

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509705

(P2015-509705A)

(43) 公表日 平成27年4月2日(2015.4.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 15/115 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00 H	4 C O 8 6
<b>C O 7 K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/47	4 H O 4 5
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-551570 (P2014-551570)	(71) 出願人	509019004 ノクソン・ファルマ・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国, 10589 ベルリン マックス-ドルン-シュトラッセ 8-10
(86) (22) 出願日	平成25年1月10日 (2013.1.10)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成26年9月10日 (2014.9.10)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/000056	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02013/104540	(74) 代理人	100114591 弁理士 河村 英文
(87) 国際公開日	平成25年7月18日 (2013.7.18)		
(31) 優先権主張番号	12000106.0		
(32) 優先日	平成24年1月10日 (2012.1.10)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	12006960.4		
(32) 優先日	平成24年10月8日 (2012.10.8)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2012/000089		
(32) 優先日	平成24年1月10日 (2012.1.10)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な C 5 A 結合性核酸

## (57) 【要約】

本発明は、ヒト C 5 a に結合することができる核酸分子に関し、核酸分子は中心ストレッチのヌクレオチドを含み、中心ストレッチのヌクレオチドは 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA3' (配列番号 61) のヌクレオチド配列を含み、n<sub>1</sub> は、U または dU であり、n<sub>2</sub> は、G または dG であり、n<sub>3</sub> は、A または dA であり、n<sub>4</sub> は、U または dU であり、n<sub>5</sub> は、U または dU であり、かつ G、A、U、C、H、K および R は リボヌクレオチドであり、かつ dU、dG および dA は、2' - デオキシリボヌクレオチドである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒトC5aに結合することができる核酸分子であって、前記核酸分子が中心ストレッチのヌクレオチドを含み、前記中心ストレッチのヌクレオチドが

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号61]のヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであり、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ

G、A、U、C、H、KおよびRは、リボヌクレオチドであり、かつ

dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、核酸分子。

10

## 【請求項2】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

a) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号62]、

b) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号63]、

c) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号64]、

d) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号65]、

20

e) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号66]、

f) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGAUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号67]、および

g) 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGCUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGAC  
GCA 3' [配列番号68]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであり、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ

G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ

30

dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項1に記載の核酸分子。

## 【請求項3】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号65]のヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであり、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ

G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ

dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項2に記載の核酸分子。

40

## 【請求項4】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

a) 5' AUGdUGGUGGUGGAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA  
3' [配列番号73]、

b) 5' AUGUGGUGGUGdGAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA  
3' [配列番号74]、

c) 5' AUGUGGUGGUGdAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA  
3' [配列番号75]、

d) 5' AUGUGGUGGUGGAAGGGUUGUUUGGGdUGUCGACGCA

50

3' [ 配列番号 76 ]、

e) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA

3' [ 配列番号 77 ]、

f) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 78 ]、

g) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA

3' [ 配列番号 79 ]、

h) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

3' [ 配列番号 80 ]、

i) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

A 3' [ 配列番号 81 ]、

j) 5' AUGdUGGUGGUGdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

CA 3' [ 配列番号 82 ]、

k) 5' AUGdUGGUGGUGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

CA 3' [ 配列番号 83 ]、

l) 5' AUGdUGGUGGUGdGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

GCA 3' [ 配列番号 84 ]

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

好ましくは、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3' 20

' [ 配列番号 78 ] または

5' AUGdUGGUGGUGdGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA

A 3' [ 配列番号 84 ]

である、請求項 3 に記載の核酸分子。

#### 【請求項 5】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGUUGUUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA

A 3' [ 配列番号 66 ] のヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub> は、U または dU であり、n<sub>2</sub> は、G または dG であり、n<sub>3</sub> は、A または dA であり、n<sub>4</sub> は、U または dU であり、n<sub>5</sub> は、U または dU であり、かつ 30

G、A、U および C は、リボヌクレオチドであり、かつ

dU、dG および dA は、2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 2 に記載の核酸分子。

#### 【請求項 6】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGAUGUUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA

A 3' [ 配列番号 67 ] のヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub> は、U または dU であり、n<sub>2</sub> は、G または dG であり、n<sub>3</sub> は、A または dA であり、n<sub>4</sub> は、U または dU であり、n<sub>5</sub> は、U または dU であり、かつ 40

G、A、U および C は、リボヌクレオチドであり、かつ

dU、dG および dA は、2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 2 に記載の核酸分子。

#### 【請求項 7】

前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGCA

A 3' [ 配列番号 64 ] のヌクレオチド配列を含み、

n<sub>1</sub> は、U または dU であり、n<sub>2</sub> は、G または dG であり、n<sub>3</sub> は、A または dA であり、n<sub>4</sub> は、U または dU であり、n<sub>5</sub> は、U または dU であり、かつ 50

G、A、U および C は、リボヌクレオチドであり、かつ

dU、dG および dA は、2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 2 に記載の核



あり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

h) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

i) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

j) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

k) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

l) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、Sであり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

m) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、Sであり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

n) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、Cであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

o) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

p) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

q) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、不在であり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在である、

請求項10に記載の核酸分子。

【請求項12】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCUG3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CAGGC3'または5'dCAGGC3'のヌクレオチド配列を含み、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ

dCは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項10または11に記載の核酸分子。

【請求項13】

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGGC3'のヌクレオチド配列を含む、請求項12に記載の核酸分子。

【請求項14】

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CAGGC3'のヌクレオチド配列を含む、請求項12に記載の核酸分子。

【請求項15】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CCUG3'または5'CUG3'または5'UG3'または5'G3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGGC3'のヌクレオチド配列を含み、

10

20

30

40

50

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dCは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項10または11に記載の核酸分子。

【請求項16】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CCUG3'のヌクレオチド配列を含む、

請求項15に記載の核酸分子。

【請求項17】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CUG3'のヌクレオチド配列を含む、

請求項15に記載の核酸分子。

【請求項18】

a)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCUG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGC3'のヌクレオチド配列を含むか、または

b)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGGC3'のヌクレオチド配列を含むか、または

c)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GGCG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGCC3'のヌクレオチド配列を含む、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ

dCは、2'-デオキシリボヌクレオチドである、

請求項10または11に記載の核酸分子。

【請求項19】

第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GGCG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGCC3'のヌクレオチド配列を含む、

請求項18に記載の核酸分子。

【請求項20】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CUG3'または5'UG3'または5'CG3'または5'G3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGC3'のヌクレオチド配列を含む、

C、A、GおよびUが、リボヌクレオチドであり、かつ

dCが、2'-デオキシリボヌクレオチドである、

請求項10または11に記載の核酸分子。

【請求項21】

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCUG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAC3'または5'dCC3'または5'dCA3'のヌクレオチド配列を含み、

C、A、GおよびUが、リボヌクレオチドであり、かつ

dCが、2'-デオキシリボヌクレオチドである、

請求項10または11に記載の核酸分子。

【請求項22】

a)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GUG3'のヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' U G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

g) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

h) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

i) 前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C G C 3' のヌクレオチド配列を含み、

C、A、G および U は、リボヌクレオチドであり、かつ

d C は、2' - デオキシリボヌクレオチドである、

請求項 10 または 11 に記載の核酸分子。

【請求項 23】

前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、請求項 22 に記載の核酸分子。

【請求項 24】

前記核酸分子が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 90 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 90 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に対する少なくとも 85% の同一性を有する核酸分子を含むか、または配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 90 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同である核酸分子を含み、相同性は少なくとも 85% である、請求項 1 ~ 3、5 ~ 7、9 ~ 12 および 14 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

## 【請求項 25】

前記核酸分子が、配列番号 14、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 37、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 91 および配列番号 92 の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または 14、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 37、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 91 および配列番号 92 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に対する少なくとも 85% の同一性を有する核酸分子を含むか、または 14、配列番号 21、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 37、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 60、配列番号 91 および配列番号 92 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同である核酸分子を含み、相同性は少なくとも 85% である、請求項 1 ~ 4、8 および 10 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

10

## 【請求項 26】

前記核酸分子がヒト C5a およびマウス C5a に結合することができる、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

## 【請求項 27】

前記核酸分子が、ヒト C5a およびマウス C5a に結合することができる少なくとも 1 つの結合部分を含み、そのような結合部分は、L-ヌクレオチドからなる、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

## 【請求項 28】

前記核酸分子のヌクレオチドまたは前記核酸分子を形成するヌクレオチドが、L-ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

20

## 【請求項 29】

前記核酸分子が L-核酸分子である、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

## 【請求項 30】

前記核酸が、ヒトおよび/またはマウスの C5a により媒介される活性のアンタゴニストである、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

## 【請求項 31】

前記核酸分子は修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物からの排出速度は、前記修飾基を含まない核酸と比較して減少する、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

30

## 【請求項 32】

前記核酸分子は修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物における保持時間は、前記修飾基を含まない核酸分子と比較して増加する、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

## 【請求項 33】

前記修飾基は、生分解性修飾および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは、前記修飾基は、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分岐ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンブレン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される、請求項 31 または 32 に記載の核酸分子。

40

## 【請求項 34】

前記修飾基はポリエチレングリコールであり、好ましくは直鎖ポリエチレングリコールまたは分岐ポリエチレングリコールからなり、前記ポリエチレングリコールの分子量は好ましくは約 20,000 ~ 約 120,000 Da であり、より好ましくは約 30,000 ~ 約 80,000 Da であり、最も好ましくは約 40,000 Da である、請求項 33 に記載の核酸分子。

## 【請求項 35】

前記修飾基はヒドロキシエチルデンブレンであり、好ましくは前記ヒドロキシエチルデン

50

ブンの分子量は約 50 ~ 約 1000 kDa であり、より好ましくは約 100 ~ 約 700 kDa であり、最も好ましくは 200 ~ 500 kDa である、請求項 33 に記載の核酸分子。

【請求項 36】

前記修飾基は、前記核酸分子にリンカーを介して結合し、好ましくは、前記リンカーは生分解性リンカーである、請求項 31 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 37】

前記修飾基は、前記核酸分子の 5' 末端のヌクレオチドおよび / もしくは 3' 末端のヌクレオチドに、ならびに / または前記核酸分子の 5' 末端のヌクレオチドと前記核酸分子の 3' 末端のヌクレオチドとの間の前記核酸分子のヌクレオチドに結合する、請求項 31 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

10

【請求項 38】

前記生物は、動物またはヒトの身体であり、好ましくはヒトの身体である、請求項 31 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 39】

疾患を治療および / または予防するための方法において使用するための、請求項 1 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 40】

疾患は、補体活性化および C5a 媒介性発症機構に関連があり、かつ / または、自己免疫性疾患、炎症性疾患、全身性炎症反応症候群、眼疾患、虚血 / 再灌流傷害、臓器移植後臓器機能障害、移植片拒絶、心血管疾患、呼吸器疾患、急性反応、感染性疾患、神経性疾患、神経変性疾患、線維性疾患、血液疾患、代謝性疾患、腫瘍、および生体材料による補体活性化に関連する臨床的合併症を含む群から選択され、好ましくは、前記全身性炎症反応症候群は、敗血症および外傷または重度の熱傷の二次的損傷を含む群から選択される、請求項 39 に記載の核酸分子。

