:98

Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K (1993). Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum. Pathol.* **24**:534

Tang WW, Qi M, Warren JS (1996). Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int.* **50**:665

Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, Shimizu A, Shike T, Ishiguro C, Koizumi M, Funabiki K, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y (2002). Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* **16**:1

Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR (1999). Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Exp. Med.* **190**:1813

Tuaillon N, Shen de F, Berger RB, Lu B, Rollins BJ, Chan CC (2002). MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**:1493

Tuttle KR (2005). Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**:1537

Uguccioni M, Mackay CR et al. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* **100**:1137

United States Renal Data System (2004). Annual data report: Incidence and prevalence 2004. *Am. J. Kidney Dis.* **45**:S77

Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R (2003). Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* **63**:209

Van Riper G, Siciliano S, Fischer PA, Meurer R, Springer MS, Rosen H (1993). Characterization and species distribution of high affinity GTP-coupled receptors for human rantes and monocyte chemoattractant protein 1. *J. Exp. Med.* **177**:851

Venkatesan N et al. (2003). *Curr Med Chem* **10**:1973

Vestergaard C, Just H, Baumgartner Nielsen J, Thestrup-Pedersen K, Deleuran M (2004). Expression of CCR2 on monocytes and macrophages in chronically inflamed skin in atopic dermatitis and psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* **84**:353

Viedt C, Orth SR (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**:2043

Wada T, Furuichi K, Segada-Takaeda C, Ahimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H (1999). MIP-1 α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **56**:995

【 0 3 9 4 】

【表 28】

Wada T, Yokoyama H, Matsushima K, Kobayashi KI (2001). Chemokines in renal diseases. *Int. Immunopharmacol.* 1:637

Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K (1996). Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J.* 10:1418

Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ (1995). Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 26:661

Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RA (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 51:770

Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M, Makita Z (2002). Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 277:20309

Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, Mackay CR, Daugherty BL, Springer MS, Durham SR, Williams TJ, Kay AB (1997). Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol* 27:3507

Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB (1999). Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 163:6321

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D (1991). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88:5252

Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* 142:1956

Yozai K, Shikata K, Sasaki M, Tone A, Ohga S, Usui H, Okada S, Wada J, Nagase R, Ogawa D, Shikata Y, Makino H (2005). Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3326

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782

【0395】

本明細書、特許請求の範囲および/若しくは図面に開示される本発明の特徴は、個別におよびそれらのいずれかの組合せの双方で、本発明をその多様な形態で実現するための材料であり得る。なお、本発明の主たる特徴または態様は以下のとおりである。

態様1：1 A型核酸、1 B型核酸、2型核酸、3型核酸、4型核酸、および配列番号87ないし115のいずれかの核酸配列を有する核酸を含んでなる群から選択される、好ましくはMCP-1に結合する核酸。

態様2：1 A型核酸が、5' 3'の方向に、第一の伸長ボックスB1A、第二の伸長ボックスB2、第三の伸長ボックスB3、第四の伸長ボックスB4、第五の伸長ボックスB5、第六の伸長ボックスB6および第七の伸長ボックスB1Bを含んでなり、第一の伸長ボックスB1Aおよび第七の伸長ボックスB1Bは場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、第一の伸長ボックスB1AはAGCRUGのヌクレオチド配列を含んでなり、第二の伸長ボックスB2はCCCGGWのヌクレオチド配列を含んでなり、

第三の伸長ボックス B 3 は G U R のヌクレオチド配列を含んでなり、
第四の伸長ボックス B 4 は R Y A のヌクレオチド配列を含んでなり、
第五の伸長ボックス B 5 は G G G G G R C G C G A Y C のヌクレオチド配列を含んでなり、
第六の伸長ボックス B 6 は U G C A A U A A U G 若しくは U R Y A W U U G のヌクレオチド配列を含んでなり、および
第七の伸長ボックス B 1 B は C R Y G C U のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 1 に記載の核酸。
態様 3：第一の伸長ボックス B 1 A が A G C G U G のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 2 に記載の核酸。
態様 4：第二の伸長ボックス B 2 が C C C G G U のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 若しくは 3 に記載の核酸。
態様 5：第三の伸長ボックス B 3 が G U G のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 2 ないし 4 のいずれかに記載の核酸。
態様 6：第四の伸長ボックス B 4 が G U A のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 2 ないし 5 のいずれかに記載の核酸。
態様 7：第五の伸長ボックス B 5 が G G G G G C G C G A C C のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 ないし 6 のいずれかに記載の核酸。
態様 8：第六の伸長ボックス B 6 が U A C A U U U G のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 ないし 7 のいずれかに記載の核酸。
態様 9：第七の伸長ボックス B 1 B が C A C G C U のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 ないし 8 のいずれかに記載の核酸。
態様 10：核酸が配列番号 21 の核酸配列を含んでなる、態様 2 ないし 9 のいずれかに記載の核酸。
態様 11：1 B 型核酸が、5' 3' の方向に、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2、第三の伸長ボックス B 3、第四の伸長ボックス B 4、第五の伸長ボックス B 5、第六の伸長ボックス B 6 および第七の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、
第一の伸長ボックス B 1 A および第七の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、
第一の伸長ボックス B 1 A は A G Y R U G のヌクレオチド配列を含んでなり、
第二の伸長ボックス B 2 は C C A G C U 若しくは C C A G Y のヌクレオチド配列を含んでなり、
第三の伸長ボックス B 3 は G U G のヌクレオチド配列を含んでなり、
第四の伸長ボックス B 4 は A U G のヌクレオチド配列を含んでなり、
第五の伸長ボックス B 5 は G G G G G C G C G A C C のヌクレオチド配列を含んでなり、
第六の伸長ボックス B 6 は C A U U U U A 若しくは C A U U U A のヌクレオチド配列を含んでなり、および
第七の伸長ボックス B 1 B は C A Y R C U のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 1 に記載の核酸。
態様 12：第一の伸長ボックス B 1 A が A G C G U G のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 11 に記載の核酸。
態様 13：第二の伸長ボックス B 2 が C C A G U のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 11 若しくは 12 に記載の核酸。
態様 14：第六の伸長ボックス B 6 が C A U U U U A のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 11 ないし 13 のいずれかに記載の核酸。
態様 15：第七の伸長ボックス B 1 B が C A C G C U のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 11 ないし 14 のいずれかに記載の核酸。
態様 16：核酸が、配列番号 28 および配列番号 27 の核酸配列を含んでなる、態様 11 ないし 15 のいずれかに記載の核酸。

10

20

30

40

50

態様 17 : 2 型核酸が、5' 3' の方向に、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2 および第三の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、
 第一の伸長ボックス B 1 A および第三の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、
 第一の伸長ボックス B 1 A は、A C G C A、C G C A および G C A を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、
 第二の伸長ボックス B 2 は 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んでなり、
 第三の伸長ボックス B 1 B は、U G C G U、U G C G および U G C を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、
 態様 1 に記載の核酸。

10

態様 18 : 第二の伸長ボックス B 2 が C G 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 U G G C U C のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 17 に記載の核酸。

態様 19 : a) 第一の伸長ボックス B 1 A が A C G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第三の伸長ボックス B 1 B が U G C G U のヌクレオチド配列を含んでなるか；または
 b) 第一の伸長ボックス B 1 A が C G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第三の伸長ボックス B 1 B が U G C G のヌクレオチド配列を含んでなるか；または
 c) 第一の伸長ボックス B 1 A が G C A のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第三の伸長ボックス B 1 B が U G C 若しくは U G C G のヌクレオチド配列を含んでなる、
 態様 17 若しくは 18 のいずれかに記載の核酸。

20

態様 20 : 第一の伸長ボックス B 1 A が G C A のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 17 ないし 19 のいずれかに記載の核酸。

態様 21 : 第三の伸長ボックス B 1 B が U G C G のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 17 ないし 20 のいずれか、および好ましくは請求項 20 に記載の核酸。

態様 22 : 核酸が、配列番号 37、配列番号 116、配列番号 117 および配列番号 278 の核酸配列を含んでなる、態様 17 ないし 21 のいずれかに記載の核酸。

態様 22 : 3 型核酸が、5' 3' の方向で、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2 A、第三の伸長ボックス B 3、第四の伸長ボックス B 2 B、第五の伸長ボックス B 4、第六の伸長ボックス B 5 A、第七の伸長ボックス B 6、第八の伸長ボックス B 5 B および第九の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、
 第一の伸長ボックス B 1 A および第九の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、
 第二の伸長ボックス B 2 A および第四のボックス B 2 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、
 第六の伸長ボックス B 5 A および第八のボックス B 5 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、それによりハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、
 第一の伸長ボックス B 1 A は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、
 第二の伸長ボックス B 2 A は G K M G U のヌクレオチド配列を含んでなり、
 第三の伸長ボックス B 3 は K R R A R のヌクレオチド配列を含んでなり、
 第四の伸長ボックス B 2 B は A C K M C のヌクレオチド配列を含んでなり、
 第五の伸長ボックス B 4 は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、
 第六の伸長ボックス B 5 A は、G G Y および C W G C を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、
 第七の伸長ボックス B 6 は、Y A G A、C K A A U および C C U U U A U を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、
 第八の伸長ボックス B 5 B は、G C Y R および G C W G を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、ならびに

30

40

50

第九の伸長ボックス B 1 B は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 1 に記載の核酸。

態様 2 4：第三の伸長ボックス B 3 が G A G A A 若しくは U A A A A のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 3 に記載の核酸。

態様 2 5：第五の伸長ボックス B 4 が C A G C G A C U 若しくは C A A C G A C U のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 3 若しくは 2 4 に記載の核酸。

態様 2 6：第五の伸長ボックス B 4 が C A G C G A C U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、ボックス B 3 が U A A A A のヌクレオチド配列を含んでなる、
態様 2 3 ないし 2 5 のいずれかに記載の核酸。

10

態様 2 7：第五の伸長ボックス B 4 が C A A C G A C U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第三の伸長ボックス B 3 が G A G A A のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 3 ないし 2 5 のいずれかに記載の核酸。

態様 2 8：第七の伸長ボックス B 6 が U A G A のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 3 ないし 2 7 のいずれかに記載の核酸。

態様 2 9：a) 第一の伸長ボックス B 1 A が G U R C U G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第九の伸長ボックス B 1 B が G C A G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第一の伸長ボックス B 1 A が G K S Y G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第九の伸長ボックス B 1 B が G C R S M C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

20

c) 第一の伸長ボックス B 1 A が K B B S C のヌクレオチド配列を含んでなり、
 かつ

第九の伸長ボックス B 1 B が G S V V M のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

d) 第一の伸長ボックス B 1 A が B N G C のヌクレオチド配列を含んでなり、
 かつ

第九の伸長ボックス B 1 B が G C N V のヌクレオチド配列を含んでなる

態様 2 3 ないし 2 8 のいずれかに記載の核酸。

態様 3 0：a) 第一の伸長ボックス B 1 A が G U G C U G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

30

第九の伸長ボックス B 1 B が G C A G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第一の伸長ボックス B 1 A が G U G C G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第九の伸長ボックス B 1 B が G C G C A C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

c) 第一の伸長ボックス B 1 A が K K S S C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第九の伸長ボックス B 1 B が G S S M M のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

d) 第一の伸長ボックス B 1 A が S N G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ
 第九の伸長ボックス B 1 B が G C N S のヌクレオチド配列を含んでなる、

態様 2 9 に記載の核酸。

態様 3 1：第一の伸長ボックス B 1 A が G G G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

40

第九の伸長ボックス B 1 B が G C C C のヌクレオチド配列を含んでなる、

態様 3 0 に記載の核酸。

態様 3 2：第二の伸長ボックス B 2 A が G K M G U のヌクレオチド配列を含んでなり、
 かつ、第四の伸長ボックス B 2 B が A C K M C のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 2 3 ないし 3 1 のいずれかに記載の核酸。

態様 3 3：第二の伸長ボックス B 2 A が G U A G U のヌクレオチド配列を含んでなり、
 かつ、第四の伸長ボックス B 2 B が A C U A C のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 3 2 に記載の核酸。

態様 3 4：a) 第六の伸長ボックス B 5 A が G G Y のヌクレオチド配列を含んでなり、

50

かつ

第八の伸長ボックス B 5 B が G C Y R のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

b) 第六の伸長ボックス B 5 A が C W G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第八の伸長ボックス B 5 B が G C W G のヌクレオチド配列を含んでなる、

態様 2 3 ないし 3 3 のいずれかに記載の核酸。

態様 3 5：第六の伸長ボックス B 5 A が G G C のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第八の伸長ボックス B 5 B が G C C G のヌクレオチド配列を含んでなる、

態様 3 4 に記載の核酸。

態様 3 6：第六の伸長ボックス B 5 A が、第八の伸長ボックス B 5 B のヌクレオチド G C Y とハイブリダイズする、態様 2 3 ないし 3 5、好ましくは 3 4 ないし 3 5 のいずれかに記載の核酸。

10

態様 3 7：核酸が配列番号 5 6 に記載の核酸配列を含んでなる、態様 2 3 ないし 2 6 および 2 8 ないし 3 6 のいずれかに記載の核酸。

態様 3 8：核酸が、配列番号 5 7 ないし 6 1、配列番号 6 7 ないし 7 1 および配列番号 7 3 の核酸配列を含んでなる群から選択される核酸配列を含んでなる、態様 2 3 ないし 2 5 および 2 7 ないし 3 6 のいずれかに記載の核酸。

態様 3 9：4 型核酸が、5' 3' の方向で、第一の伸長ボックス B 1 A、第二の伸長ボックス B 2、第三の伸長ボックス B 1 B を含んでなり、

第一の伸長ボックス B 1 A および第三の伸長ボックス B 1 B は場合によっては相互とハイブリダイズし、ハイブリダイゼーションに際して二本鎖構造が形成され、

20

第一の伸長ボックス B 1 A は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、

第二の伸長ボックス B 2 は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、ならびに

第三の伸長ボックス B 1 B は、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 を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、態様 1 に記載の核酸。

態様 4 0：a) 第一の伸長ボックス B 1 A が G U G U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

30

第三の伸長ボックス B 1 B が G R C A C のヌクレオチド配列を含んでなり；

b) 第一の伸長ボックス B 1 A が G C G C G A G のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第三の伸長ボックス B 1 B が C U C G C G U C のヌクレオチド配列を含んでなるか；若しくは

c) 第一の伸長ボックス B 1 A が C S K S U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ第三の伸長ボックス B 1 B が G R S M S G のヌクレオチド配列を含んでなるか、若しくは

d) 第一の伸長ボックス B 1 A が U G U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

第三の伸長ボックス B 1 B が G G C A のヌクレオチド配列を含んでなるか、若しくは

e) 第一の伸長ボックス B 1 A が A G C G U G D U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ

40

第三の伸長ボックス B 1 B が G N C A S G C U のヌクレオチド配列を含んでなる、

態様 3 9 に記載の核酸。

態様 4 1：第一の伸長ボックス B 1 A が C S K S U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第三の伸長ボックス B 1 B が G R S M S G のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 4 0 に記載の核酸。

態様 4 2：第一の伸長ボックス B 1 A が C C G C U U のヌクレオチド配列を含んでなり、かつ、第三の伸長ボックス B 1 B が G G G C G G のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 4 1 に記載の核酸。

態様 4 3：第二の伸長ボックス B 2 が A G G U G G G U G G U A G U A A G U A A A G

50

のヌクレオチド配列を含んでなる、態様 39 ないし 42 のいずれかに記載の核酸。

態様 44：核酸が配列番号 80 の核酸配列を含んでなる、態様 39 ないし 43 のいずれかに記載の核酸。

態様 45：核酸がケモカインを結合することが可能であり、該ケモカインがエオタキシン、MCP-1、MCP-2 および MCP-3 を含んでなる群から選択される、態様 1 ないし 44 のいずれかに記載の核酸。

態様 46：核酸がケモカインを結合することが可能であり、該ケモカインがヒトエオタキシン、ヒト MCP-1、ヒト MCP-2 およびヒト MCP-3 を含んでなる群から選択される、態様 1 ないし 45 のいずれかに記載の核酸。

態様 47：核酸が MCP-1 を結合することが可能であり、MCP-1 が好ましくはサル MCP-1、ウマ MCP-1、ウサギ MCP-1、ウシ MCP-1、イヌ MCP-1、ブタ MCP-1 およびヒト MCP-1 を含んでなる群から選択される、態様 1 ないし 46 のいずれかに記載の核酸。

態様 48：核酸がヒト MCP-1 を結合することが可能である、態様 1 ないし 47 のいずれかに記載の核酸。

態様 49：MCP-1 が配列番号 1 のアミノ酸配列を有する、態様 1 ないし 48 のいずれか、好ましくは態様 48 に記載の核酸。

態様 50：核酸が配列番号 122、配列番号 253 および配列番号 254 の核酸配列を含んでなる、好ましくはマウス MCP-1 に結合する核酸。

態様 51：核酸が配列番号 127 の核酸配列を含んでなる、好ましくはマウス MCP-1 に結合する核酸。

態様 52：マウス MCP-1 が配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる、態様 50 若しくは 51 に記載の核酸。

態様 53：核酸が修飾を含んでなり、該修飾が好ましくは高分子部分であり、かつ／または該修飾が、好ましくは、動物若しくはヒト身体、好ましくはヒト身体中の滞留時間に関して態様 1 ないし 52 のいずれかに記載の核酸の特徴を改変することを可能にする、態様 1 ないし 52 のいずれかに記載の核酸。

態様 54：修飾が HES 部分および PEG 部分を含んでなる群から選択される、態様 53 に記載の核酸。

態様 55：修飾が直鎖若しくは分枝状 PEG よりなる PEG 部分であり、該 PEG 部分の分子量が好ましくは約 20 から 120 kD まで、より好ましくは約 30 から 80 kD まで、および最も好ましくは約 40 kD である、態様 54 に記載の核酸。

態様 56：修飾が HES 部分であり、好ましくは該 HES 部分の分子量が約 10 から 130 kD まで、より好ましくは約 30 から 130 kD まで、および最も好ましくは約 100 kD である、態様 54 に記載の核酸。

態様 57：修飾がリンカーを介して核酸に結合される、態様 53 ないし 56 のいずれかに記載の核酸。

態様 58：修飾が、その 5' 末端ヌクレオチドおよび／若しくはその 3' 末端ヌクレオチドの核酸に、ならびに／または 5' 末端ヌクレオチドと 3' 末端ヌクレオチドの間の核酸のヌクレオチドに結合される、態様 53 ないし 57 のいずれかに記載の核酸。

態様 59：核酸のヌクレオチド若しくはそれを形成するヌクレオチドが L-ヌクレオチドである、態様 1 ないし 58 のいずれかに記載の核酸。

態様 60：核酸が L-核酸である、態様 1 ないし 59 のいずれかに記載の核酸。

態様 61：MCP-1 を結合することが可能な核酸の部分が L-ヌクレオチドよりなる、態様 1 ないし 59 のいずれかに記載の核酸。

態様 62：態様 1 ないし 61 のいずれかに記載の核酸、および場合によっては 1 種のさらなる構成要素を含んでなり、該さらなる構成要素は、製薬学的に許容できる賦形剤、製薬学的に許容できる担体および製薬学的有効成分を含んでなる群から選択される、製薬学的組成物。

態様 63：製薬学的組成物が、態様 1 ないし 61 のいずれかに記載の核酸および製薬学

10

20

30

40

50

的に許容できる担体を含んでなる、態様 6 2 に記載の製薬学的組成物。

態様 6 4 : 医薬品の製造のための、態様 1 ないし 6 1 のいずれかに記載の核酸の使用。

態様 6 5 : 医薬品が、ヒト医学での使用のため、若しくは獣医学での使用のためである、態様 6 4 に記載の使用。

態様 6 6 : 診断手段の製造のための、態様 1 ないし 6 1 のいずれかに記載の核酸の使用。

態様 6 7 : 医薬品が、炎症性疾患、自己免疫疾患、自己免疫性脳脊髄炎、卒中、急性および慢性多発性硬化症、慢性炎症、関節リウマチ、腎疾患、再狭窄、血管形成術後の再狭窄、急性および慢性アレルギー反応、一次的および二次的免疫学的若しくはアレルギー反応、喘息、結膜炎、気管支炎、癌、アテローム硬化症、アテローム硬化性心血管系心不全若しくは卒中、乾癬、乾癬性関節炎、神経系の炎症、アトピー性皮膚炎、大腸炎、子宮内膜症、ブドウ膜炎、黄斑変性を包含する網膜障害、網膜剥離、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、網膜色素変性、増殖性硝子体網膜症、および中心性漿液性網脈絡膜症；特発性肺線維症、サルコイドーシス、多発性筋炎、皮膚筋炎、免疫抑制の回避、感染症のリスクを低下させること、敗血症、腎の炎症、糸球体腎炎、急速進行性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、閉塞性腎症、急性尿細管壊死、およびびまん性糸球体硬化症、全身性エリテマトーデス、慢性気管支炎、ベーチェット病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、川崎病後の早発性アテローム硬化症、心筋梗塞、肥満、慢性肝疾患、ペイロニー病、急性脊髄損傷、肺若しくは腎移植、心筋炎、アルツハイマー病およびニューロパシー、乳癌、胃癌、膀胱癌、卵巣癌、過誤腫、結腸直腸癌、結腸腺腫、膵炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、ならびにクローン病若しくは潰瘍性大腸炎のような炎症性腸疾患を含んでなる群から選択される疾患若しくは障害の処置および／若しくは予防のためである、態様 6 4 若しくは 6 5 に記載の使用。

態様 6 8 : ケモカイン、および態様 1 ないし 6 1 のいずれかに記載の核酸を含んでなる複合体であって、該ケモカインが、エオタキシン、MCP-1、MCP-2 および MCP-3 を含んでなる群から選択され、好ましくは該複合体が結晶性複合体である、上記複合体。

態様 6 9 : ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒト MCP-1、ヒト MCP-2 およびヒト MCP-3 を含んでなる群から選択される、態様 6 8 に記載の複合体。

態様 7 0 : ケモカインが MCP-1 であり、MCP-1 が、好ましくはヒト MCP-1、サル MCP-1、ウマ MCP-1、ウサギ MCP-1、ウシ MCP-1、イヌ MCP-1 およびブタ MCP-1 を含んでなる群から選択され、より好ましくは MCP-1 はヒト MCP-1 である、態様 6 8 若しくは 6 9 に記載の複合体。

態様 7 1 : ケモカインの検出のための態様 1 ないし 6 1 のいずれかに記載の核酸の使用であって、該ケモカインがエオタキシン、MCP-1、MCP-2 および MCP-3 を含んでなる群から選択される、上記使用。

態様 7 2 : ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒト MCP-1、ヒト MCP-2 およびヒト MCP-3 を含んでなる群から選択される、態様 7 1 に記載の使用。

態様 7 3 : ケモカインが MCP-1 であり、MCP-1 が好ましくはヒト MCP-1、サル MCP-1、ウマ MCP-1、ウサギ MCP-1、ウシ MCP-1、イヌ MCP-1 およびブタ MCP-1 を含んでなる群から選択され、より好ましくは MCP-1 はヒト MCP-1 である、態様 7 1 若しくは 7 2 に記載の使用。

態様 7 4 : 以下の段階：

・候補ケモカインアンタゴニストおよび／若しくは候補ケモカインアゴニストを提供する段階、

・態様 1 ないし 6 1 のいずれかに記載の核酸を提供する段階、

・ケモカインアンタゴニストおよび／若しくはケモカインアゴニストの存在下でシグナルを提供する試験系を提供する段階、ならびに

・候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうか、および／若しくは候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうかを決定する段

10

20

30

40

50

階を含んでなり、

該ケモカインはエオタキシン、MCP - 1、MCP - 2およびMCP - 3を含んでなる群から選択される、

ケモカインアンタゴニスト若しくはケモカインアゴニストのスクリーニング方法。

態様75：ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒトMCP - 1、ヒトMCP - 2およびヒトMCP - 3を含んでなる群から選択される、態様74に記載の方法。

態様76：ケモカインがMCP - 1であり、MCP - 1が好ましくはヒトMCP - 1、サルMCP - 1、ウマMCP - 1、ウサギMCP - 1、ウシMCP - 1、イヌMCP - 1およびブタMCP - 1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP - 1はヒトMCP - 1である、態様74若しくは75に記載の方法。

10

態様77：以下の段階：

- ・相、好ましくは固相に固定されたケモカインを提供する段階、
- ・標識されている、態様1ないし61のいずれかに記載の核酸、好ましくは態様1ないし52のいずれかに記載の核酸を提供する段階、
- ・候補ケモカインアゴニストおよび/若しくは候補ケモカインアンタゴニストを添加する段階、ならびに
- ・候補ケモカインアゴニストがケモカインアゴニストであるかどうか、および/若しくは候補ケモカインアンタゴニストがケモカインアンタゴニストであるかどうかを決定する段階