20

【請求項 41】

請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項で定義された核酸分子および場合によりさらなる構成要素を含む医薬組成物であって、さらなる構成要素は、薬学的に許容できる賦形剤、薬学的に許容できる担体および薬学的に活性な薬剤を含む群から選択される医薬組成物。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項で定義された核酸分子と、薬学的に許容できる担体とを含む、請求項 41 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 43】

医薬品を製造するための、請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 44】

医薬品が、ヒト用医薬における使用のためのものまたは獣医用医薬における使用のためのものである、請求項 43 に記載の使用。

【請求項 45】

診断手段を製造するための、請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 46】

前記医薬品が、自己免疫性疾患、炎症性疾患、全身性炎症反応症候群、眼疾患、虚血 / 再灌流傷害、臓器移植後臓器機能障害、移植片拒絶、心血管疾患、呼吸器疾患、急性反応、感染性疾患、神経性疾患、神経変性疾患、線維性疾患、血液疾患、代謝性疾患、腫瘍、および生体材料による補体活性化に関連する臨床的合併症の治療および / または予防のためのものであり、好ましくは、前記全身性炎症反応症候群は、敗血症および外傷または重度の熱傷の二次的損傷を含む群から選択される、請求項 43 に記載の使用。

40

【請求項 47】

請求項 1 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の核酸分子ならびに C5a を含む複合体であって、好ましくは、結晶性である複合体。

【請求項 48】

50

C 5 aを検出するための、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 4 9】

C 5 aにより媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングするための方法であって、

C 5 aにより媒介される活性の候補アンタゴニストを提供するステップと、

請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子を提供するステップと、

C 5 aにより媒介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルを発生する試験系を提供するステップと

C 5 aにより媒介される活性の候補アンタゴニストが、C 5 aにより媒介される活性のアンタゴニストであるかどうかを決定するステップと

を含む方法。

【請求項 5 0】

請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の核酸分子と、少なくとも指示書または反応槽とを含む、C 5 aの検出のためのキット。

【請求項 5 1】

試料中の、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸を検出するための方法であって、

a) 捕捉プローブおよび検出プローブを準備するステップであって、前記捕捉プローブは、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子の第 1 の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示し、前記検出プローブは、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子の第 2 の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示すか、あるいは、前記捕捉プローブは、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子の第 2 の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示し、前記検出プローブは、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子の第 1 の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示すステップと、

b) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを別々にまたは組み合わせて、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された前記核酸分子を含有する試料または請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された前記核酸分子を含有すると推定される試料に添加するステップと、

c) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された前記核酸分子またはその部分と同時にまたは任意の順番で順次に反応させるステップと、

d) 任意選択的に、前記捕捉プローブがステップ a) で準備された請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された前記核酸分子とハイブリダイズするか否かを検出するステップと、

e) 請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された前記核酸分子ならびに前記捕捉プローブおよび前記検出プローブからなる、ステップ c) で形成された複合体を検出するステップと

を含む方法。

【請求項 5 2】

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を、支持体、好ましくは、固体の支持体に固定化する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

ステップ c) で形成された複合体の一部ではない検出プローブはいずれも、反応から除去され、したがって、ステップ e) において、複合体の一部である検出プローブのみが検出される、請求項 5 1 または 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ステップ e) が、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項で定義された核酸分子またはその一部が存在する場合と、前記核酸またはその一部が存在しない場合とで、捕捉プローブおよび検出プローブがハイブリダイズしたときに検出手段が発生させるシグナルを比較するステップを含む、請求項 5 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、C5aおよび/C5に結合することができる核酸分子、医薬品、診断薬および検出薬をそれぞれ製造するためのその使用、前記核酸分子を含む組成物、前記核酸分子を含む複合体、前記核酸分子を使用して、C5aおよび/C5により媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングするための方法、ならびに前記核酸分子を検出するための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトアナフィラトキシンC5a（補体因子5a；SwissProtエントリー：P01031）の一次構造が、1978年に決定された（FernandezおよびHugli、1978）。これは、8,200Daの分子量に相当する74個のアミノ酸からなり、一方、炭水化物部分は、およそ3,000Daに相当する。C5aの炭水化物部分は、64位においてアスパラギンにつながる単一の複雑なオリゴ糖単位として存在する。3つのジスルフィド結合が、分子に安定で硬直な構造をもたらす。

## 【0003】

異なる哺乳動物種からのC5aの形態の三次元構造は一般に維持されているが、アミノ酸配列は、進化の間にそれほど十分には保存されてきたとはいえない。配列アライメントの結果から、ヒトC5aおよびマウスC5aとは、64%の全体的な配列同一性が実証されている。ヒトC5aは、C5aとは、以下に示すパーセントで同一のアミノ酸を共有している。

・ Macaca mulatta（アカゲザル）	85%
・ Macaca fascicularis（カニクイザル）	85%
・ Bos taurus（ウシ）	69%
・ Sus scrofa（ブタ）	68%
・ Mus musculus（マウス）	64%
・ Rattus norvegicus（ラット）	61%

## 【0004】

配列相同性が限られている以外に、グリコシル化も異種である。ヒトC5aはアスパラギン64でグリコシル化されるが、マウス相同体は全くグリコシル化されない。より遠縁のヒトタンパク質であるC3aおよびC4aは、C5aとわずが35および40%の同一性をそれぞれ共有するに過ぎない。

## 【0005】

前世紀の始めに、補体系が、細胞および細菌の抗血清媒介性溶解を「補完する」熱感受性血清画分として発見された。補体系は、生来の非特異的（自然）免疫応答の液性構成成分であり、感染病原体に対する宿主防御、および炎症過程において不可欠な役割を果たす。補体は、3つの明確に異なる経路、すなわち、（i）抗体自体が細胞表面もしくは細菌につながって生じる経路（古典経路と呼ばれる）、（ii）細菌もしくはウイルスの糖脂質による直接的な経路（代替経路と呼ばれる）、または（iii）細菌上の炭水化物による経路（レクチン経路と呼ばれる）を介して活性化され得る。全てのこれらの活性化経路は、補体構成成分C3およびC5の活性化点に収束し、ここから共通の終末経路が始まり、最後には膜侵襲複合体（略語：MAC）の集合に至る。補体系は、タンパク質分解性酵素または結合性タンパク質のいずれかとして機能する20個超の可溶性タンパク質からなり、脊椎動物血清中の全グロブリンの約10%を構成する。さらに、補体系は、補体タンパク質のタンパク質分解性断片に対して特異性を示し、炎症細胞および適応免疫応答を調節する細胞によって発現される複数の明確に異なる細胞-表面受容体も含む。補体の活性化を阻害し、したがって、宿主細胞を偶発的な補体攻撃から保護するいくつかの調節タンパク質がある。補体系は、独立にかまたは適応免疫応答と一緒に活性化され得る。

## 【0006】

10

20

30

40

50

補体の機能には、オプソニン化過程（すなわち、細菌を食作用に対してより感受性にする過程）、細菌および外来細胞の、それらの膜に細孔を挿入することによる溶解（膜侵襲複合体と呼ばれる）、走化性の点で活性を示す物質の生成、血管透過性の増加、平滑筋収縮の誘起、ならびに肥満細胞の脱顆粒化の促進が含まれる。凝固カスケードと同様に、補体活性化の過程も、酵素カスケードとしても知られている順次的な酵素によるステップとして編成される（S i mおよびL a i c h、2000）。これらの相互作用の詳細な順番を、以下に概説する。

#### 【0007】

古典経路。この抗体依存性の活性化経路は、特異的な抗体応答を補完する。古典経路は、代替経路と同様に精巧に制御されるが、自発的な開始能力、すなわち、抗体非依存性の認識機能、およびフィードバック増幅機構を欠く。古典経路の活性化物質には、抗原-抗体複合体、 $\beta$ -アミロイド、DNA、ポリイノシン酸、ヘパリン/プロタミンのようなポリアニオン-ポリカチオン複合体、いくつかの外被を有するウイルス、尿酸ナトリウム結晶、細菌の細胞壁のリピドA、プリカト酸、アリ毒液の多糖、細胞内膜（ミトコンドリア等）、ならびに細胞および血漿に由来する酵素、すなわち、プラスミン、カリクレイン、活性化されたハーゲマン因子、エラスターゼまたはカテプシン等がある。抗体誘発性の古典経路はC1によって始まり、C1は、細胞表面の抗原に連結する抗体（IgM > IgG3 > IgG1 > > IgG2）のFc断片にライゲーションする。C1は、22個のポリペプチド鎖でできている認識複合体であり、3つのサブユニットすなわちC1q、C1r、C1sからなる。C1qが、実際の認識部分であり、チューリップの花束の様に見えるコラーゲン様ドメイン（ヒドロキシプロリン残基およびヒドロキシリジン残基を提示する）を含有する糖タンパク質である。C1qを介しての結合時には、C1rが活性化されてプロテアーゼになり、これがC1sを切断し、C1sは、C2およびC4の両方を（切断により）C2a/bおよびC4a/bに活性化する形態に変化する。C2aとC4bとが組み合わさって、C4b2aすなわちC3コンバーターゼ（C3活性化酵素）を生じる。C4aは、弱いアナフィラトキシン活性しか示さないが、走化性ではない。C3が、全ての3つの活性化経路の中心となる。古典経路では、C4b2aコンバーターゼが、C3をC3a/bに切断する。C3aはアナフィラトキシンである。C3bは、C4b2aと組み合わさって、C4b2a3b複合体（C5コンバーターゼ）を形成する。C3bはまた、細胞に直接結合して、それらの細胞を食作用に対して感受性にする（オプソニン化）もできる。

#### 【0008】

代替経路。この経路は、活性化のために抗体を必要とせず、細菌感染およびウイルス感染に対する宿主防御において主として重要である。これは、この経路は、古典経路とは異なり、侵入微生物の表面構造すなわち細菌/ウイルスの糖脂質等、または内毒素によって直接活性化されるからである。その他の活性化物質には、イヌリン、ウサギ赤血球、脱シアル化ヒト赤血球、コブラ毒液因子またはホスホロチオエートオリゴヌクレオチドがある。6つのタンパク質、すなわち、C3、B因子、D因子、H因子、I因子およびプロパージンが一緒になって、この経路の開始、認識および活性化の機能を果たし、その結果、活性化物質が結合したC3/C5コンバーターゼの形成に至る。カスケードがC3によって始まる。少量のC3bが、C3の自発的な切断（「C3-tickover」）の結果として循環中に常に見い出されるが、それに続く分解によって、この濃度は一般に非常に低く保たれる。しかし、C3bが、細胞表面上の糖に結合すると、これは、代替経路の活性化のための核として働くことができる。次いで、B因子がC3bに結合する。D因子の存在下で、結合したB因子は、BaおよびBbに切断され、Bbは、C3コンバーターゼの活性部位を含有する。次に、プロパージンがC3bBbに結合して、細胞表面上のC3bBbコンバーターゼを安定化させ、これは、さらなるC3分子の切断に至る。最後に、代替のC5コンバーターゼC3bBb3bが形成され、これが、C5をC5a/bに切断する。C5bの出現により、上記の膜侵襲複合体の集合が開始される。一般に、グラム陰性細胞のみが、抗体と補体とによって直接溶解され得、グラム陽性細胞は、ほとんどの場合抵抗性で