を含んでなり、

20

該ケモカインはエオタキシン、MCP - 1、MCP - 2およびMCP - 3を含んでなる群から選択される、

ケモカインアゴニストおよび/若しくはケモカインアンタゴニストのスクリーニング方法。

態様78：核酸が候補ケモカインアゴニスト若しくは候補ケモカインアンタゴニストにより置換されるかどうか評価されるような該決定することが実施される、態様77に記載の方法。

態様79：ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒトMCP - 1、ヒトMCP - 2およびヒトMCP - 3を含んでなる群から選択される、態様77若しくは78に記載の方法。

態様80：ケモカインがMCP - 1であり、MCP - 1が好ましくはヒトMCP - 1、サルMCP - 1、ウマMCP - 1、ウサギMCP - 1、ウシMCP - 1、イヌMCP - 1およびブタMCP - 1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP - 1はヒトMCP - 1である、態様77ないし79のいずれかに記載の方法。

30

態様81：態様1ないし61のいずれかに記載の核酸を含んでなる、ケモカインの検出のためのキットであって、該ケモカインはエオタキシン、MCP - 1、MCP - 2およびMCP - 3を含んでなる群から選択される、上記キット。

態様82：ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒトMCP - 1、ヒトMCP - 2およびヒトMCP - 3を含んでなる群から選択される、態様81に記載のキット。

態様83：ケモカインがMCP - 1であり、MCP - 1が好ましくはヒトMCP - 1、サルMCP - 1、ウマMCP - 1、ウサギMCP - 1、ウシMCP - 1、イヌMCP - 1およびブタMCP - 1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP - 1はヒトMCP - 1である、態様81若しくは82に記載のキット。

40

態様84：ケモカインが、エオタキシン、MCP - 1、MCP - 2およびMCP - 3を含んでなる群から選択される、態様74ないし80のいずれかに記載の方法により得ることが可能なケモカインアンタゴニスト。

態様85：ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒトMCP - 1、ヒトMCP - 2およびヒトMCP - 3を含んでなる群から選択される、態様84に記載のケモカインアンタゴニスト。

態様86：ケモカインがMCP - 1であり、MCP - 1が好ましくはヒトMCP - 1、サルMCP - 1、ウマMCP - 1、ウサギMCP - 1、ウシMCP - 1、イヌMCP - 1

50

およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である、態様84若しくは85に記載のケモカインアンタゴニスト。

態様87：ケモカインが、エオタキシン、MCP-1、MCP-2およびMCP-3を含んでなる群から選択される、態様74ないし80のいずれかに記載の方法により得ることが可能なケモカインアゴニスト。

態様88：ケモカインが、ヒトエオタキシン、ヒトMCP-1、ヒトMCP-2およびヒトMCP-3を含んでなる群から選択される、態様87に記載のケモカインアゴニスト。

態様89：ケモカインがMCP-1であり、MCP-1が好ましくはヒトMCP-1、サルMCP-1、ウマMCP-1、ウサギMCP-1、ウシMCP-1、イヌMCP-1およびブタMCP-1を含んでなる群から選択され、より好ましくはMCP-1はヒトMCP-1である、態様87若しくは88に記載のケモカインアゴニスト。

態様90：サンプル中の態様1ないし61のいずれかに記載の核酸の検出方法であって、該検出方法が：

f) 本発明の核酸を含有するサンプルを提供する段階；

g) 捕捉プローブ（該捕捉プローブは態様1ないし61のいずれかに記載の核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的であり）、および検出プローブ（該検出プローブは態様1ないし61のいずれかに記載の核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であるか、若しくは、あるいは、該捕捉プローブは態様1ないし61のいずれかに記載の核酸の第二の部分に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該検出プローブは態様1ないし61のいずれかに記載の核酸の第一の部分に少なくとも部分的に相補的である）を提供する段階；

h) 捕捉プローブおよび検出プローブを、同時に若しくはいずれかの順序で連続してのいずれかで、態様1ないし61のいずれかに記載の核酸若しくはその部分と反応させる段階；

i) 場合によっては、捕捉プローブが、段階a)で提供される態様1ないし61のいずれかに記載の核酸に従った核酸にハイブリダイズするかどうかを検出する段階；ならびに

j) 態様1ないし61のいずれかに記載の核酸、ならびに捕捉プローブおよび検出プローブよりなる段階c)で形成される複合体を検出する段階を含んでなる、上記方法。

態様91：検出プローブが検出手段を含んでなり、かつ/若しくは捕捉プローブが支持体、好ましくは固体支持体に固定され得る、態様90に記載の方法。

態様92：複合体の一部でないいかなる検出プローブも、段階e)で複合体の一部である検出プローブのみが検出されるように反応から除去される、態様90若しくは91に記載の方法。

態様93：段階e)が、態様1ないし61のいずれかに記載の核酸若しくはその部分の存在下および前記核酸若しくはその部分の非存在下で捕捉プローブおよび検出プローブがハイブリダイズされる場合に検出手段により生成されるシグナルを比較する段階を含んでなる、態様90ないし92のいずれかに記載の方法。

態様94：検出されるべき核酸が、配列番号37、116、117若しくは278の核酸配列を有する核酸であり、かつ、捕捉プローブ若しくは検出プローブが、配列番号255若しくは配列番号256の核酸配列を含んでなる、態様90ないし93のいずれかに記載の方法。

態様95：検出されるべき核酸が、配列番号122、253若しくは254の核酸配列を有する核酸であり、かつ、捕捉プローブ若しくは検出プローブが、配列番号281および配列番号282の核酸配列を含んでなる、態様90ないし93のいずれかに記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0396】

本発明は、図面、実施例および配列表によりさらに具体的に説明され、それらからさら

なる特徴、態様および利点を捉えることができ、ここで

【図 1】好ましい一態様においてヒト MCP-1 への結合にそっくりそのまま不可欠である配列モチーフ（「1A 型」）を示すヒト MCP-1 に結合する関係する RNA リガンドの配列のアライメントを示す。

【図 2】好ましい一態様においてヒト MCP-1 への結合にそっくりそのまま不可欠である配列モチーフ（「1B 型」）を示すヒト MCP-1 に結合する関係する RNA リガンド、および RNA リガンド 180-D1-002 の誘導体の配列のアライメントを示す。

【図 3】好ましい一態様においてヒト MCP-1 への結合にそっくりそのまま不可欠である配列モチーフ（「2 型」）を示すヒト MCP-1 に結合する関係する RNA リガンドの配列のアライメントを示す。

【図 4】好ましい一態様においてヒト MCP-1 への結合にそっくりそのまま不可欠である配列モチーフ（「3 型」）を示すヒト MCP-1 に結合する関係する RNA リガンドの配列のアライメントを示す。

【図 5】RNA リガンド 178-D5 および 181-A2（配列モチーフ「3 型」のヒト MCP-1 RNA リガンド）の誘導体を示す。

【図 6】好ましい一態様においてヒト MCP-1（他配列）への結合にそっくりそのまま不可欠である配列モチーフ（「4 型」）を示すヒト MCP-1 に結合する関係する RNA リガンドの配列のアライメントを示す。

【図 7】MCP-1 結合配列モチーフ「1A 型」、「1B 型」、「2 型」、「3 型」若しくは「4 型」に関係し得ないヒト MCP-1 に結合する数種の異なる RNA リガンドの配列の表を示す。

【図 8】マウス MCP-1 に結合する RNA リガンド 188-A3-001 および 189-G7-001 の誘導体のアライメントを示す。

【図 9】ピオチニル化ヒト D-MCP-1 の濃度にわたるアプタマーの結合として表される、室温および 37 °C でのピオチニル化ヒト D-MCP-1 へのアプタマー D-NOX-E36 の結合分析の結果を示す。

【図 10】ピオチニル化マウス D-MCP-1 の濃度にわたるアプタマーの結合として表される、37 °C でのピオチニル化マウス D-MCP-1 へのアプタマー D-mNOX-E36 の結合分析の結果を示す。

【図 11】ヒト MCP-1 の濃度にわたるブランクに対する蛍光の差違として表される、THP-1 細胞での MCP-1 誘発性の Ca^{++} 放出を示す一方で、およそ 3 nM の半有効濃度 (EC_{50}) を示すヒト MCP-1 の用量応答曲線が得られた。

【図 12】カルシウム放出アッセイでのシュピーゲルマー NOX-E36 の有効性を示し；細胞を多様な量のシュピーゲルマー NOX-E36 と 37 °C で前インキュベートした 3 nM ヒト MCP-1 で刺激し、NOX-E36 の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 13】カルシウム放出アッセイのシュピーゲルマー mNOX-E36 の有効性を示し；細胞を多様な量のシュピーゲルマー mNOX-E36 と 37 °C で前インキュベートした 5 nM マウス MCP-1 で刺激し、mNOX-E36 の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 14】ヒト MCP-1 の濃度にわたる対照に比較した X 倍増大として表される、THP-1 細胞のヒト MCP-1 誘発性の走化性を示す一方で、多様な MCP-1 濃度への THP-1 細胞の 3 時間の移動後に MCP-1 の用量応答曲線が得られた。

【図 15】走化性アッセイにおけるシュピーゲルマー NOX-E36 の有効性を示し；細胞を多様な量のシュピーゲルマー NOX-E36 と 37 °C で前インキュベートした 0.5 nM ヒト MCP-1 に移動させ、シュピーゲルマー NOX-E36 の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 16】走化性アッセイにおけるシュピーゲルマー mNOX-E36 の有効性を示し；細胞を多様な量のシュピーゲルマー NOX-E36 と 37 °C で前インキュベートした 0.5 nM マウス MCP-1 に移動させ、シュピーゲルマー mNOX-E36 の濃度にわたる対照の割合として表した。

10

20

30

40

50

【図17】時間にわたる応答 (RU) として表した、アミンカップリング処置により Pioneer F1 センサーチップに固定したヒト MCP - 1 へのシュピーゲルマー NOX - E36 の結合の K_D 値を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

【図18】時間にわたる応答 (RU) として表した、アミンカップリング処置によりそれぞれ Pioneer F1 および CM4 センサーチップに固定したヒト MCP ファミリータンパク質 (huMCP - 1、huMCP - 2、huMCP - 3) およびヒトエオタキシンへのシュピーゲルマー NOX - E36 の結合を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

【図19】時間にわたる応答 (RU) として表した、異なる形態の MCP - 1 をアミンカップリング処置により Pioneer F1 および CM4 センサーチップに固定した一方で、多様な種からの MCP - 1 (イヌ MCP - 1、サル MCP - 1、ヒト MCP - 1、ブタ MCP - 1、ウサギ MCP - 1、マウス MCP - 1、ラット MCP - 1) へのシュピーゲルマー NOX - E36 の結合を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

10

【図20】時間にわたる応答 (RU) として表した、アミンカップリング処置により CM4 センサーチップに固定したヒト MCP - 1 へのシュピーゲルマー 181 - A2 - 018 の結合の K_D 値を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

【図21】時間にわたる応答 (RU) として表した、アミンカップリング処置によりそれぞれ Pioneer F1 および CM4 センサーチップに固定したヒト MCP ファミリータンパク質 (huMCP - 1、huMCP - 2、huMCP - 3) およびヒトエオタキシンへのシュピーゲルマー 181 - A2 - 018 の結合を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

20

【図22】時間にわたる応答 (RU) として表した、異なる形態の MCP - 1 をアミンカップリング処置によりそれぞれ Pioneer F1 および CM4 センサーチップに固定した一方で、多様な種からの MCP - 1 (イヌ MCP - 1、サル MCP - 1、ヒト MCP - 1、ブタ MCP - 1、ウサギ MCP - 1、マウス MCP - 1、ラット MCP - 1) へのシュピーゲルマー 181 - A2 - 018 の結合を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

【図23】多様な哺乳動物種からの MCP - 1 ならびにヒト MCP - 2、MCP - 3 およびエオタキシンの Clustal W アライメント (位置 1 ~ 76 のみ) を示す。

【図24A】多様な哺乳動物種からの MCP - 1 ならびにヒト MCP - 2、MCP - 3 およびエオタキシンに関する NOX - E36 および 181 - A2 - 018 の結合特異性を要約する表を示す。

30

【図24B】Biacore 分析により測定されたところの NOX - E36 の選択性を要約する表を示し、それにより、ピオチニル化 NOX - E36 をセンサーチップ表面に固定し、かつ、NOX - E36 への多様な CC および CXCKeモカインの一団の結合を分析した。

【図24C】Biacore 分析により測定されたところのケモカインと相互作用する NOX - E36 の動態解析を示し、それにより、ケモカインを CM5 センサーチップ表面に共有固定し、そして多様な濃度の NOX - E36 を注入しかつ NOX - E36 の結合挙動を BiaEvaluation ソフトウェアを使用して解析した。

40

【図24D】約 0.2 nM の半有効濃度をもつ MIP - 1 での THP - 1 細胞刺激の走化性の用量応答曲線を示す。

【図24E】NOX - E36 による MIP - 1 誘発性の走化性の阻害を示す。NOX - E36 は THP - 1 細胞の MIP1a 誘発性の走化性に対する影響を有しなかった。

【図25】カルシウム放出アッセイでのシュピーゲルマー NOX - E36 - 3' - PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー NOX - E36 - 3' - PEG と 37 で前インキュベートした 3 nM ヒト MCP - 1 で刺激し、シュピーゲルマー NOX - E36 - 3' - PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図26】走化性アッセイでのシュピーゲルマー NOX - E36 - 3' - PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー NOX - E36 - 3' - PEG と 37 で

50

前インキュベートした 0.5 nM ヒト MCP-1 に移動させ、NOX-E36-3'-PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 27A】カルシウム放出アッセイでのシュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG と 37 で前インキュベートした 3 nM ヒト MCP-1 で刺激し、シュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 27B】走化性アッセイでのシュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG と 37 で前インキュベートした 0.5 nM ヒト MCP-1 に移動させ、シュピーゲルマー-NOX-E36-5'-PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

10

【図 28】マウス MCP-1 の濃度にわたるブランクに対する蛍光の差違として表される、THP-1 細胞でのマウス MCP-1 誘発性の Ca^{++} 放出を示す一方で、およそ 5 nM の半有効濃度 (EC_{50}) を示すマウス MCP-1 の用量応答曲線が得られた。

【図 29】カルシウム放出アッセイにおける抗マウス MCP-1 シュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG と 37 で前インキュベートした 3 nM マウス MCP-1 で刺激し、シュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 30】マウス MCP-1 の濃度にわたる対照と比較した X 倍増大として表される、THP-1 細胞のマウス MCP-1 誘発性の走化性を示す一方で、多様な mM MCP-1 濃度への THP-1 細胞の 3 時間の移動後に mM MCP-1 の用量応答曲線が得られた。

20

【図 31】走化性アッセイにおける抗マウス MCP-1 シュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG の有効性を示し；細胞を、多様な量のシュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG と 37 で前インキュベートした 0.5 nM マウス MCP-1 に移動させ、抗マウスシュピーゲルマー-mNOX-E36-3'-PEG の濃度にわたる対照の割合として表した。

【図 32】時間にわたる応答 (RU) として表した、アミンカップリング処置により Pioneer F1 センサーチップに固定したマウス D-MCP-1 へのアプタマー D-mNOX-E36 の結合の K_D 値を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

【図 33】時間にわたる応答 (RU) として表した、2 種の異なる形態の D-MCP-1 をアミンカップリング処置によりそれぞれ Pioneer F1 および CM4 センサーチップに固定した一方で、ヒト D-MCP-1 およびマウス D-MCP-1 へのアプタマー D-mNOX-E36 の結合を示す Biacore 2000 センサー図を示す。

30

【図 34】示されるとおり過ヨウ素酸シッフ (PAS)、Mac-2 (マクロファージ) および CD3 (T 細胞) に対する抗体で染色した、24 週齢 MRL^{lpr/lpr} マウスの腎切片を示し；画像は各群の 7~12 マウスを代表する (元の拡大 PAS: x100、PAS 挿入図: x400、Mac2: x400、CD3: x100)。

【図 35】多様な群の 24 週齢 MRL^{lpr/lpr} マウスでの腎機能パラメータおよび組織学的所見を具体的に説明する表を示す。

【図 36】全群からのマウスの銀染色切片で実施した形態計測による組織学的変化の定量化を示し；A、間質容量指標；B、尿細管拡張指標、および C、尿細管細胞損傷指標は高倍率野の割合として計算し、そして平均 ± SEM として表す。

40

【図 37】Kaplan-Meier 解析により計算されるところの多様な処置群の MRL^{lpr/lpr} マウスの生存を示す。

【図 38】各群の 5 マウスからプールした全腎 RNA を使用するリアルタイム RT-PCR により決定されるところの CC ケモカイン CCL2 および CCL5 の腎 mRNA 発現を示し、それによりマウスの各群の RNA レベルはそれぞれの 18S rRNA 発現により表す。

【図 39】mNOX-E36-3'-PEG での処置による肺の病状の低減を示し；肺組織は 24 週齢の全群から調製しかつ半定量的に評価し；mNOX-E36 および mNOX-

50

E36-3'PEGでの処置はMRL^{lpr/lpr}マウスで細気管支周囲の炎症を低下させ；画像は各群の7～11マウスを代表し；元の倍率×100。

【図40】抗mCCL2シュビーゲルマー処置したマウス（右のマウス）でより少なく一般的であった、顔若しくは頸部領域で典型的に発生する、24週齢MRL^{lpr/lpr}マウスの皮膚ループスの症状発現（左のマウス）を示す。

【図41】24週齢のMRL^{lpr/lpr}マウスでの血清および組織学的所見を示す。

【図42】時間の関数としてのシュビーゲルマー-mNOX-E36の血漿濃度として示される、試験の間の血漿中のPEG化および未PEG化抗mCCL2シュビーゲルマーの薬物動態を示す。

【図43】24週齢のベヒクル若しくはmNOX-E36-3'PEG処置したMRL^{lpr/lpr}マウスでの骨髄および末梢血でのCCR2についてのフローサイトメトリーを示し；データは各群5マウスの骨髄若しくは末梢血いずれか中のCCR2陽性細胞の平均割合±SEMとして示す。

10

【図44】示されるところの多様な時間点でELISAにより測定されるところのPoC-PEG（白棒）およびmNOX-E36-3'PEG（mNOX-E36-P）処置（黒棒）した1K^{db/db}マウスの血清CCL2濃度を示し；*、PoC-PEGに対しmNOX-E36-3'PEG（mNOX-E36-P）に対し $p < 0.05$ 。

【図45】未処置またはPoC-PEG若しくはむしろmNOX-E36-3'PEG処置したdb/dbマウスの糸球体および間質のMac-2およびKi-67陽性細胞の浸潤した数を示す。

20

【図46】6月齢db/dbマウスでの糖尿病性糸球体硬化を示し；多様な群のマウスからの腎切片を過ヨウ素酸シッフで染色し、そして各腎切片からの15個の糸球体を糸球体硬化の程度について評価し；画像は示されるところのそれぞれのスコアに等級付けされた代表的糸球体を示し、元の倍率400×；グラフは各群の全マウス（ $n = 7 \sim 10$ ）からの各スコアの平均割合±SEMを具体的に説明し；*、PoC-PEG（PoC-P）処置した1K^{db/db}マウスに対しmNOX-E36-3'PEG（mNOX-E36-P）について $p < 0.05$ 。

【図47】6月齢のmNOX-E36-3'PEG（mNOX-E36-P）およびPoC-PEG（PoC-P）処置した1K^{db/db}マウスでの糸球体濾過速度（GFR）を示し；GFRは、試験の終了時に、PoC-PEGおよびmNOX-E36-3'PEG処置した1K^{db/db}マウスの群でのFITC-イヌリンのクリアランスキネティクスにより決定した。

30

【図48】6月齢db/dbマウスの尿細管萎縮および間質容量を示し；銀染色した腎切片の画像はそれぞれの群からの代表的腎を具体的に説明し（元の倍率100×）；値は各群の7～10マウスからのそれぞれの形態計測分析指標の平均±SEMを表し；*、BK野生型マウスに対し2K^{db/db}で $p < 0.05$ 、#、2K^{db/db}マウスに対し1Kで $p < 0.05$ 、†、PoC-PEG処置した1K^{db/db}マウスに対しmNOX-E36-3'PEG（mNOX-E36-PEG）で $p < 0.05$ 。

【図49】各群の6～10マウスからプールした全腎RNAを使用するリアルタイムRT-PCRにより測定されたとところのdb/dbマウスにおける腎CCL2 mRNA発現を示し；マウスの各群のmRNAレベルはそれぞれの18S rRNA発現によりで表し、ならびに

40

【図50】免疫染色により測定されるところのdb/dbマウスの腎での空間的CCL2発現を示し；画像は、示されるところのそれぞれの群の6月齢マウスからの腎の代表的切片を具体的に説明する（元の倍率、200×）。