ある。しかし、食作用が、C3bによるオプソニン化によって大幅に増強され（食細胞は、表面上にC3b受容体を有する）、抗体は必ずしも必要であるとは限らない。さらに、補体は、ウイルス粒子を、直接的な溶解またはウイルスの宿主細胞への貫入の阻止のいずれかによって中和することもできる。

#### 【0009】

レクチン経路。最も最近になって発見されたレクチン経路またはマンナン結合レクチン（略語：MBL）経路は、外来物質（すなわち、細菌表面）の生得的な認識に依存する。この経路は、古典経路に対して構造的および機能的な類似性を示す。レクチン経路の活性化は、急性期タンパク質MBLによって開始され、これは、細菌上のマンノース、IgAや、おそらく損傷を受けた内皮が暴露する構造も認識する。MBLは、C1qに対して相同性を示し、MBL関連セリンプロテアーゼ（略語：MASP）を引き起こし、これらのうち、3つの形態であるMASP1、MASP2およびMASP3が記載されている。その後のレクチン経路の活性化は、古典経路の活性化と事実上同一であり、同じC3コンバーターゼおよびC5コンバーターゼを形成する。さらに、MASPは、いくつかの条件下ではC3を直接活性化することができるといういくつかの証拠もある。

10

#### 【0010】

終末経路。全ての3つの活性化経路は、C5コンバーターゼの形成に収束し（古典経路およびレクチン経路ではC4b2a3b、代替経路ではC3bBb3b）、これは、C5をC5a/bに切断する。C5aは、強力なアナフィラトキシン活性を示し、走化性である。他方のC5断片であるC5bは、その疎水性結合部位によって標的細胞表面上でアンカーとして機能し、そうした細胞に対して、溶解性の膜侵襲複合体（MAC、または終末補体複合体、略語：TCC）を形成する。MACは、5つの前駆体タンパク質、すなわち、C5b、C6、C7、C8およびC9の集合体である。最後の事象が、C9オリゴマーの形成であり、これは、それ自体を膜貫通チャネルとして細胞膜中に挿入して、細胞の浸透圧溶解を起こす。MAC集合体は、可溶性血漿因子であるSタンパク質（ビトロネクチンとしても知られている）およびSP-40,40（クラスタリン（clusterin）としても知られている）、ならびに宿主細胞膜上のCD59およびHRF（homologous restriction factor）によって制御される。多くの種類の細胞、すなわち、赤血球、血小板、細菌、リポタンパク質外被をもつウイルス、およびリンパ球が、補体媒介性溶解に対して感受性である。

20

30

#### 【0011】

補体系は、炎症を開始し、増幅するための強力な機構である。これは、補体構成成分の断片を通して媒介される。アナフィラトキシン、すなわち、C3a、C4aおよびC5aは、補体系のセリンプロテアーゼの最も十分に定義されている断片でもあり、タンパク質分解性断片でもある。アナフィラトキシンは、補体の活性化の過程においてのみならず、また、C3、C4およびC5を直接切断することができるその他の酵素系の活性化からも生じる。そのような酵素には、トロンピン、プラスミン、カリクレイン、組織および白血球のリソソーム酵素、ならびに細菌のプロテアーゼがある。アナフィラトキシンは、血管壁に対して力強い効果を示し、平滑筋（例えば、回腸、気管支、子宮および血管の筋肉）の収縮を引き起こし、血管透過性を増加させる。これらの効果は、特異的なタキフィラキシーを示し（すなわち、反復刺激が、応答の減少を誘発し）、抗ヒスタミン剤によって遮断することができる。これらはおそらく、肥満細胞および好塩基球からのヒスタミンの放出を介して直接媒介されるであろう。C5aは、C5血漿タンパク質鎖の、74個のアミノ酸からなるN末端切断産物である。C5aには、多くの異なる細胞型上、すなわち、最も注目すべきは、好中球、マクロファージ、平滑筋細胞および内皮細胞の上に存在する分子である受容体C5aR（C5R1またはCD88としても知られている）が高い親和性で結合する。C5aは、圧倒的に最も力強いアナフィラトキシンであり、C3aよりはおよそ100倍超有効であり、C4aよりは1000倍超有効である。この活性は、C5a > ヒスタミン > アセチルコリン > C3a > > C4aの順で減少する。

40

#### 【0012】

50

C5aは、好中球の走化性、接着性、呼吸性バーストの発生および脱顆粒を刺激する点で極めて強力である。C5aはまた、好中球および内皮細胞を刺激して、より多くの接着分子も提示させる。例えば、動物実験では、C5aを静脈内注射すると、好中球の血管壁への接着が引き起こされることによって好中球減少が急速に生じる。好中球C5a受容体のライゲーションに続いて、プロスタグランジンに代謝される膜アラキドン酸、ならびに好中球および単核球のもう1つの強力な化学誘引物質であるLTB4を含めた、ロイコトリエンが動員される。単核球C5a受容体のライゲーションに続いて、IL-1が放出される。こうして、C5aの炎症部位における局所性放出の結果、力強い炎症促進性刺激が生じる。実際に、C5aの放出は、多くの急性または慢性の状態、すなわち、免疫複合体関連疾患全般（Hellerら、1999）；喘息（Kohl、2001）；敗血症性ショック（Huber-Langら、2001）；全身性炎症反応症候群（略語：SIRS）；多臓器不全（略語：MOF）；急性呼吸促進症候群（略語：ARDS）；炎症性腸症候群（略語：IBD）（Woodruffら、2003）；感染；重度の熱傷（Piccoloら、1999）；心臓（van der Palsら、2010）、脾臓、膀胱、膵臓、胃、肺、肝臓、腎臓、肢、脳、骨格筋または腸等の臓器の再灌流傷害（Rileyら、2000）；乾癬（Berghら、1993）；心筋炎；多発性硬化症（Muller-Ladnerら、1996）；および関節リウマチ（略語：RA）（Woodruffら、2002）等に直接的または間接的に関係する。

10

#### 【0013】

補体系と疾患との間の関係について、多数の概要が公開されている（Kirschnick、1997；Kohl、2001；Makrides、1998；Walport、2001a；Walport、2001b）。

20

#### 【0014】

補体による細胞傷害が、細胞表面上において、古典経路または代替経路のいずれかの活性化の結果として生じる。MACは、およそ20個のタンパク質分子でできており、およそ $1.7 \times 10^6$  Daの分子量に相当する超分子組織を構成する。完全に集合したMACは、C5b、C6、C7およびC8を各1分子、ならびにC9数分子を含有する。全てのこれらのMAC構成成分は、糖タンパク質である。C5が、C5コンバーターゼによって切断され、C5bが生じると、MACの自己集合が始まる。C5bとC6とが、安定で可溶性の二分子複合体を形成し、これはC7に結合し、C7を誘発して準安定部位を発現させ、新生三分子複合体（C5b-7）が標的脂質二重層上にかまたはそれにごく接近して生じた場合には、その準安定部位を通して、この三分子複合体はそれ自体を膜中に挿入することができる。挿入は、C7のC5b-6への結合後に出現する、C5b-7複合体上の疎水性領域によって媒介される。膜に結合したC5b-7は、MAC集合体を膜部位に収容し、C8のための受容体を形成する。C8、1分子が各C5b-7複合体に結合すると、1nm未満の機能性直径の小さな膜貫通型チャネルが生じ、このチャネルは、標的の細菌および赤血球の膜を攪乱させることができる。膜に結合した各C5b-8複合体は、複数のC9分子のための受容体として作用し、C9の、細胞膜の炭化水素コア中への挿入を促進するようである。C9、1分子の結合によって、膜の侵襲部位におけるC9オリゴマー形成の過程が開始される。少なくとも12個の分子が、複合体中に組み込まれると、個別のチャネル構造が形成される。したがって、最終産物は、四分子C5b-8複合体（およそ550kDaの分子量を有する）および管状のポリ-C9（およそ1,100kDaの分子量を有する）からなる。この形態のMACは、細胞膜中に挿入されると、完全な膜貫通型チャネルを生み出し、細胞の浸透圧溶解を起こす。形成された膜貫通型チャネルは、チャネル構造中に組み込まれたC9分子の数に依存して、サイズが異なる。ポリ-C9の存在が、赤血球細胞や有核細胞の溶解のためには必ずしも絶対不可欠であるとは限らないが、細菌を死滅させるためには必要である場合がある。

30

40

#### 【0015】

補体系は、侵入微生物に対する身体の防御において主として有益である。補体カスケードの早期の構成成分は、感染病原体のオプソニン化に重要であり、オプソニン化に続いて

50

、感染病原体は身体から排除される。さらに、それらの構成成分は、免疫複合体の形成およびクリアランスの制御またはデブリ、死滅組織および外来物質の浄化のような免疫系のいくつかの正常機能も果たす。(健常な身体中では)広範な種類の非自己構造を定義する異なる分子パターンを認識する、全てのこれらの活性化経路は、侵入物の制御に役立つ。最後にはMAC集合体に至る終末補体経路は、細菌および外来細胞を溶解することによる、さらなる防衛線を意味する。

#### 【0016】

補体欠損の効果を考察すると、機能性の補体系の重要性が明らかになる。例えば、代替経路のタンパク質または後期の構成成分(C3~C9)のうちの一つがない個体は、化膿性の生物体、特にナイセリア種によって重度の感染を起こす傾向がある。また、古典経路の構成成分(C1、C2、C4等)の欠損にも、あまり大きくは上昇しないが、感染のリスクの増加が伴う。また、C1およびMBLのような補体構成成分は、ウイルスの宿主細胞膜との相互作用を妨害し、したがって、ウイルスが細胞中へ入るのを阻止することによる、ウイルスを中和する能力も有する。

10

#### 【0017】

注目すべきことには、C5の切断から、C5aおよびMACが生じるが、C5欠損の臨床上的特徴は、その他の終末構成成分(例えば、C6、C7、C8、C9)の欠損の臨床上的特徴と目覚しく異なることはなく、このことから、C5aの不在が、C5欠損患者の臨床像に顕著に寄与するわけではないことが示唆されている。したがって、C5aの選択的な拮抗が、補体の正常な上流および下流の疾患予防機能が変化しない状態を保つような、最適な手助けとなることが期待される。したがって、炎症促進性のアナフィラトキシンの有害な過剰産生のみが遮断される。

20

#### 【0018】

C5aR欠損マウスは、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染に対してより感受性であるが、それ以外は正常に見えるという事実から、C5a機能の遮断には有害な作用はないことが示唆されている。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0019】