【図 9】

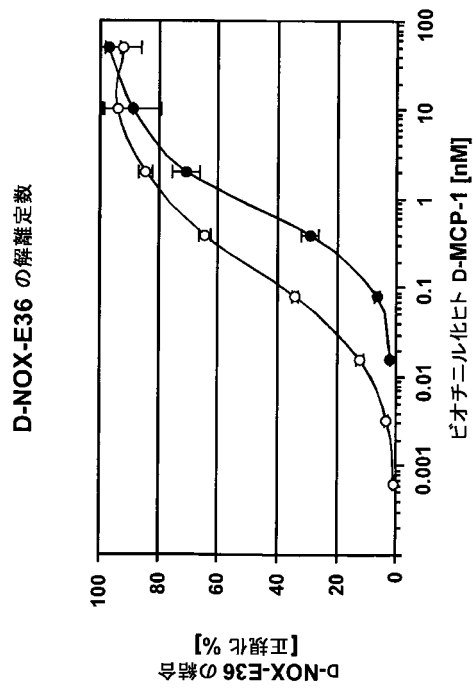


Fig. 9

【図 10】

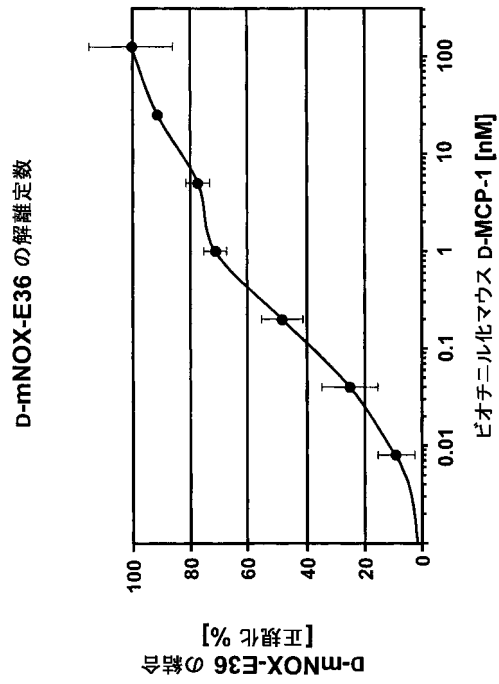


Fig. 10

【図 11】

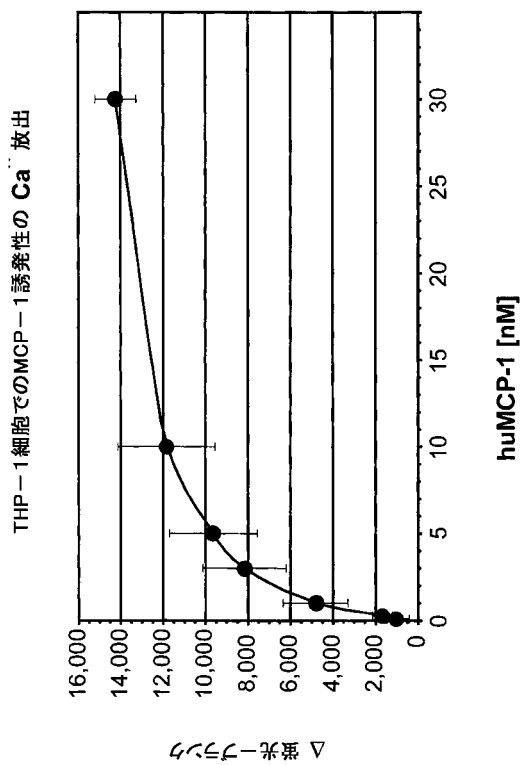


Fig. 11

【図 12】

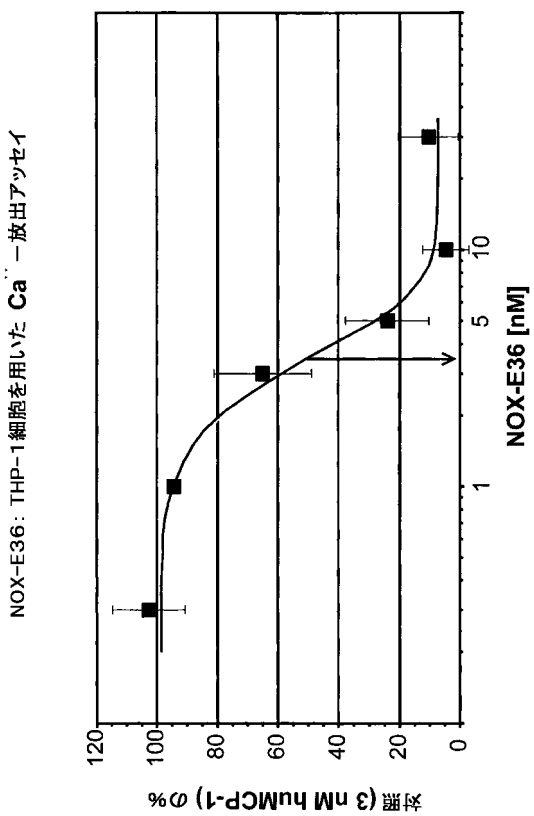
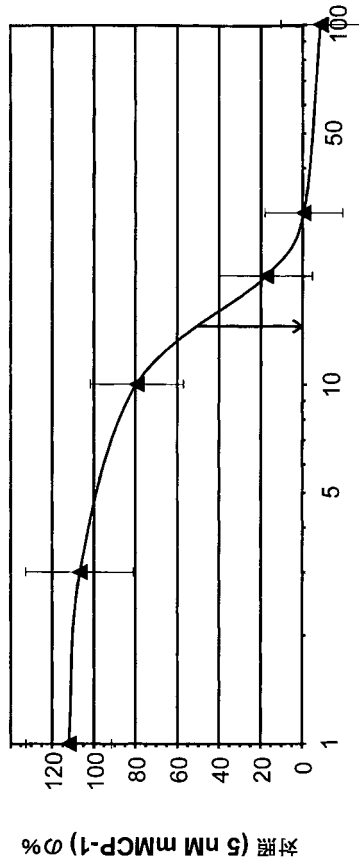


Fig. 12

【図 13】

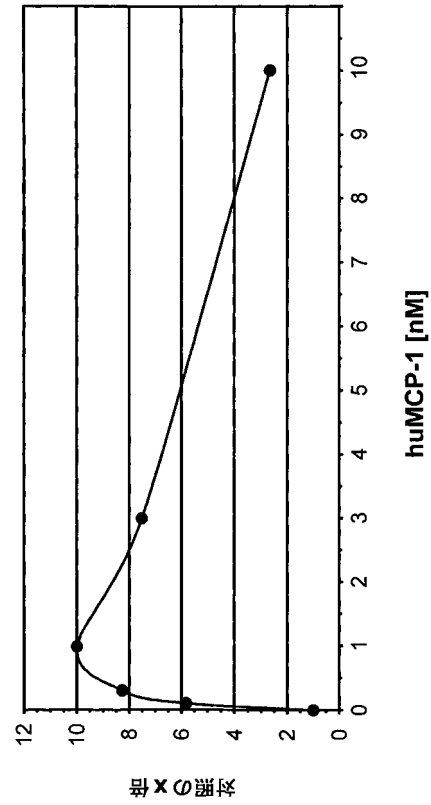
mNOX-E36: THP-1細胞を用いる Ca^{2+} -放出アッセイ

mNOX-E36 [nM]

Fig. 13

【図 14】

THP-1細胞のMCP-1誘発性の走化性

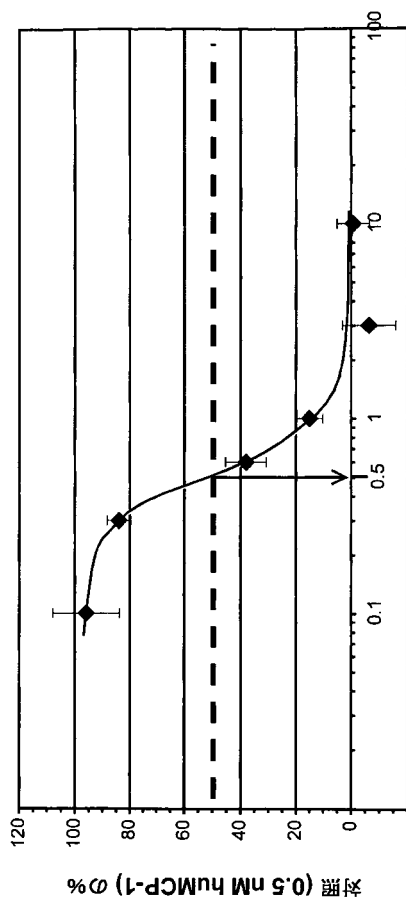


huMCP-1 [nM]

Fig. 14

【図 15】

NOX-E36: THP-1細胞を用いる走化性アッセイ

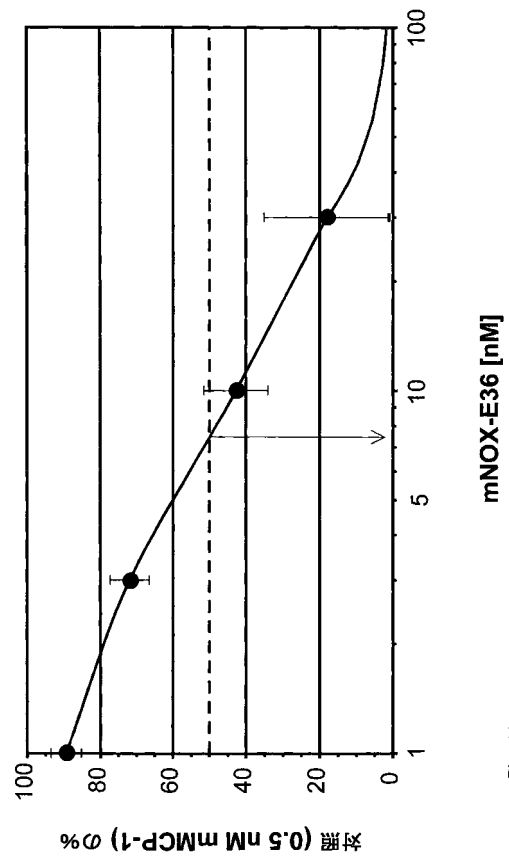


NOX-E36 [nM]

Fig. 15

【図 16】

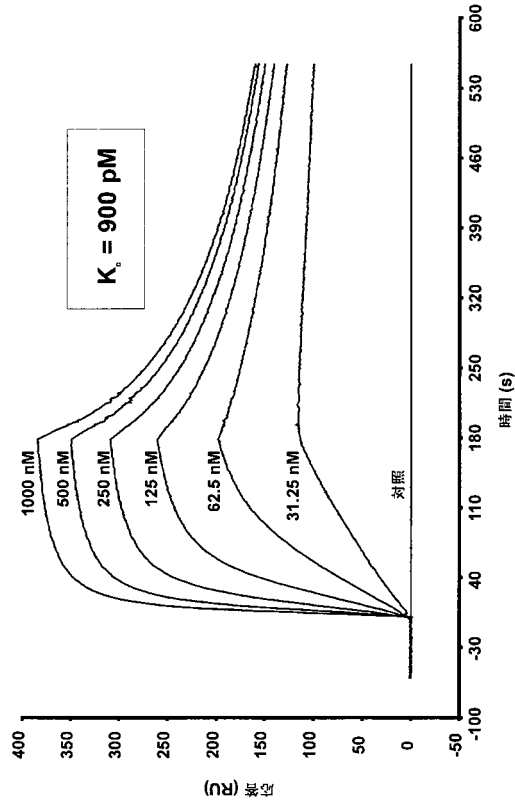
mNOX-E36: THP-1細胞を用いる走化性アッセイ



mNOX-E36 [nM]

Fig. 16

【図 17】



【図 18】

ヒトMCP-1へのシュベーパーゲルマール-NOX-E36結合のキネティクス

Fig. 17

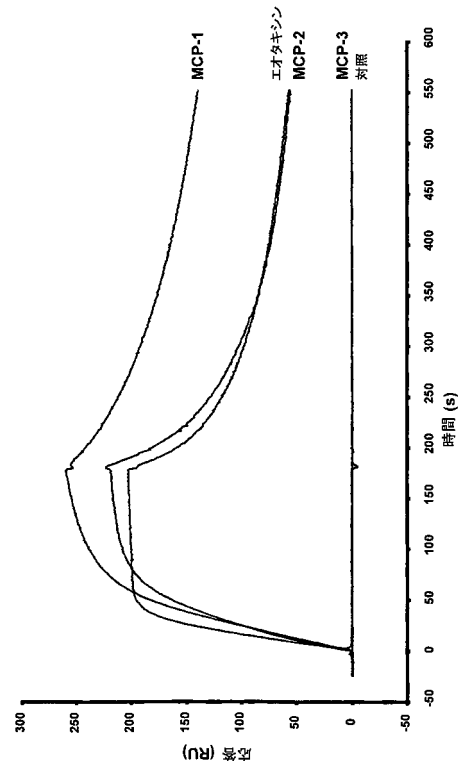
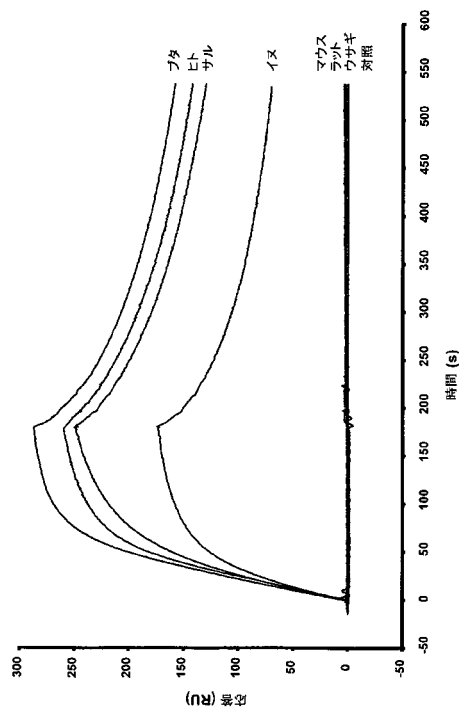


Fig. 18 ヒトMCPファミリータンパク質およびエオタキシンへのシュベーパーゲルマール-NOX-E36結合

【図 19】



多様な種からのMCP-1へのシュベーパーゲルマール-NOX-E36結合

Fig. 19

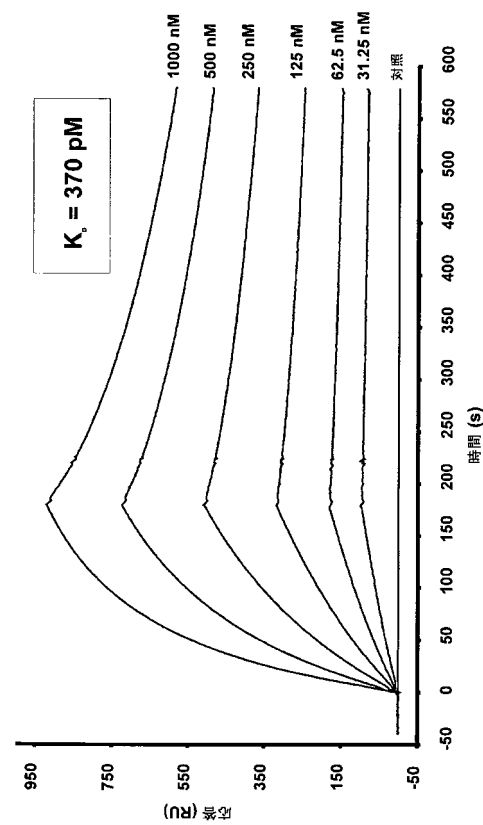


Fig. 20 ヒトMCP-1へのシュベーパーゲルマール-181-A2-O18結合のキネティクス

【図 2 1】

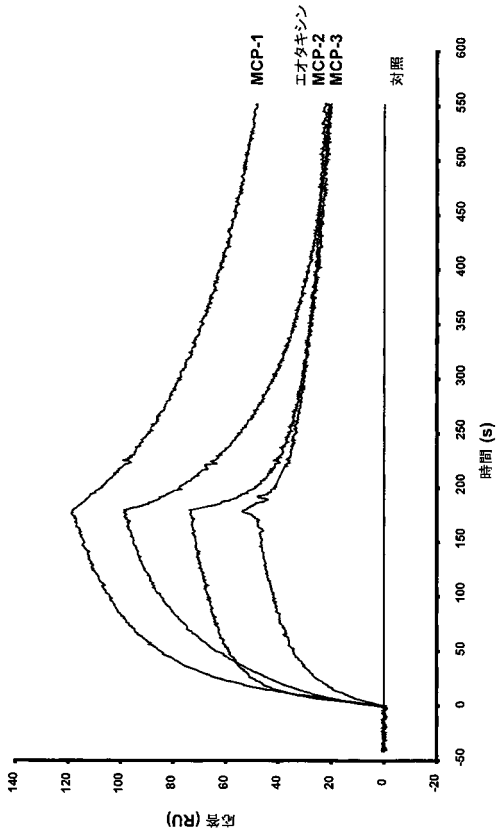


Fig. 21

【図 2 2】

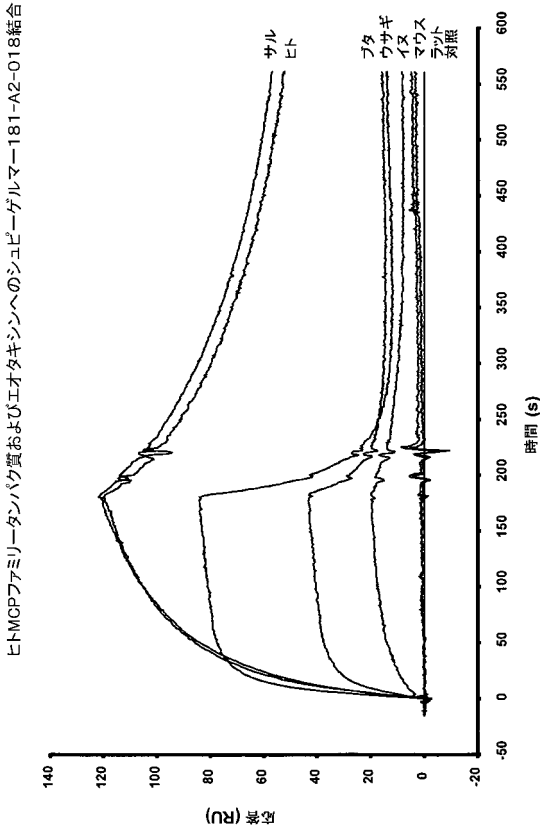


Fig. 22

多様な種からのMCP-1へのシュベীগーゲルマー181-A2-O18結合

【図 2 3】

1	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
2	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
3	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
4	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
5	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
6	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
7	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
8	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
9	GP--ASVPTCCFNLANRKLPIQLRLESYRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
10	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
11	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT
12	QPDALNAPVCCVFNFKISVORLASVRRITSSKCPKEAVIFKTIIVAKEICADPKQKWQDSNOHLDKQOTQPKT

タンパク質	ヒトMCP-1との同一性%
1 <i>Homo sapiens</i> MCP-1	100%
2 <i>Macaca mulatta</i> (マカサール) MCP-1	97%
3 <i>Sus scrofa</i> (ブタ) MCP-1	79%
4 <i>Equus caballus</i> (ウマ)	78%
5 <i>Canis familiaris</i> (イヌ) MCP-1	76%
6 <i>Oryctolagus cuniculus</i> (ウサギ) MCP-1	75%
7 <i>Bos Taurus</i> (ウシ)	72%
8 <i>Homo sapiens</i> MCP-3	71%
9 <i>Homo sapiens</i> エオタキシン	64%
10 <i>Homo sapiens</i> MCP-2	62%
11 <i>Mus musculus</i> (マウス) MCP-1	55%
12 <i>Rattus norvegicus</i> (ラット) MCP-1	55%

Fig. 23

【図 2 4 A】

NOX-E36および181-A2-O18の特異性

	NOX-E-036 K _D [nM]	181-A2-018 K _D [nM]
hMCP-1	0.89	0.37-0.6
hMCP-2	5-10	10
hMCP-3	-	10
エオタキシン	5-10	10-20
サル MCP-1	0.90	0.6
ブタ MCP-1	0.82	> 1000
イヌ MCP-1	1.2	> 1000
ウサギ MCP-1	-	> 1000
ラット MCP-1	-	-
マウス MCP-1	-	-

-, 結合しない

Fig. 24A

【図 24 B】

ケモカイン/同義語 結合

CCL1/I-309	-
CCL2/MCP-1	+
CCL3/MIP-1 α	+
CCL4/MIP-1 β	+
CCL5/RANTES	.*
CCL7/MCP-3	-
CCL8/MCP-2	+
CCL11/エオタキシン	+
CCL13/MCP-4	(+)
CCL14/HCC-1	-
CXCL1/GRO α	-
CXCL2/GRO β	-
CXCL3/GRO γ	-
CXCL4/PP4	.*
CXCL5/ENA-78	.*
CXCL6/GCP-2	.*
CXCL7/NAP-2	+
CXCL8/IL-8	-
CXCL9/MIG	.*
CXCL10/IP-10	-
CXCL11/I-TAC	.*
CXCL12 α /SDF-1 α	-
CXCL12 β /SDF-1 β	-
CX ₃ CL1/フラクタルカイン	-
XCCL1/リンホタクチン	-

結合を後に続くとおり分類した:

+, 特異的結合 < 10 nM;

(), NOX-E36 特異的結合 > 1 μ M;

-, 相互作用測定可能ではない;

.*, 非特異的ポリアニオン(PoC若しくはデキストランマトリックス)結合 > 250 nM;

.*, 非特異的ポリアニオン(PoC若しくはデキストランマトリックス)結合 > 10 μ M.

Fig. 24 B

【図 24 C】

	結合定数 K_D [nM]	解離速度定数 k_d [s ⁻¹]	結合速度定数 k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]
CCL2/MCP-1	1.1 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1 $\times 10^{-4}$	1.8 \pm 0.4 $\times 10^5$
CCL3/MIP-1 α	4.1 \pm 1.3	6.4 \pm 1.1 $\times 10^{-4}$	1.6 \pm 0.3 $\times 10^5$
CCL7/MCP-3	—	—	—
CCL8/MCP-2	4.2 \pm 2.5	6.7 \pm 2.0 $\times 10^{-4}$	2.0 \pm 0.7 $\times 10^5$
CCL11/エオタキシン	7.7 \pm 5.2	1.1 \pm 0.6 $\times 10^{-3}$	1.6 \pm 0.4 $\times 10^5$
CCL13/MCP-4	> 1,000	—	—
CXCL7/NAP-2	2.5 \pm 0.9	4.1 \pm 0.4 $\times 10^{-4}$	1.8 \pm 0.5 $\times 10^5$

Fig. 24 C

【図 24 D】

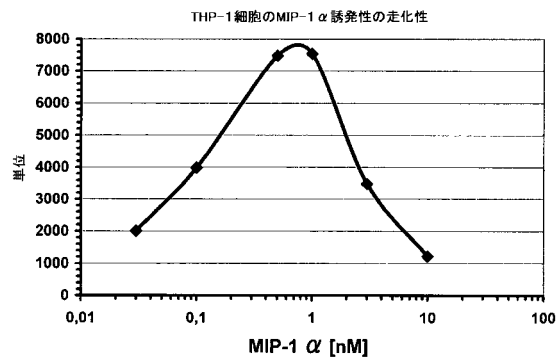


Fig. 24 D

【図 24 E】

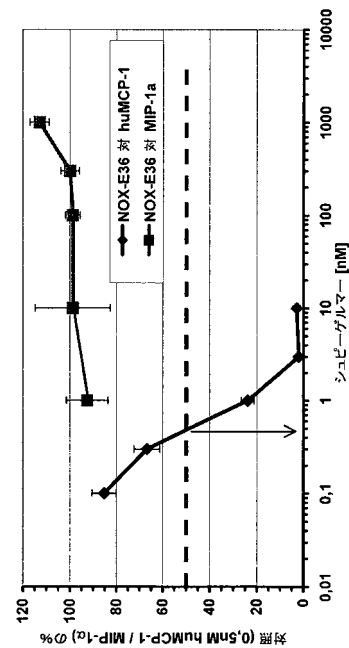
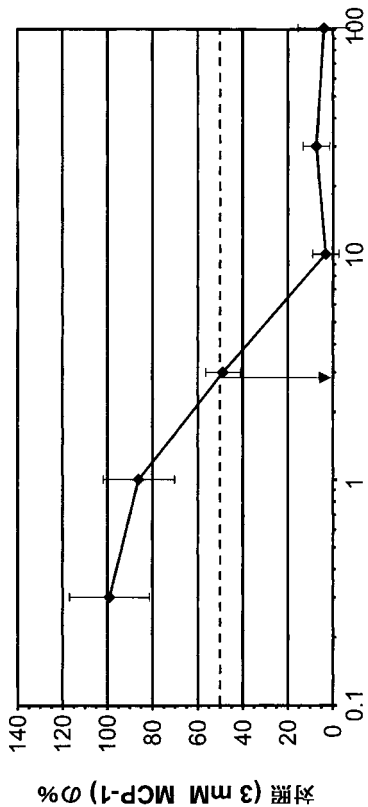


Fig. 24 E

【 図 2 5 】

NOX-E36-3'PEG: THP-1細胞を用いる Ca^{2+} -放出アッセイ



【 図 2 6 】

NOX-E36-3'PEG: THP-1細胞を用いる走化性アッセイ

NOX-E36-3'PEG [nM]

Fig. 25

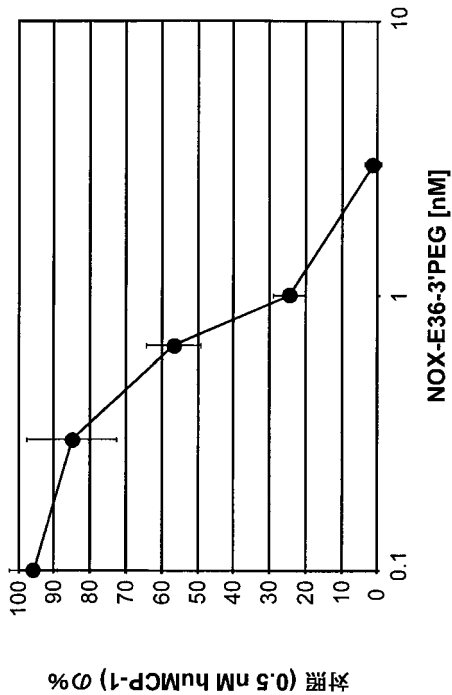
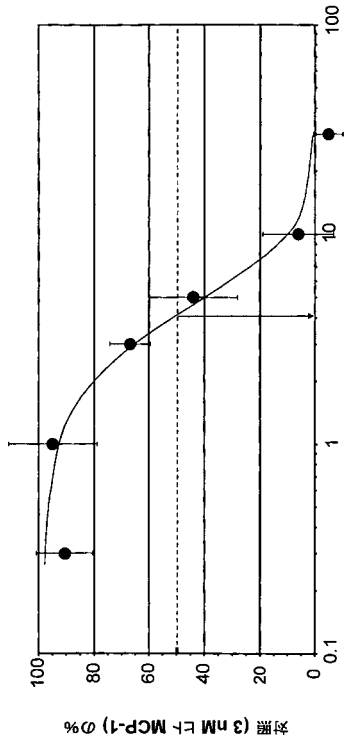


Fig. 26

【 図 2 7 A 】

NOX-E36-5'PEG: THP-1細胞を用いる Ca^{2+} -放出アッセイ



NOX-E36-5'PEG (nM)

Fig 27A

【 図 2 7 B 】

NOX-E36-5'PEG: THP-1細胞を用いる走化性アッセイ

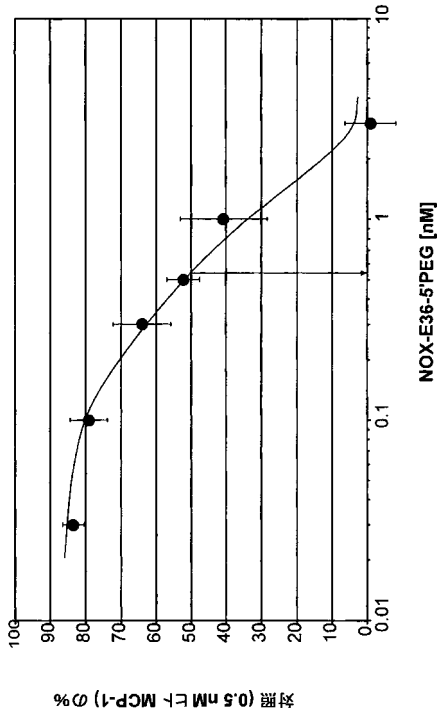
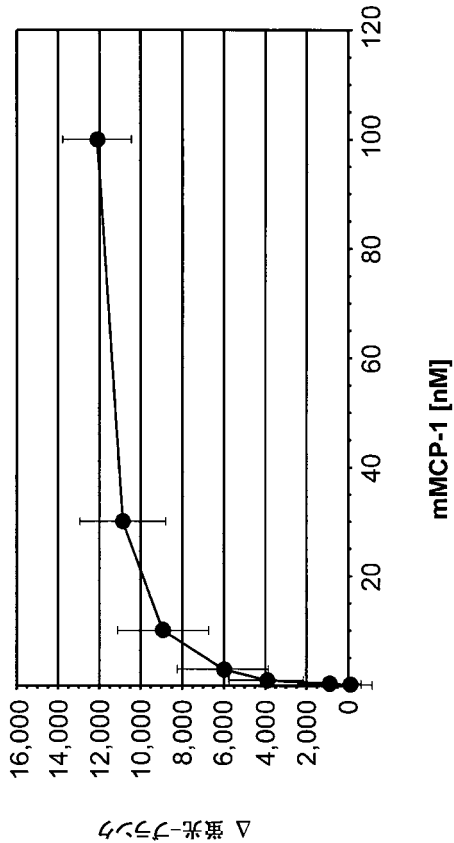