C5aもしくはC5または各受容体を標的とするいくつかの化合物が知られており、*in vivo*モデルでの試験に成功した。それらの内の一部は、臨床試験でさらに試験されている。C5特異的ヒト化抗体であるエクリズマブは、発作性夜間ヘモグロビン尿症に承認されており、非定型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、急性抗体媒介性腎同種移植片拒絶および寒冷凝集素症の治療で効能を示している。エクリズマブはC5の切断を予防し、C5aおよびC5bの両方の作用を阻害する。同じような研究段階のC5抗体および抗体フラグメント以外に、C5a:C5aR(CD88)相互作用を選択的に妨害し、C5切断およびC5b依存性のMAC形成の影響を受けないようにする抗体に特別な関心がある。例として、炎症性疾患および組織傷害の潜在的静脈内治療のための第1相臨床開発中であるヒト抗C5a mAb MEDI-7814とC5a抗体TNX-558とが挙げられるが、これらの開発は、2007年から報告されていない。関節リウマチおよび脳卒中のために、C5a受容体に対する抗体であるニュートラツマブ(neutralumab)が開発中である(RicklinおよびLambriis、2007; WagnerおよびFrank、2010)。

30

40

#### 【0020】

PEG化された抗C5アプタマー(ARC-1905)がAMDのために前臨床開発中である。CCX168は、抗好中球細胞質の自己抗体に関連する血管炎のために現在は第2相臨床開発中である小分子C5aR阻害剤である(ChemoCentryx Press Release Oct 17、2011)。臨床開発中の別のC5aRアンタゴニストは、関節リウマチの治療用のMP-435である。

#### 【0021】

50

小分子/ペプチド模倣のC5a受容体アンタゴニストJPE-1375、JSM-7717に関する開発は、最近では報告されていない(RicklinおよびLambriis、2007)。C5a受容体CD88の別の阻害剤である環状ヘキサペプチドPMX53は、炎症性動物モデルでは有効であるが、関節リウマチを患う患者におけるプラセボ対照二重盲検臨床研究ではエンドポイントを満たしていない。AMDのための臨床開発も中止されている(WagnerおよびFrank、2010)。PMX53の研究段階の変異体であるPMX205は、アルツハイマー認知症のマウスモデルでは有効であることが公開されている(Fonsecaら、2009)。さらなる臨床段階の化合物は、C5a受容体(C5aR)アンタゴニストであるCCX-168である。2010年1月に、炎症性疾患および自己免疫疾患のための第1相臨床試験が開始されている。

10

## 【0022】

上記に記載したC5aの効果以外に、新しいデータから、腫瘍微小環境でのC5aの生成により、抗腫瘍CD8+T細胞媒介性反応の抑制によって腫瘍増殖が増進されると推測され、前記抑制は、骨髄由来サブレッサー細胞の腫瘍中への誘引(recruitment)およびそのT細胞指向性の抑制能力の増大と関連があると思われる。Markiewskiらは、ペプチドC5a受容体アンタゴニストによるC5a受容体の遮断によって、マウスモデルでは腫瘍増殖の遅延をもたらされることを示した(Markiewskiら、2008)。

## 【0023】

ペプチド化合物の大部分はペプチダーゼによる分解および修飾を起こしやすく、さらに、身体、好ましくはヒトの身体からの急速なクリアランス速度を示す。したがって、これらのペプチド化合物を、一般に市販される薬物の開発の必要条件である薬物様化合物として考えることはできない。

20

## 【0024】

ヒトC5aに特異的に結合するがその他の種のC5aには特異的に結合しない、いくつかのスピーゲルマーが過去に開発されている(WO2009/040113およびWO2010/108657を参照されたい)。

## 【0025】

前臨床開発および臨床開発のために動物モデルが不可欠であることから、本発明の根本的な課題は、マウスC5aと相互作用する化合物を提供することである。より具体的には、本発明の根本的な問題は、マウスC5aとヒトC5aとの両方に相互作用する化合物を提供することである。

30

## 【0026】

さらなる本発明の根本的な課題は、ヒトおよび/または非ヒトの疾患を治療するための医薬品を製造するための化合物を提供することであり、C5aがそのような疾患の発症機構に直接的にかまたは間接的にのいずれかで関与することによって、疾患を特徴付ける。

## 【0027】

その上さらなる本発明の根本的な課題は、疾患を治療するための診断薬を製造するための化合物を提供することであり、C5aがそのような疾患の発症機構に直接的にかまたは間接的にのいずれかで関与することによって、疾患を特徴付ける。

40

## 【0028】

本発明の根本的な、これらおよびその他の課題は、付属の独立請求項の主題によって解決される。好ましい実施形態は、従属請求項から引き出すことができる。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0029】

第1の態様はまた、第1の態様の第1の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第1の態様において、ヒトC5aに結合することができる核酸分子によって解決され、核酸分子は中心ストレッチのヌクレオチドを含み、中心ストレッチのヌクレオチドは5' AUGn<sub>1</sub>GGUGKUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC A 3' [配列番号61]のヌクレオチド配列を含み、

50

$n_1$  は、UまたはdUであり、 $n_2$  は、GまたはdGであり、 $n_3$  は、AまたはdAであり、 $n_4$  は、UまたはdUであり、 $n_5$  は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、U、C、H、KおよびRは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

## 【0030】

第1の態様の第2の実施形態はまた、第1の態様の第1の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、中心ストレッチのヌクレオチドが、

a) 5' AUG $n_1$ GGUGUUn $_2$ n $_3$ AGGGUUGUGGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号62]、

b) 5' AUG $n_1$ GGUGUUn $_2$ n $_3$ GGGGUUGUGGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号63]、 10

c) 5' AUG $n_1$ GGUGUUn $_2$ n $_3$ AGGGUUGUUUGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号64]、

d) 5' AUG $n_1$ GGUGGUn $_2$ n $_3$ AGGGUUGUUUGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号65]、

e) 5' AUG $n_1$ GGUGGUn $_2$ n $_3$ GGGGUUGUGGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号66]、

f) 5' AUG $n_1$ GGUGGUn $_2$ n $_3$ GGGGAUGUGGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号67]、および

g) 5' AUG $n_1$ GGUGUUn $_2$ n $_3$ GGGGCUGUGGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号68] 20

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

$n_1$  は、UまたはdUであり、 $n_2$  は、GまたはdGであり、 $n_3$  は、AまたはdAであり、 $n_4$  は、UまたはdUであり、 $n_5$  は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

## 【0031】

第1の態様の第3の実施形態はまた、第1の態様の第2の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

5' AUG $n_1$ GGUGGUn $_2$ n $_3$ AGGGUUGUUUGGG $n_4$ G $n_5$ CGACGCA 3' [配列番号65]のヌクレオチド配列を含み、 30

$n_1$  は、UまたはdUであり、 $n_2$  は、GまたはdGであり、 $n_3$  は、AまたはdAであり、 $n_4$  は、UまたはdUであり、 $n_5$  は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

## 【0032】

第1の態様の第4の実施形態はまた、第1の態様の第3の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

a) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号73]、 40

b) 5' AUGUGGUGGUGdGAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号74]、

c) 5' AUGUGGUGGUGdAAGGGUUGUUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号75]、

d) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUUGGGdUGUCGACGCA 3' [配列番号76]、

e) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUUGGGUGdUCGACGCA 3' [配列番号77]、

f) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUUGGGdUGUCGACGCA 3' [配列番号78]、 50

- g) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA  
3' [配列番号79]、
- h) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGCA  
3' [配列番号80]、
- i) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGC  
A 3' [配列番号81]、
- j) 5' AUGdUGGUGGUGdGAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACG  
CA 3' [配列番号82]、
- k) 5' AUGdUGGUGGUGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACG  
CA 3' [配列番号83]、
- l) 5' AUGdUGGUGGUGdGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGAC  
GCA 3' [配列番号84]

10

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、

好ましくは、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

- 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA 3'  
[配列番号78]または
- 5' AUGdUGGUGGUGdGdAAGGGUUGUUGGGdUGdUCGACGC  
A 3' [配列番号84]

である。

**【0033】**

20

第1の態様の第5の実施形態はまた、第1の態様の第2の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

- 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGUUGUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号66]のヌクレオチド配列を含み、  
n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであ  
り、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

**【0034】**

30

第1の態様の第6の実施形態はまた、第1の態様の第2の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

- 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGAUGUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号67]のヌクレオチド配列を含み、  
n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであ  
り、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

**【0035】**

第1の態様の第7の実施形態はまた、第1の態様の第2の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、

40

- 5' AUGn<sub>1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号64]のヌクレオチド配列を含み、  
n<sub>1</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>2</sub>は、GまたはdGであり、n<sub>3</sub>は、AまたはdAであ  
り、n<sub>4</sub>は、UまたはdUであり、n<sub>5</sub>は、UまたはdUであり、かつ  
G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドであり、かつ  
dU、dGおよびdAは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

**【0036】**

第1の態様の第8の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、および第7の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドが、リボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌクレオチドからなる。

50

## 【 0 0 3 7 】

第 1 の態様の第 9 の実施形態はまた、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 5 の、第 6 の、および第 7 の実施形態のある実施形態でもあり、前記中心ストレッチのヌクレオチドがリボヌクレオチドからなる。

## 【 0 0 3 8 】

第 1 の態様の第 1 0 の実施形態はまた、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、および第 9 の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子が、5' -> 3' 方向に、第 1 の末端ストレッチのヌクレオチド、前記中心ストレッチのヌクレオチドおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドを含み、

前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドは、1 ~ 5 個のヌクレオチドを含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドは、1 ~ 5 個のヌクレオチドを含み、

好ましくは、

前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドは、3 ~ 5 個のヌクレオチドを含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドは、3 ~ 5 個のヌクレオチドを含み、

より好ましくは、

前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドは、3 個のヌクレオチドを含み、かつ

前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドは、3 個のヌクレオチドを含む。

## 【 0 0 3 9 】

第 1 の態様の第 1 1 の実施形態はまた、第 1 の態様の第 1 0 の実施形態のある実施形態でもあり、前記第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' Z<sub>1</sub> Z<sub>2</sub> Z<sub>3</sub> Z<sub>4</sub> G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' Z<sub>5</sub> Z<sub>6</sub> Z<sub>7</sub> Z<sub>8</sub> Z<sub>9</sub> 3' のヌクレオチド配列を含み、

Z<sub>1</sub> は、G または不在であり、Z<sub>2</sub> は、S または不在であり、Z<sub>3</sub> は、S または不在であり、Z<sub>4</sub> は、B または不在であり、Z<sub>5</sub> は、C または dC であり、Z<sub>6</sub> は、V または不在であり、Z<sub>7</sub> は、S または不在であり、Z<sub>8</sub> は、S または不在であり、Z<sub>9</sub> は、C または不在であり、かつ

G、S、B、C、V は、リボヌクレオチドであり、かつ

dC は、2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

好ましくは、

a) Z<sub>1</sub> は、G であり、Z<sub>2</sub> は、S であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、C であるか、または

b) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、S であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、不在であるか、または

c) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、不在であり、Z<sub>9</sub> は、不在であるか、または

d) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、不在であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、不在であり、Z<sub>8</sub> は、不在であり、Z<sub>9</sub> は、不在であるか、または

e) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、S であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、C であるか、または

f) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、C であるか、または

g) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、不在であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、C であるか、または

10

20

30

40

50

h)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、不在であり、 $Z_4$  は、不在であり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、Sであり、 $Z_9$  は、Cであるか、または

i)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、Sであり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、Sであり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

j)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、不在であり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、Sであり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

k)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、不在であり、 $Z_4$  は、不在であり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、Sであり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

l)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、Sであり、 $Z_3$  は、Sであり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

m)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、Sであり、 $Z_3$  は、Sであり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、不在であり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

n)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、不在であり、 $Z_4$  は、不在であり、 $Z_5$  は、Cであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

o)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、不在であり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、Sであり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

p)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、Sであり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、Vであり、 $Z_7$  は、不在であり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在であるか、または

q)  $Z_1$  は、不在であり、 $Z_2$  は、不在であり、 $Z_3$  は、Sであり、 $Z_4$  は、Bであり、 $Z_5$  は、CもしくはdCであり、 $Z_6$  は、不在であり、 $Z_7$  は、不在であり、 $Z_8$  は、不在であり、 $Z_9$  は、不在である。

【0040】

第1の態様の第12の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCUG3'のヌクレオチド配列を含み、前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CAAGGC3'または5'dCAAGGC3'のヌクレオチド配列を含み、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ

dCは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0041】

第1の態様の第13の実施形態はまた、第1の態様の第12の実施形態のある実施形態でもあり、前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAAGGC3'のヌクレオチド配列を含む。

【0042】

第1の態様の第14の実施形態はまた、第1の態様の第12の実施形態のある実施形態でもあり、前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CAAGGC3'のヌクレオチド配列を含む。

【0043】

第1の態様の第15の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CCUG3'または5'CUG3'または5'UG3'または5'G3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

10

20

30

40

50

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A G G C 3' のヌクレオチド配列を含み、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ  
d Cは、2' - デオキシリボヌクレオチドである。

【0044】

第1の態様の第16の実施形態はまた、第1の態様の第15の実施形態のある実施形態でもあり、前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C C U G 3' のヌクレオチド配列を含む。

【0045】

第1の態様の第17の実施形態はまた、第1の態様の第15の実施形態のある実施形態でもあり、前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C U G 3' のヌクレオチド配列を含む。

10

【0046】

第1の態様の第18の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、

a) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C U G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

20

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C C 3' のヌクレオチド配列を含む、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ

d Cは、2' - デオキシリボヌクレオチドである。

【0047】

第1の態様の第19の実施形態はまた、第1の態様の第18の実施形態のある実施形態でもあり、

第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C C 3' のヌクレオチド配列を含む。

30

【0048】

第1の態様の第20の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C U G 3' または5' U G 3' または5' C G 3' または5' G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

40

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A G C 3' のヌクレオチド配列を含む、

C、A、GおよびUが、リボヌクレオチドであり、かつ

d Cが、2' - デオキシリボヌクレオチドである。

【0049】

第1の態様の第21の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C U G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

50

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A C 3' または 5' d C C 3' または 5' d C A 3' のヌクレオチド配列を含み、  
C、A、GおよびUが、リボヌクレオチドであり、かつ  
d Cが、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0050】

第1の態様の第22の実施形態はまた、第1の態様の第10の、および第11の実施形態のある実施形態でもあり、

a) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' U G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C A 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

d) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

e) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

f) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

g) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

h) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C C 3' のヌクレオチド配列を含むか、または

i) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' C G C 3' のヌクレオチド配列を含み、

C、A、GおよびUは、リボヌクレオチドであり、かつ

d Cは、2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0051】

第1の態様の第23の実施形態はまた、第1の態様の第22の実施形態のある実施形態でもあり、

前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' G C G 3' のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5' d C G C 3' のヌクレオチド配列を含む。

【0052】

第1の態様の第24の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第5の、第6の、第7の、第9の、第10の、第11の、第12の、および第14の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子が、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6および配列番号90の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6および配列番号90の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に対する少なくとも85%の同一性を有する核酸分子を含むか、または配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6および配列番号90の群から

10

【0053】

第1の態様の第25の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第8の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、および第23の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子が、配列番号14、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号37、配列番号57、配列番号59、配列番号60、配列番号91および配列番号92の群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、または14、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号37、配列番号57、配列番号59、配列番号60、配列番号91および配列番号92の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子に対する少なくとも85%の同一性を有する核酸分子を含むか、または14、配列番号21、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号37、配列番号57、配列番号59、配列番号60、配列番号91および配列番号92の群から

20

【0054】

第1の態様の第26の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、および第25の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子がヒトC5aおよびマウスC5aに結合することができる。

30

【0055】

第1の態様の第27の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、および第26の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子が、ヒトC5aおよびマウスC5aに結合することができる少なくとも1つの結合部分を含み、そのような結合部分は、L-ヌクレオチドからなる。

40

【0056】

第1の態様の第28の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、および第27の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子のヌクレオチドまたは前記核酸分子を形成するヌクレオチドが、L-ヌクレオチドである。

【0057】

第1の態様の第29の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の

50

、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、および第28の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子がL-核酸分子である。

【0058】

第1の態様の第30の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、および第29の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸が、ヒトおよび/またはマウスのC5aにより媒介される活性のアンタゴニストである。

10

【0059】

第1の態様の第31の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、および第30の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子は修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物からの排出速度は、前記修飾基を含まない核酸と比較して低下する。

【0060】

第1の態様の第32の実施形態はまた、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、および第30の実施形態のある実施形態でもあり、前記核酸分子は修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物における保持時間は、前記修飾基を含まない核酸分子と比較して増大する。

20

【0061】

第1の態様の第33の実施形態はまた、第1の態様の第31の、および第32の実施形態のある実施形態でもあり、前記修飾基は、生分解性修飾および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは、前記修飾基は、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分岐ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される。

30

【0062】

第1の態様の第34の実施形態はまた、第1の態様の第33の実施形態のある実施形態でもあり、前記修飾基はポリエチレングリコールであり、好ましくは直鎖ポリエチレングリコールまたは分岐ポリエチレングリコールからなり、前記ポリエチレングリコールの分子量は好ましくは約20,000~約120,000Daであり、より好ましくは約30,000~約80,000Daであり、最も好ましくは約40,000Daである。

【0063】

第1の態様の第35の実施形態はまた、第1の態様の第33の実施形態のある実施形態でもあり、前記修飾基はヒドロキシエチルデンプンであり、好ましくは前記ヒドロキシエチルデンプンの分子量は約50~約1000kDaであり、より好ましくは約100~約700kDaであり、最も好ましくは200~500kDaである。

40

【0064】

第1の態様の第36の実施形態はまた、第1の態様の第31の、第32の、第33の、第34の、および第35の実施形態のある実施形態でもあり、前記修飾基は、前記核酸分子にリンカーを介して結合し、好ましくは、前記リンカーは生分解性リンカーである。

【0065】

第1の態様の第37の実施形態はまた、第1の態様の第31の、第32の、第33の、

50

第34の、第35の、および第36の実施形態のある実施形態でもあり、前記修飾基は、前記核酸分子の5'末端のヌクレオチドおよび/もしくは3'末端のヌクレオチドに、ならびに/または前記核酸分子の5'末端のヌクレオチドと前記核酸分子の3'末端のヌクレオチドとの間の前記核酸分子のヌクレオチドに結合する。

【0066】

第1の態様の第38の実施形態はまた、第1の態様の第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、および第37の実施形態のある実施形態でもあり、前記生物は、動物またはヒトの身体であり、好ましくはヒトの身体である。

【0067】

第2の態様はまた、第2の態様の第1の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第2の態様において、疾患を治療および/もしくは予防するための方法において使用するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による核酸分子によって解決される。

【0068】

第2の態様の第2の実施形態はまた、第2の態様の第1の実施形態のある実施形態でもあり、疾患は、補体活性化およびC5a媒介性発症機構に関連があり、かつ/または、自己免疫性疾患、炎症性疾患、全身性炎症反応症候群、眼疾患、虚血/再灌流傷害、臓器移植後臓器機能障害、移植片拒絶、心血管疾患、呼吸器疾患、急性反応、感染性疾患、神経性疾患、神経変性疾患、線維性疾患、血液疾患、代謝性疾患、腫瘍、および生体材料による補体活性化に関連する臨床的合併症を含む群から選択され、好ましくは、前記全身性炎症反応症候群は、敗血症および外傷または重度の熱傷の二次的損傷を含む群から選択される。

【0069】

第3の態様はまた、第3の態様の第1の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第3の態様において、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態によるならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子ならびに場合によりさらなる構成要素を含む医薬組成物によって解決され、さらなる構成要素は、薬学的に許容できる賦形剤、薬学的に許容できる担体および薬学的に活性な薬剤を含む群から選択される。

【0070】

第3の態様の第2の実施形態はまた、第3の態様の第1の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、医薬組成物が、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態によるおよび第2の態様の第1の実施形態による核酸分子ならびに薬学的に許容できる担体を含む。

【0071】

第4の態様はまた、第4の態様の第1の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第4態様において、医薬品を製造するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の

10

20

30

40

50

、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態によるおよび第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子の使用によって解決される。

【0072】

第 4 の態様の第 2 の実施形態はまた、第 4 の態様の第 1 の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、医薬品は、ヒト用医薬における使用のためのものまたは獣医用医薬における使用のためのものである。

【0073】

第 4 の態様の第 3 の実施形態はまた、第 4 の態様の第 1 の、および第 2 の実施形態のある実施形態でもあり、前記医薬品が、自己免疫性疾患、炎症性疾患、全身性炎症反応症候群、眼疾患、虚血/再灌流傷害、臓器移植後臓器機能障害、移植片拒絶、心血管疾患、呼吸器疾患、急性反応、感染性疾患、神経性疾患、神経変性疾患、線維性疾患、血液疾患、代謝性疾患、腫瘍、および生体材料による補体活性化に関連する臨床的合併症の治療および/または予防のためのものであり、好ましくは、前記全身性炎症反応症候群は、敗血症および外傷または重度の熱傷の二次的損傷を含む群から選択される。

10

【0074】

第 5 の態様はまた、第 5 の態様の第 1 の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第 5 態様において、診断手段を製造するための、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態によるおよび第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子の使用によって解決される。

20

【0075】

第 6 の態様はまた、第 6 の態様の第 1 の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第 6 の態様において、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子と C5a とを含む複合体によって解決され、好ましくは、複合体は結晶性の複合体である。

30

【0076】

第 7 の態様はまた、第 7 の態様の第 1 の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第 7 の態様において、C5a を検出するための、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子の使用によって解決される。

40

【0077】

第 8 の態様はまた、第 8 の態様の第 1 の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第 8 の態様において、C5a により媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングするための方法によって解決され、この方法は、

- C5a により媒介される活性の候補アンタゴニストを準備するステップと、
- 第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16、第 17

50

の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子を準備するステップと、

- C5aにより媒介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルを発生する試験系を準備するステップと、

- C5aにより媒介される活性の候補アンタゴニストが、C5aにより媒介される活性のアンタゴニストであるかどうかを決定するステップとを含む。

【0078】

第9の態様はまた、第9の態様の第1の実施形態でもあり、本発明の根本的な課題は、第9の態様において、C5aを検出するためのキットによって解決され、このキットは、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子と、少なくとも指示書または反応槽とを含む。