Fig 27B

【 図 2 8 】

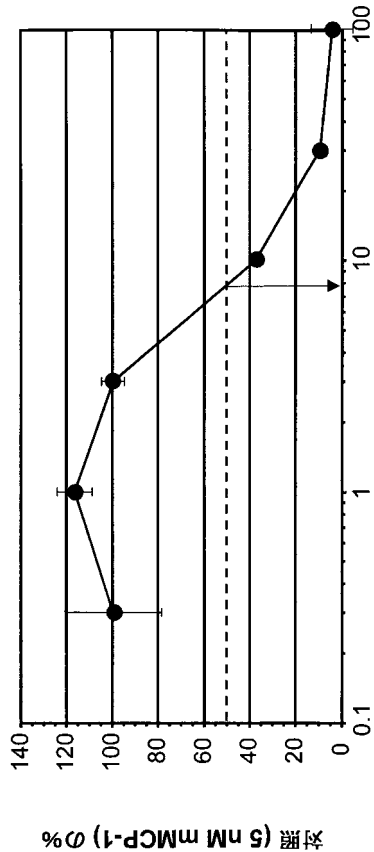
THP-1細胞でのマウスMCP-1 (mMCP-1) 誘発性の Ca^{2+} 放出



【 図 2 9 】

mNOX-E36-3'PEG: THP-1細胞を用いる Ca^{2+} -放出アッセイ

Fig. 28

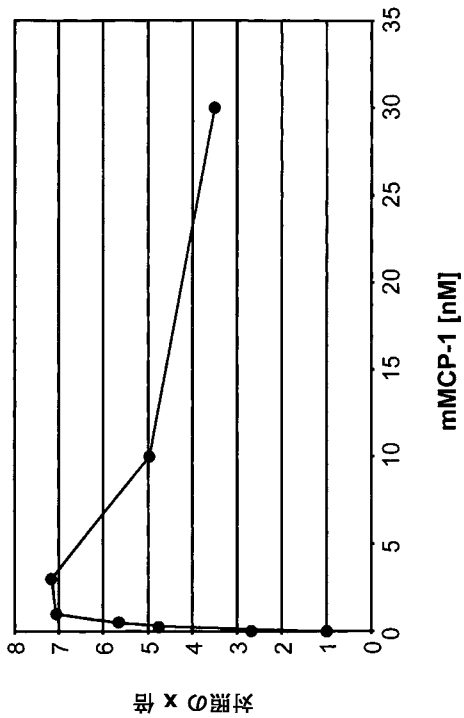


mNOX-E36-3'PEG [nM]

Fig. 29

【 図 3 0 】

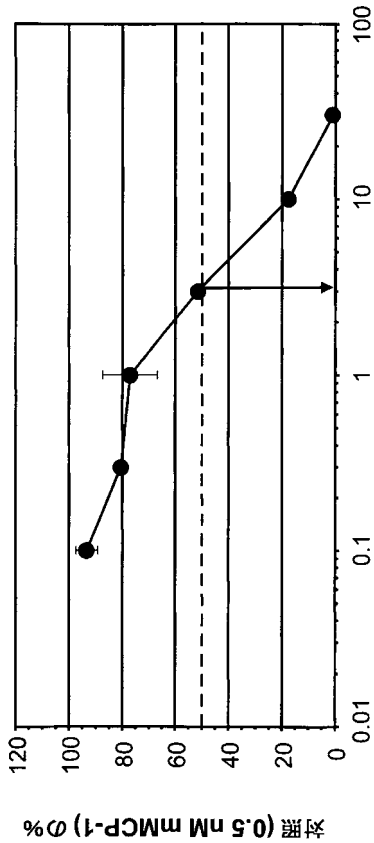
THP-1細胞のマウスMCP-1 (mMCP-1) 誘発性の走化性



【 図 3 1 】

mNOX-E36-3'PEG: THP-1細胞を用いる走化性アッセイ

Fig. 30



mNOX-E36-3'PEG [nM]

Fig. 31

【図 3 2】

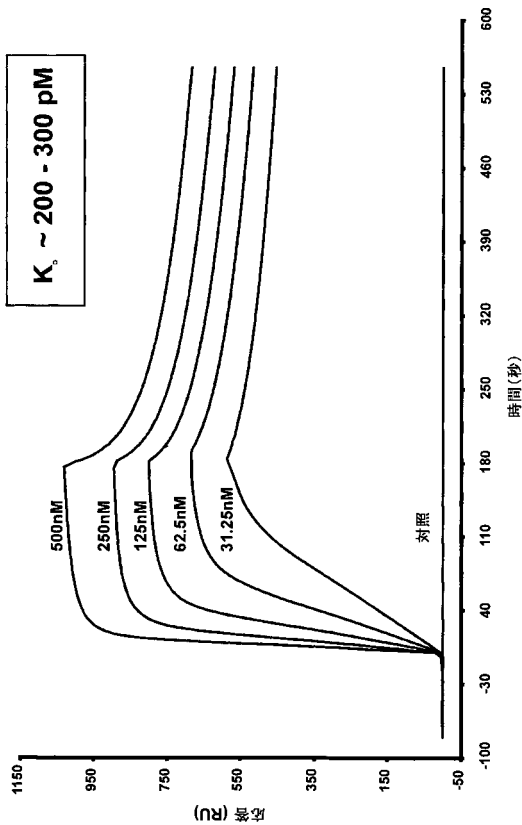


Fig. 32 マウス_D-MCP-1へのD-mNOX-E36結合のキネティクス

【図 3 3】

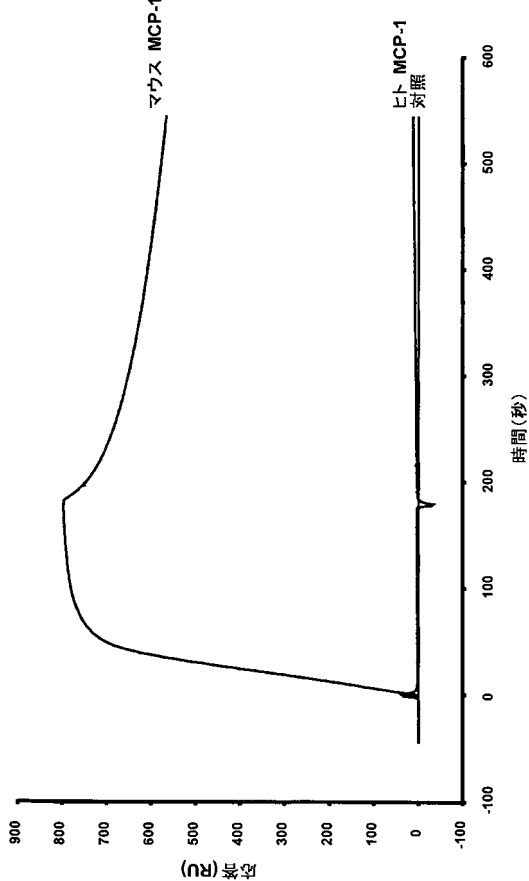


Fig. 33 マウスおよびヒトMCP-1へのD-mNOX-E36結合

【図 3 4】

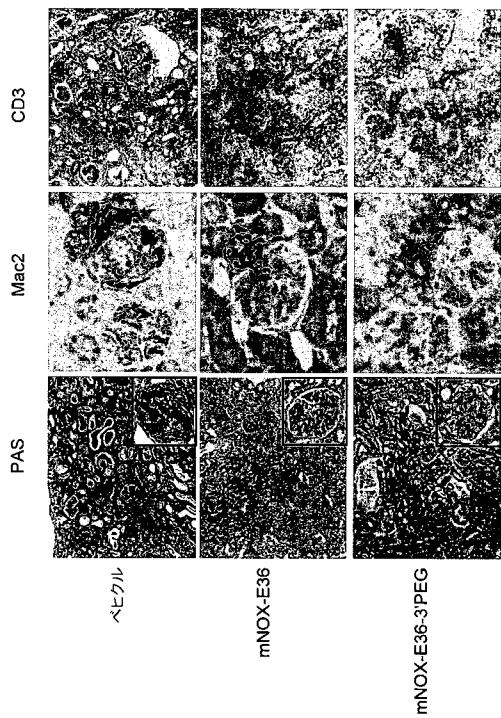


Fig. 34

【図 3 5】

腎疾患	ベヒクル	PoC	mNOX-E36	PoC-PEG	mNOX-E36-3'PEG
GFR [μ l/分]	179 \pm 41	200 \pm 49	245 \pm 69	157 \pm 74	293 \pm 72
Uアルブミン/クレアチニン比	15.6 \pm 10.1	4.3 \pm 1.4	6.8 \pm 1.8	3.8 \pm 0.5	2.4 \pm 0.7
IgG ₁ [glom. スコア]	1.5 \pm 0.4	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.5
IgG _{2a} [glom. スコア]	0.9 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3
活動度指標 [スコア]	17.4 \pm 4.9	17.8 \pm 4.2	10.3 \pm 5.0*	17.4 \pm 2.7	9.4 \pm 4.2*
慢性性指標 [スコア]	6.0 \pm 2.0	7.2 \pm 2.6	2.6 \pm 2.5	5.4 \pm 1.0	1.6 \pm 1.8*
Mac-2+ [細胞/glom]	13.4 \pm 2.0	12.6 \pm 0.9	8.5 \pm 2.3*	13.6 \pm 2.3	8.2 \pm 3.5*
Mac-2+ [細胞/hpf]	20.3 \pm 8.1	20.6 \pm 6.7	10.8 \pm 5.1	19.3 \pm 3.7	7.7 \pm 4.0*
CD3+ [細胞/hpf]	44.6 \pm 14.7	39.4 \pm 7.5	23.8 \pm 10.2	36.2 \pm 3.1	19.0 \pm 8.0*
脾臓重 [スコア]	1.6 \pm 0.8	1.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.5*	1.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.5*
皮膚病変 [マウスの%]	60	60	28	80	28

Uアルブミン/クレアチニン比 = μ g/mgでの尿アルブミン/クレアチニン比、値は平均 \pm SEMである。* $p < 0.05$ シュエーデンマー対それぞれのPoC対照