【0079】

第10の態様はまた、第10の態様の第1の実施形態でもり、本発明の根本的な課題は、第10の態様において、試料中の、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸を検出するための方法によって解決され、この方法は、

a) 捕捉プローブおよび検出プローブを準備するステップであって、前記捕捉プローブは、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子の第1の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示し、前記検出プローブは、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子の第2の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示すか、あるいは、前記捕捉プローブは、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36の、第37の、および第38の実施形態による、ならびに第2の態様の第1の実施形態による核酸分子の第2の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示し、前記検出プローブは、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、

10

20

30

40

50

第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子の第 1 の部分に対して少なくとも部分的に相補性を示すステップと、

b) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを別々にまたは組み合わせて、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による前記核酸分子を含有する試料または第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による前記核酸分子を含有すると推定される試料に添加するステップと、

c) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による前記核酸分子またはその部分と同時にまたは任意の順番で順次に反応させるステップと、

d) 任意選択的に、前記捕捉プローブがステップ a) で準備された第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による前記核酸分子とハイブリダイズするか否かを検出するステップと、

e) 第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態による、ならびに第 2 の態様の第 1 の実施形態による前記核酸分子ならびに前記捕捉プローブおよび前記検出プローブからなる、ステップ c) で形成された複合体を検出するステップとを含む。

#### 【0080】

第 10 の態様の第 2 の実施形態はまた、第 10 の態様の第 1 の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、検出プローブは、検出手段を含み、かつ/または捕捉プローブは、支持体、好ましくは、固体の支持体に固定化する。

#### 【0081】

第 10 の態様の第 3 の実施形態はまた、第 10 の態様の第 1 および第 2 の実施形態のある実施形態でもあり、ここでは、ステップ c) で形成された複合体の一部ではない検出プローブはいずれも、反応から除去され、したがって、ステップ e) において、複合体の一部である検出プローブのみが検出される。

#### 【0082】

第 10 の態様の第 4 の実施形態はまた、第 10 の態様の第 1、第 2 および第 3 の実施形

10

20

30

40

50

態のある実施形態でもあり、ここでは、ステップ e) が、第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、第 31 の、第 32 の、第 33 の、第 34 の、第 35 の、第 36 の、第 37 の、および第 38 の実施形態によるおよび第 2 の態様の第 1 の実施形態による核酸分子またはその一部が存在する場合と、前記核酸またはその一部が存在しない場合とで、捕捉プローブおよび検出プローブがハイブリダイズしたときに検出手段が発生させるシグナルを比較するステップを含む。

【0083】

いずれの説にも縛られる意図はないが、本発明者らは、驚くことに、マウス C5a およびヒト C5a の配列相同性は、相同領域および 3 個の追加の N 末端アミノ酸を有するマウス C5a においてわずか 64% であるが、本発明による核酸分子がマウス C5a およびヒト C5a の両方に特異的におよび高親和性で結合し、それにより C5a 受容体への C5a の結合が阻害されることを発見した。さらに、ヒト C5a とは対照的に、マウス C5a はグリコシル化されていない。ヒト C5a におけるグリコシル化部位であるアスパラギン<sup>64</sup> は、マウスではグルタミン酸塩に変異されている。特に、ピコモル範囲におけるいくつかの個々の C5a 結合性核酸の示された親和性を予測することができなかった。

【0084】

さらに、本発明者らは、驚くことに、本発明による核酸分子が C5a と C5a 受容体との相互作用の遮断に適していることを発見した。この限りでは、本発明による核酸分子を C5a 受容体のアンタゴニストとしてみなすこともでき、それぞれ、C5a の効果、特に C5a のその受容体に関する効果のアンタゴニストとしてみなすこともできる。C5a に対するアンタゴニストは、本発明による核酸分子等の C5a に結合する分子であり、好ましくは、実施例に記載されている *in vitro* アッセイまたは *in vivo* モデルにおいて C5a の機能を阻害する。

【0085】

本発明による核酸が核酸分子であることは本発明の範囲に含まれる。この限りでは、核酸および核酸分子という用語は、別段の記載がない限り、本明細書では同義として使用される。また、そのような (1 つまたは複数の) 核酸は、好ましくは、本明細書では、本発明による (1 つまたは複数の) 核酸分子、本発明による (1 つまたは複数の) 核酸、本発明の (1 つまたは複数の) 核酸、または本発明の (1 つまたは複数の) 核酸分子とも呼ぶ。

【0086】

本明細書に記載する本発明による核酸の特徴は、核酸が、単独でかまたは何らかの組合せのいずれかで使用される、本発明の任意の態様において理解することができる。

【0087】

本発明による核酸分子および組成物、好ましくは本発明による核酸分子を含む医薬組成物を使用することにより治療または予防することができる様々な疾患、状態および障害に関して、そのような疾患、状態および障害は、特に本出願の導入部に記載されているおよび該導入部で説明されているものを含む、本明細書に記載されているものであることを認める必要がある。この限りでは、本明細書の各節および本明細書の導入部は、前記疾患、状態および障害のそれぞれの予防および治療への本発明の核酸分子の適合性を教示する本開示の不可欠な部分を形成する。さらに、C5a - C5a 受容体軸の生理学的効果が C5a のより高い血漿中レベルに関連する場合には、本発明による核分子が好ましい。

【0088】

本明細書で使用する場合、C5a という用語は、哺乳動物 C5a を含む任意の C5a に関するが、これには限定されない。好ましくは、哺乳動物 C5a は、ヒト C5a、ラット C5a、マウス C5a、サル C5a を含む群から選択される (図 11 での C5a 種アライメントを参照されたい)。より好ましくは、C5a はヒト C5a である。ヒト C5a は

10

20

30

40

50

、配列番号50に記載のアミノ酸配列を有する塩基性タンパク質である。マウスC5aは、配列番号52に記載のアミノ酸配列を有する塩基性タンパク質である。

【0089】

特許請求の範囲および実施例1においてより詳細に概説するが、より驚くべきことには、本発明者らは、ヒトC5aおよびマウスC5aの両方に結合することができる、いくつかの異なる結合性核酸分子を同定することができた。

【0090】

本明細書においてより詳細に概説するが、本発明者らは、ヒトC5aおよびマウスC5aの両方に結合することができる、いくつかの異なるC5a結合性核酸分子を同定し、核酸分子は、本明細書では開示されているようにも呼ばれているストレッチのヌクレオチドの観点から特徴付けられ得る(実施例1を参照されたい)。実施例8および9に実験的に示すように、本発明者らは、驚くべきことに、いくつかの系において、本発明による核酸分子が敗血症の治療に適していることを実証することができた。

10

【0091】

C5aに結合する異なるタイプの本発明のC5a結合性核酸分子はそれぞれ、3つの異なるストレッチのヌクレオチド、すなわち第1の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチドおよび第2の末端ストレッチのヌクレオチドを含む。一般に、本発明のC5a結合性核酸分子は、その5'末端および3'末端において、末端ストレッチのヌクレオチド、すなわち第1の末端ストレッチのヌクレオチドまたは第2の末端ストレッチのヌクレオチド(また、5'末端ストレッチのヌクレオチドおよび3'末端ストレッチのヌクレオチドとも呼ばれる)をそれぞれ含む。第1の末端ストレッチのヌクレオチドおよび第2の末端ストレッチのヌクレオチドは、原則としてはそれらの塩基相補性に起因して相互にハイブリダイズすることができ、ハイブリダイゼーション時に二本鎖構造が形成される。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは、生理学的条件および/または非生理学的条件下において分子内で必ずしも実現されるものではない。C5a結合性核酸分子の3つのストレッチのヌクレオチドである第1の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチドおよび第2の末端ストレッチのヌクレオチドは、5'3'方向で、すなわち第1の末端ストレッチのヌクレオチド-中心ストレッチのヌクレオチド-第2の末端ストレッチのヌクレオチドで相互に配列されている。あるいは、第2の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチドおよび末端の第1のストレッチのヌクレオチドが5'3'方向で相互に配列されている。

20

30

【0092】

本発明による核酸の中心ストレッチのヌクレオチドの長さは、好ましくは34である。

【0093】

本発明による核酸の第1の末端ストレッチのヌクレオチドの長さは、1から5の間のヌクレオチドであり、好ましくは3から5の間のヌクレオチドであり、より好ましくは3ヌクレオチドである。

【0094】

本発明による核の第2の末端ストレッチのヌクレオチドの長さは、1から5の間のヌクレオチドであり、好ましくは3から5の間のヌクレオチドであり、より好ましくは3ヌクレオチドである。

40

【0095】

「ストレッチ」および「ストレッチのヌクレオチド」という用語は、別段の記載がない限り、同義として本明細書で使用される。

【0096】

様々なC5a結合性核酸分子の間での定義されたストレッチの配列における差異は、C5aに対する結合親和性に影響を及ぼすことができる。本発明の様々なC5a結合性核酸分子の結合解析に基づいて、中心ストレッチおよびそれを形成するヌクレオチドは、個々に、より好ましくはそれらの全体でC5aへのC5a結合性核酸分子の結合に不可欠である。

50

## 【0097】

好ましい実施形態では、本発明による核酸は単一核酸分子である。さらなる実施形態では、単一核酸分子は、多数の単一核酸分子として、または多数の単一核酸分子種として存在する。

## 【0098】

本発明に従った核酸分子は、好ましくはホスホジエステル連結または結合を介して、相互に共有結合的に連結されているヌクレオチドから好ましくはなることが当業者により認められるであろう。

## 【0099】

本発明による核酸分子が、原則として、相互にハイブリダイズすることができる2つ以上のそのストレッチまたは(1つもしくは複数の)部分を含むことは本発明の範囲に含まれる。そのようにハイブリダイズすると、二本鎖構造が形成される。当業者であれば、そのようなハイブリダイゼーションが、特に、*in vitro*および/または*in vivo*の条件下では、起こる場合もあれば、起こらない場合もあることを認識するであろう。また、ハイブリダイゼーションの場合、原則としては少なくとも塩基対合則に基づいてそのようなハイブリダイゼーションしたがって二本鎖構造の形成が起こることができる2つのストレッチの全長にわたっては、そのようなハイブリダイゼーションが必ずしも起こるとは限らない。本明細書で使用する場合、好ましくは、二本鎖構造は、核酸分子または2つ以上の別個の鎖もしくは核酸分子の一本鎖の2つの空間的に別個のストレッチによって形成された構造の一部であり、好ましくはワトソン-クリック塩基対合則に従って塩基対を形成する少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の塩基対が存在する。また、当業者であれば、フーグスティーン塩基対等のその他の塩基対合も、そのような二本鎖構造中に存在するかまたはそれを形成する場合があることを認識するであろう。2つのストレッチがハイブリダイズするという特徴が、好ましくは、そのようなハイブリダイゼーションが*in vivo*および/または*in vitro*で実際に起こるかどうかに関わらず、そのようなハイブリダイゼーションが2つのストレッチの塩基相補性に起因して起こると推測されることを示すことも認められるはずである。本発明に関連して、そのようなストレッチは、上記で定義したように、ある実施形態においてハイブリダイズすることができる第1の末端ストレッチのヌクレオチドおよび第2の末端ストレッチのヌクレオチドである。

10

20

30

## 【0100】

好ましい実施形態では、本明細書で使用する場合、配置という用語は、本明細書に開示する(1つまたは複数の)核酸分子に関連して本明細書に記載する構造的または機能的な特徴または要素の順または順番を意味する。

## 【0101】

当業者であれば、本発明による核酸は、C5aおよびC5の両方に結合することができることを認識するであろう。この結合の特徴は、核酸の同定のために、C5aおよびC5の両方の中に存在するC5aの部分の使用されたという事実から派生する。したがって、本発明による核酸は、C5aもしくはC5のいずれかまたは両方の検出に適している。また、当業者であれば、本発明による核酸分子は、C5およびC5aの両方に対するアンタゴニストでもあることを認識するであろう。このことから、本発明による核酸は、C5a

40

## 【0102】

本明細書に開示されている本発明のC5a結合性核酸分子は、C5との関連においてC5aを認識することが分かっている(実施例1を参照されたい)。したがって、膜侵襲複合体(MAC)の一部である、アナフィラトキシンC5aおよびC5bへのC5の切断がC5a結合性核酸により阻害されるかどうかを調べた。MACは補体カスケードの最終生

50

成物、すなわち C 5 b - 9 からなる細孔である。M A C は病原体の細胞膜中に挿入され、細胞質漏出の誘発により病原体を死滅させると考えられる。C 5 切断に関するアッセイを、補体依存性のヒツジ赤血球溶血試験を使用することによって達成した。本発明の C 5 a 結合性分子は溶血を阻害しなかった（実施例 6 を参照されたい）。本発明の C 5 a 結合性核酸分子は C 5 切断および M A C 形成を妨げず、したがって、C 5 a のみの選択的アンタゴニストである。医薬品として使用される場合、本発明の C 5 a 結合性核酸分子の存在下において、病原体防御に有益である M A C の形成が損なわれないことから、本発明の C 5 a 結合性核酸分子は多くの疾患において有利であることができる。

**【 0 1 0 3 】**

また、本発明による核酸分子は、本明細書に開示する特定の配列に対して本質的に相同性を示す核酸も含むものとする。実質的に相同性を示すという用語は、相同性が、少なくとも 7 5 %、好ましくは 8 5 %、より好ましくは 9 0 %、最も好ましくは 9 5 % 超、9 6 % 超、9 7 % 超、9 8 % 超または 9 9 % 超であると理解されたい。

10

**【 0 1 0 4 】**

本発明による核酸中に存在する相同性を示すヌクレオチドの実際のパーセントは、核酸中に存在するヌクレオチドの全数に依存する。パーセントの改変は、核酸中に存在するヌクレオチドの全数に基づくことができる。

**【 0 1 0 5 】**

当業者に知られているように、2つの核酸分子間の相同性を決定することができる。この場合、より具体的には、配列比較アルゴリズムは、指定したプログラムのパラメータに基づいて、参照配列と比べた（1つまたは複数の）試験配列についてのパーセント配列相同性を計算するために使用することができる。試験配列は、好ましくは、別の核酸分子に対して相同性を示すはずであるかまたは相同性を示すかどうかを試験すべきであるといわれている核酸分子の配列、および相同性を示す場合には、その程度を試験すべきであるといわれている核酸分子の配列であり、そのような別の核酸分子は、参照配列とも呼ばれている。ある実施形態では、参照配列は、本明細書に記載する核酸分子、好ましくは、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 9 0、配列番号 1 4、配列番号 2 1、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 3 7、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 9 1 および配列番号 9 2 のうちのいずれか 1 つに記載の配列を有する核酸分子である。比較のために配列アラインメントの最適化を、例えば、Smith および Waterman の局地的相同性アルゴリズム（Smith および Waterman、1981）、Needleman および Wunsch の相同性アラインメントアルゴリズム（Needleman および Wunsch、1970）、Pearson および Lipman の類似を検索する方法（Pearson および Lipman、1988）、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行（GAP、BESTFIT、FASTA および TFASTA、Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis. 製）、または目視検査によって行うことができる。

20

30

**【 0 1 0 6 】**

パーセント配列同一性を決定するために適しているアルゴリズムの1つの例が、基本的な局地的アラインメント検索ツール（以下「BLAST」）において使用されてい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が、National Center for Biotechnology Information（以下「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場合）および BLASTP（アミノ酸配列の場合）を使用して配列同一性を決定する場合に使用するデフォルトパラメータが、McGinnis ら（McGinnis ら、2004）に記載されている。

40

50

## 【0107】

本発明による核酸は、本明細書で開示されている核酸に対する同一性を特定の程度で有し、およびそのヌクレオチド配列によって定義される核酸も含むものとする。より好ましくは、本発明は、本明細書に開示され、およびそのヌクレオチド配列またはその一部によって定義される核酸に対して少なくとも75%、好ましくは85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%、96%、97%、98%または99%を超える同一性を有する核酸分子も含む。

## 【0108】

また、本発明の核酸または本発明による核酸という用語は、好ましくは、核酸または前記一部が、ヒトC5aへの結合に関与する範囲内で、本明細書に開示する核酸配列またはその一部を含む核酸も含む。そのような核酸は、ある実施形態では、本明細書に記載する核酸分子のうちの一つ、またはその誘導体および/もしくは代謝産物であり、そのような誘導体および/または代謝産物は、好ましくは、本明細書に記載する核酸分子と比較して切り詰められた核酸である。切り詰めは、本明細書に開示する核酸のいずれかまたは両方の末端に関してでよい。また、切り詰めは、核酸のヌクレオチドの内部配列に関してでもよく、すなわち、それぞれの5'末端のヌクレオチドと3'末端のヌクレオチドとの間の(1個または複数の)ヌクレオチドに関してでよい。さらに、切り詰めは、本明細書に開示する核酸配列からのわずかに1個のヌクレオチドの欠失も含むものとする。また、切り詰めは、(1個または複数の)本発明の核酸の2つ以上のストレッチに関してでもよく、ストレッチは、わずかに1ヌクレオチド長であってもよい。本発明による核酸の結合は、当業者であれば、日常的な実験を使用してか、または本明細書に記載する、好ましくは、本明細書の実施例の部分に記載する方法を使用もしくは採用することによって決定することができる。

10

20

## 【0109】

本発明による核酸分子は、D-核酸分子またはL-核酸分子のいずれかであってよい。好ましくは、本発明による核酸分子はL-核酸分子である。より好ましくは、本発明の核酸分子はスピーゲルマーである。

## 【0110】

また、ある実施形態では、本明細書に記載する核酸分子全体のそれぞれおよびいずれかが、それらの(1つまたは複数の)核酸配列に関して、特定の示された(1つまたは複数の)ヌクレオチド配列に限定されることも本発明の範囲に含まれる。すなわち、「含む(comprising)」または「含む(comprise(s))」という用語は、そのような実施形態では、含有する(containing)またはからなる(consisting of)を意味すると解釈するものとする。

30

## 【0111】

また、本発明による核酸は、より長い核酸の一部であり、このより長い核酸は、いくつかの部分を含み、少なくとも一つのような部分は、本発明による核酸またはその一部であることも本発明の範囲に含まれる。これらのより長い核酸のその他の(1つまたは複数の)部分は、一つもしくはいくつかのD-核酸、または一つもしくはいくつかのL-核酸のいずれかであってよい。本発明に関連して、いずれの組合せも使用することができる。より長い核酸のその他の(1つまたは複数の)部分は、単独でかまたは一緒になったのいずれかで、全体または特定の組合せのいずれかとして、結合、好ましくは、C5aへの結合とは異なる機能を示すことができる。一つの可能な機能は、例えば、固定化、架橋結合、検出または増幅のため等、その他の分子との相互作用を可能にすることであり、そのようなその他の分子は、好ましくは、C5aとは異なる。本発明のさらなる実施形態では、本発明による核酸は、個々の部分または組み合わせた部分として、本発明の核酸のうちの一つかを含む。また、本発明の核酸のうちの一つかを含むそのような核酸も、より長い核酸という用語によって包含される。

40

## 【0112】

本明細書で使用する場合、L-核酸は、L-ヌクレオチドからなる、好ましくは、L-

50

ヌクレオチドから完全になる核酸または核酸分子である。

【0113】

本明細書で使用する場合、D - 核酸は、D - ヌクレオチドからなる、好ましくは、D - ヌクレオチドから完全になる核酸または核酸分子である。

【0114】

核酸および核酸分子という用語を、明確に別段の記載がない限り、互換的に使用する。

【0115】

また、別段の記載がない限り、いずれのヌクレオチド配列も、本明細書では、5' → 3' 方向に記載する。

【0116】

好ましくは、本明細書で使用する場合、ヌクレオチドの位置はいずれも、配列、そのようなヌクレオチドを含有するストレッチまたはサブストレッチの5' 末端に対して決定または言及する。したがって、第2のヌクレオチドとは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの5' 末端から数えて2番目のヌクレオチドである。また、それに従って、最後から2番目のヌクレオチドとは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの3' 末端から数えて2番目のヌクレオチドである。

【0117】

本発明の核酸分子が、D - ヌクレオチド、L - ヌクレオチド、または例えば、ランダムな組合せもしくは少なくとも1個のL - ヌクレオチドおよび少なくとも1つのD - 核酸からなる、定義された配列のストレッチである、両方の組合せからなるかどうかに関わらず、核酸は、(1個もしくは複数の)デオキシリボヌクレオチド、(1個もしくは複数の)リボヌクレオチド、またはそれらの組合せからなることができる。

【0118】

核酸分子がリボヌクレオチドおよび2' デオキシリボヌクレオチドの両方からなることも本発明の範囲に含まれる。2' デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを図22および23に示す。本発明による核酸分子の配列においてリボヌクレオチドおよび2' デオキシリボヌクレオチドを区別するために、本明細書において以下の参照コードを使用する。

【0119】

本発明による核酸分子は2' デオキシリボヌクレオチドからなり、  
d G は、2' デオキシ - グアノシン - 5' - モノホスフェートであり、  
d C は、2' デオキシ - シチジン - 5' - モノホスフェートであり、  
d A は、2' デオキシ - アデノシン - 5' - モノホスフェートであり、  
d U は、2' デオキシ - ウリジン 5' - モノホスフェートである。

【0120】

本発明による核酸分子はリボヌクレオチドからなり、  
G は、グアノシン - 5' - モノホスフェートであり、  
C は、シチジン 5' - モノホスフェートであり、  
A は、アデノシン - 5' - モノホスフェートであり、  
U は、ウリジン - 5' - モノホスフェートである。

【0121】

リボヌクレオチド配列モチーフの定義のために、曖昧なヌクレオチドに関してIUPAC 略称を以下のように使用する。

S 強	GまたはC、
W 弱	AまたはU、
R プリン	GまたはA、
Y ピリミジン	CまたはU、
K ケト	GまたはU、
M イミノ	AまたはC、
B Aでない	CまたはUまたはG、

10

20

30

40

50

D Cでない AまたはGまたはU、  
 H Gでない AまたはCまたはU、  
 V Uでない AまたはCまたはG、  
 N 全て AまたはGまたはCまたはU。