Fig. 35

【図 36】

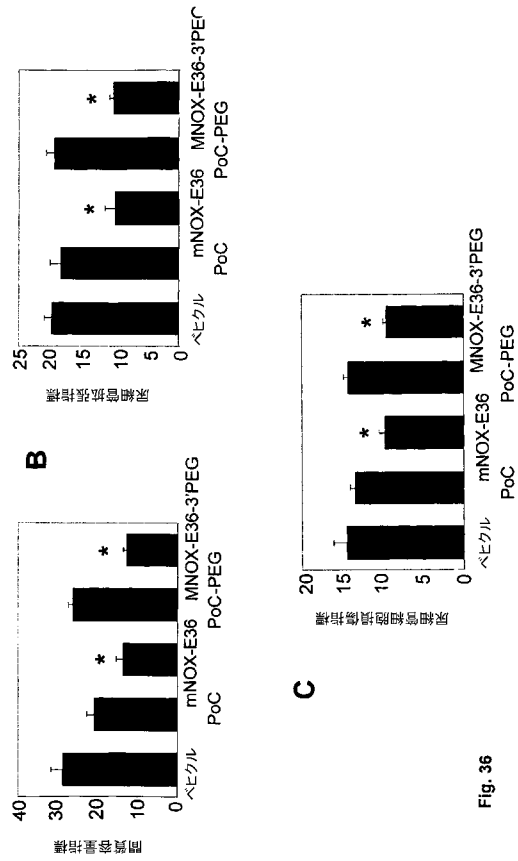


Fig. 36

【図 37】

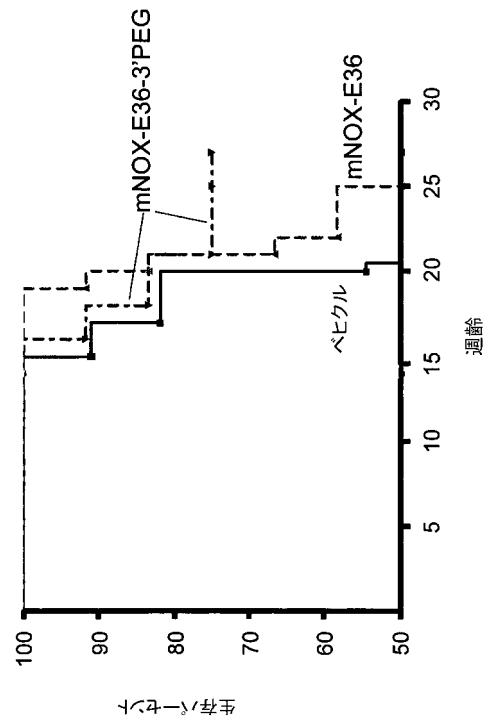


Fig. 37

【図 38】

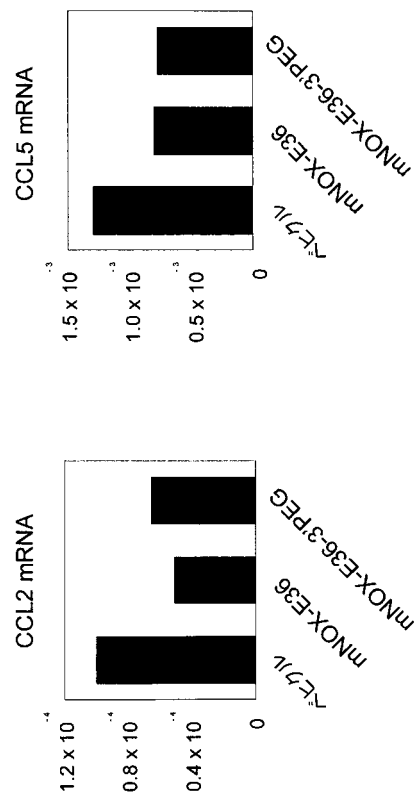


Fig. 38

【図 39】

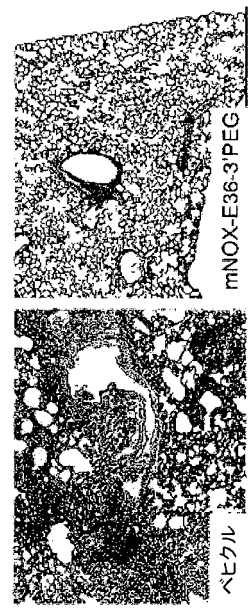


Fig. 39

【 図 4 0 】



Fig. 40

【 図 4 1 】

リンパ球増殖	ベヒクル	PoC	mNOX-E36	PoC-PEG	mNOX-E36-3'PEG
脾重量 [% BW]	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.3
LN 重量 [% BW]	2.3 ± 0.7	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.7
血清抗 dsDNA					
IgG ₁ [μg/ml]	11.7 ± 3.6	7.5 ± 2.8	11.7 ± 3.4	8.2 ± 1.2	6.6 ± 1.2
IgG _{2a} [μg/ml]	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.2
IgG _{2b} [μg/ml]	17.6 ± 5.6	18.9 ± 5.2	22.6 ± 3.3	28.3 ± 2.5	20.6 ± 3.8

LN = 巨大な脾臓リンパ節、値は平均 ± SEMである

Fig. 41

【 図 4 2 】

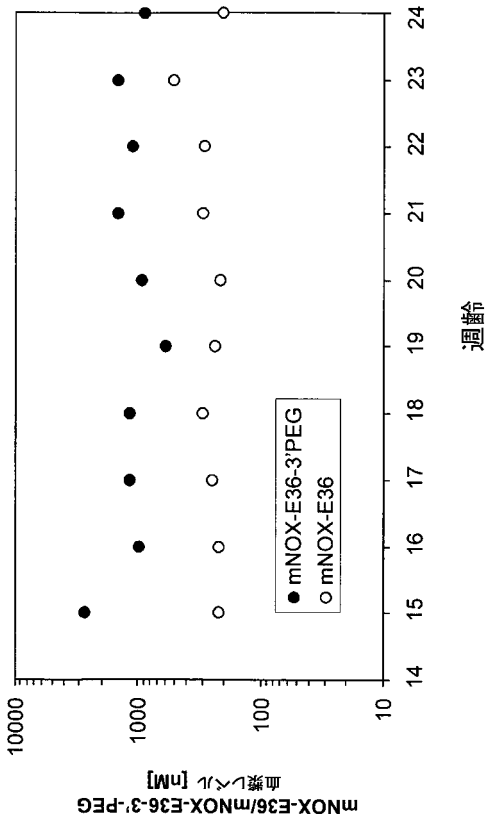


Fig. 42

【 図 4 3 】

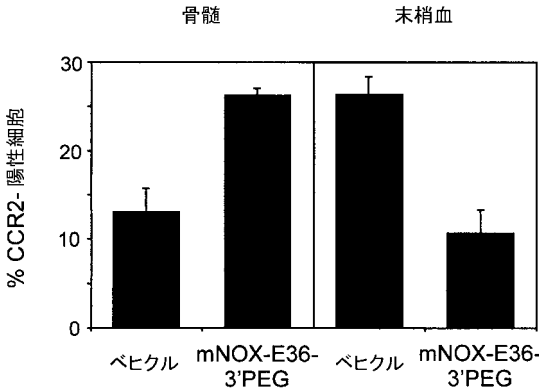


Fig. 43

【図 4 4】

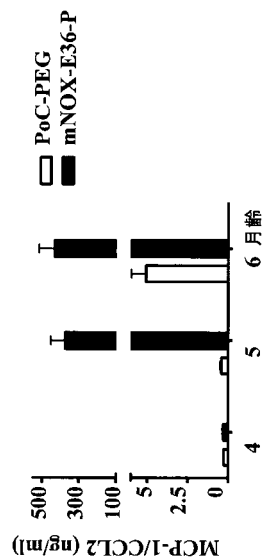


Fig. 44

【図 4 5】

		2K		1K	
		野生型	db/db	db/db	db/db
		ゼロ	ゼロ	PoC-PEG	mNOX-E36-3'PEG
細胞応答 [細胞/糸球体若しくはmpf]	糸球体				
	Mac-2+ 細胞	0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	5.0 ± 0.7*	3.5 ± 0.3*
	Ki-67+ 細胞	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.4 ± 0.2*	1.1 ± 0.2*
間質	Mac-2+ 細胞	3.2 ± 0.3	8.6 ± 1.0	19.2 ± 2.8*	12.3 ± 1.2*

値は平均±SEMであり； *、p<0.05 1K db/db対2K db/db、#、p<0.05 mNOX-E36-3' PEG対PoC-PEG

Fig. 45

【図 4 6】

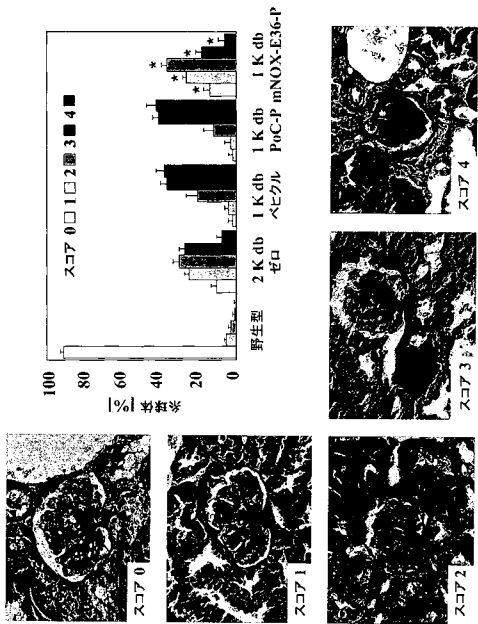


Fig. 46

【図 4 7】

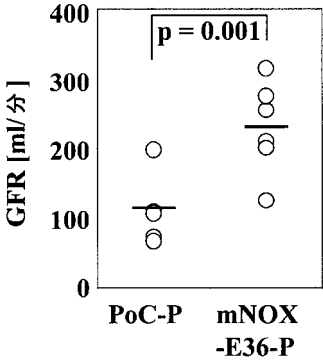


Fig. 47

【図 48】

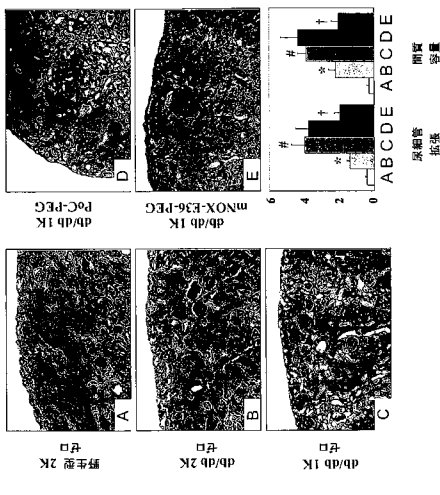


Fig. 48

【図 49】

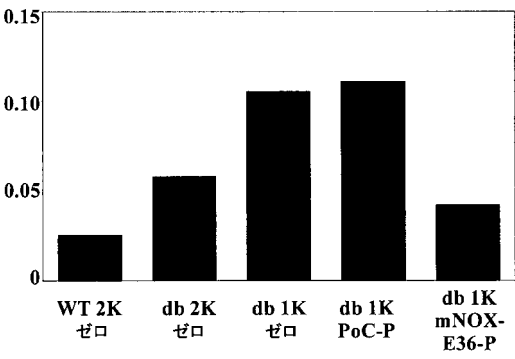


Fig. 49

【図 50】

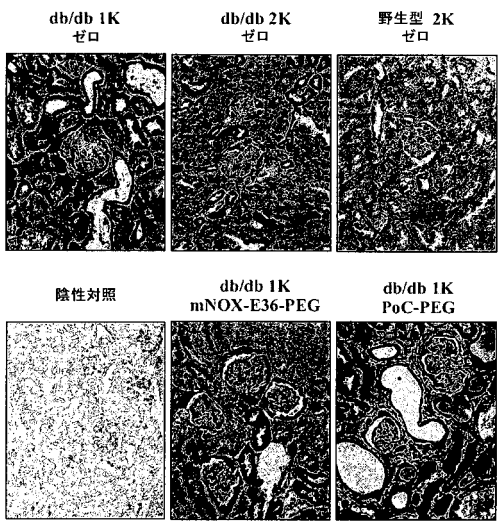


Fig. 50

【配列表】

0005537812000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	15/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/08	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
			G 0 1 N	33/50	Z
			G 0 1 N	33/53	M

- (72)発明者 オイルベルク, デイルク
ドイツ 1 0 4 3 7 ベルリン・シュリーマンシュトラッセ 1 7
- (72)発明者 クルスマン, スフエン
ドイツ 1 0 7 0 9 ベルリン・パウルスボルナーシュトラッセ 8 3
- (72)発明者 ブシュナー, クラウス
ドイツ 1 4 1 9 7 ベルリン・アスマンシャウザーシュトラッセ 3
- (72)発明者 マーシュ, クリステイアン
ドイツ 1 3 5 0 9 ベルリン・エルンストシュトラッセ 2 7

審査官 鈴木 崇之

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 1 0 8 4 3 1 (WO, A 1)
特表 2 0 0 6 - 5 0 1 8 6 4 (JP, A)
国際公開第 0 0 / 0 3 8 7 1 4 (WO, A 1)
特表 2 0 0 5 - 5 1 2 9 7 8 (JP, A)
国際公開第 0 3 / 0 3 5 6 6 5 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 0 5 / 0 8 4 4 1 2 (WO, A 1)
FEBS Lett., 2 0 0 1 年, Vol.506, No.2, P.85-90

Nucl. Acids Res. , 2 0 0 5 年 , Vol.33, No.4 , P.1-10

Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 2 0 0 4 年 , Vol.101, No.36 , P.13174-13179

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 6 8

P u b M e d

T h o m s o n I n n o v a t i o n