## 【0122】

本発明の核酸分子をL-核酸分子として設計することは、いくつかの理由で好都合である。L-核酸分子は、天然に存在する核酸の鏡像異性体である。しかし、D-核酸分子は、水溶液中、ならびに特に、ヌクレアーゼの広範な存在により生物学的系中および生物学的試料中ではあまり安定ではない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞由来のヌクレアーゼには、L-核酸を分解する能力はない。このことから、L-核酸分子の生物学的半減期は、動物およびヒトの身体を含めた、そのような系においては顕著に延長する。L-核酸分子の分解性がないことにより、ヌクレアーゼによる分解産物が生成されることはなく、したがって、そこから発生する副作用は、動物およびヒトの身体を含めたそのような系の中で観察されない。この側面は、C5の存在が関与する疾患および/または障害の療法において使用される事実上全てのその他の化合物からL-核酸分子を区別する。ワトソクリック塩基対合とは異なる機構を通して標的分子に特異的に結合するL-核酸分子、またはL-ヌクレオチドから部分的もしくは完全になるアプタマー、特にアプタマーの標的分子への結合に関与しているアプタマーの部分は、スピーゲルマーとも呼ばれる。アプタマーおよびスピーゲルマーそれ自体は当業者に知られており、とりわけ「The Aptamer Handbook」(Klussmann編、2006)に記載されている。

10

20

## 【0123】

本発明の核酸分子が、それがD-核酸、L-核酸もしくはD,L-核酸として存在するかどうか、またはそれがDNAもしくはRNAであるかどうかに関わらず、一本鎖または二本鎖の核酸分子として存在し得ることも本発明の範囲に含まれる。典型的には、核酸分子は、その一次配列によって定義された二次構造を示す一本鎖核酸分子であり、したがって、三次構造も形成することができる。しかし、核酸分子はまた、相互に相補性または部分的な相補性である2つの鎖が相互にハイブリダイズしているという意味での二本鎖であってもよい。

## 【0124】

本発明の核酸分子は、修飾することができる。そのような修飾は、核酸分子の単一のヌクレオチドに関連することができ、当技術分野ではよく知られている。そのような修飾の例が、とりわけ、Venkatesanら(Venkatesanら、2003)およびKusser(Kusser、2000)に記載されている。そのような修飾は、核酸分子を構成する個々のヌクレオチドの内の1つ、いくつか、または全ての2'位におけるH原子、F原子またはO-CH<sub>3</sub>基またはNH<sub>2</sub>基であってもよい。また、本発明による核酸分子は、少なくとも1個のLNAヌクレオチドを含むことができる。ある実施形態では、本発明による核酸分子は、LNAヌクレオチドからなる。

30

## 【0125】

ある実施形態では、本発明による核酸分子は多分割核酸分子であってもよい。本明細書で使用する場合、多分割核酸分子は、少なくとも2つの別々の核酸の鎖からなる核酸分子である。これらの少なくとも2つの核酸の鎖は、機能性の単位を形成し、機能性の単位は、標的分子に対するリガンドであり、好ましくは、C5aの本場では標的分子に対するアンタゴニストである。少なくとも2つの核酸の鎖は、本発明の核酸分子を切断して少なくとも2つの鎖を生成するか、または本発明の完全長の核酸分子の第1の部分に対応する1つの核酸分子および本発明の完全長の核酸分子の別の部分に対応する別の核酸分子を合成することにより、本発明の核酸分子のいずれかから得ることができる。完全長の核酸分子を形成する部分の数に応じて、必要なヌクレオチド配列を有する同数の部分を合成することができる。切断アプローチと合成アプローチとを両方適用して、上記で例示した2つの鎖より多い鎖をもつ多分割核酸分子を生成することができることを認識されたい。換言

40

50

すれば、少なくとも2つの別々の核酸の鎖は、典型的には、相互に相補的でありハイブリダイズする2つの鎖と異なるが、前記少なくとも2つの別々の核酸の鎖の間にある程度の相補性が存在することがあり、そのような相補性の結果、前記別々の鎖のハイブリダイゼーションが生じることがある。

【0126】

最後にまた、本発明による核酸分子の完全に閉鎖した、すなわち、環状の構造も実現されており、すなわち、本発明による核酸分子が、ある実施形態において、好ましくは共有結合により閉鎖され、より好ましくはそのような共有結合が本明細書に開示する本発明の核酸分子またはその任意の誘導体の核酸配列の5'末端と3'末端との間で作製されることも本発明の範囲に含まれる。

10

【0127】

本発明による核酸分子の結合定数を決定できる可能性は、実施例3および4に記載する方法の使用であり、これにより、本発明による核酸が有望な $K_D$ 値の範囲を示すという上記の知見が確認される。個々の核酸分子と、本発明ではC5aである標的との間の結合強度を表すための適切な尺度が、いわゆる $K_D$ 値であり、これは、その決定方法と共に、当業者であれば知っている。

【0128】

好ましくは、本発明による核酸が示す $K_D$ 値は、1 $\mu$ M未満である。約1 $\mu$ Mの $K_D$ 値は、核酸の標的に対する非特異的な結合の特徴であるといわれている。当業者であれば認識するであろうが、本発明による核酸等の化合物群の $K_D$ 値は、特定の範囲に収まる。約1 $\mu$ Mの上記で言及した $K_D$ は、 $K_D$ 値の好ましい上限である。標的に結合する核酸の $K_D$ の下限は、わずか約10ピコモルまたはそれ以上であってよい。個々の核酸のC5aに対する結合の $K_D$ 値が、好ましくは、この範囲に収まることは本発明の範囲に含まれる。好ましい範囲は、この範囲内の任意の第1の数およびこの範囲内の任意の第2の数を選ぶことによって定義することができる。好ましい上の $K_D$ 値は、250nMおよび100nMであり、好ましい下の $K_D$ 値は、50nM、10nM、1nM、100pMおよび10pMである。より好ましい上の $K_D$ 値は10nMであり、より好ましい下の $K_D$ 値は100pMである。

20

【0129】

本発明による核酸分子の結合特性に加えて、本発明による核酸分子は、この場合C5aである各標的分子の機能を阻害する。C5aの機能の阻害(例えば既に記載した各受容体の刺激)は、本発明による核酸分子のC5aへの結合により、および本発明による核酸分子とC5aとの複合体の形成により達成される。核酸分子とC5aとのそのような複合体は、通常はC5aによって、すなわち本発明の核酸分子との複合体中に存在しないC5aによって刺激される受容体を刺激することができない。したがって、本発明の核酸分子による受容体機能の阻害は、C5aによって刺激され得る各受容体から独立しているが、本発明の核酸分子による、C5aによる受容体の刺激の予防から生じる。

30

【0130】

本発明による核酸分子の阻害定数を決定できる可能性は、実施例5に記載する方法の使用であり、これにより、本発明による核酸が、治療的処置スキームにおける前記核酸の使用を可能にする有望な阻害定数を示すという上記の知見が確認される。この場合C5aである標的と各受容体との相互作用に関する個々の核酸分子の阻害効果の強度を表すのに適した尺度は、いわゆる50%阻害濃度(略語:  $IC_{50}$ )であり、それ自体、同様にその決定方法も当業者に知られている。

40

【0131】

好ましくは、本発明による核酸分子によって示される $IC_{50}$ 値は1 $\mu$ M未満である。約1 $\mu$ Mの $IC_{50}$ 値は、核酸分子による標的機能の非特異的な阻害に特徴的であるといわれている。当業者によって認められるように、本発明による核酸分子等の一群の化合物の $IC_{50}$ 値は特定の範囲内にある。上記で述べた約1 $\mu$ Mの $IC_{50}$ は、 $IC_{50}$ 値についての好ましい上限である。標的結合性核酸分子の $IC_{50}$ についての下限はわずか約

50

10 ピコモルでもよく、またはより高くてもよい。C5aと結合する個々の核酸のIC<sub>50</sub>値が好ましくはこの範囲内であることは、本発明の範囲に含まれる。好ましい範囲は、この範囲内の任意の第1の数およびこの範囲内の任意の第2の数を選ぶことによって定義することができる。好ましい上のIC<sub>50</sub>値は250 nMおよび100 nMであり、好ましい下のIC<sub>50</sub>値は50 nM、10 nM、1 nM、100 pMおよび10 pMである。より好ましい上のIC<sub>50</sub>値は5 nMであり、より好ましい下のIC<sub>50</sub>値は100 pMである。

#### 【0132】

本発明による核酸分子は、標的分子に依然として結合できるならば、いずれの長さであってもよい。当技術分野では、本発明による核酸の好ましい長さがあることが認識されるであろう。典型的には、その長さは、15～120ヌクレオチド長である。当業者であれば、本発明による核酸については、15と120との間の任意の整数の長さが可能であることを認識するであろう。本発明による核酸の長さのより好ましい範囲は、約20～100ヌクレオチド長、約20～80ヌクレオチド長、約20～60ヌクレオチド長、約38～44ヌクレオチド長、および約40ヌクレオチド長である。

10

#### 【0133】

本明細書の核酸分子が、好ましくは、高分子量部分であり、かつ/または好ましくは、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの体内における滞留時間に関する核酸分子の特徴を改変することを可能にする部分を含むことは本発明の範囲に含まれる。そのような改変の特に好ましい実施形態が、本発明による核酸のPEG化およびHES化である。本明細書で使用する場合、PEGはポリ(エチレングリコール)を、HESはヒドロキシエチルデンプンを表す。好ましくは、本明細書で使用する場合、PEG化は、本発明による核酸分子の改変であり、そのような改変は、本発明による核酸分子につながっているPEG部分からなる。好ましくは、本明細書で使用する場合、HES化は、本発明による核酸分子の改変であり、そのような改変は、本発明による核酸分子につながっているHES部分からなる。これらの改変、およびそのような改変を使用する核酸分子の改変プロセスが、欧州特許出願第EP1 306 382号に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれている。

20

#### 【0134】

PEGがそのような高分子量部分である場合には、分子量は、好ましくは、約20,000～約120,000 Da、より好ましくは、約30,000～約80,000 Daであり、最も好ましくは、約40,000 Daである。HESがそのような高分子量部分である場合、分子量は、好ましくは約50 kDa～約1000 kDaであり、より好ましくは約100 kDa～約700 kDaであり、最も好ましくは200 kDa～500 kDaである。HESは、0.1～1.5の、より好ましくは1～1.5のモル置換を示し、およびおよそ0.1～1.5の、好ましくはおよそ3～10のC2/C6比として表される置換グレードを示す。HESの改変プロセスは、例えば、ドイツ特許出願第DE1 200 4 006 249.8号に記載されており、その開示全体が、参照により本明細書に組み込まれている。

30

#### 【0135】

改変は、原則として、本発明の核酸分子に対して、その任意の位置において作製することができる。好ましくは、そのような改変は、核酸分子の5'末端ヌクレオチド、3'末端ヌクレオチドおよび/または5'ヌクレオチドと3'ヌクレオチドとの間の任意のヌクレオチドのいずれかに対して作製される。

40

#### 【0136】

改変、ならびに好ましくはPEG部分および/またはHES部分は、本発明の核酸分子に、直接にかまたは間接にのいずれかで、好ましくは間接にリンカーを通してつながることができる。また、本発明による核酸分子が、1つまたは複数の改変、好ましくは、1つまたは複数のPEG部分および/またはHES部分を含むことも本発明の範囲に含まれる。ある実施形態では、個々のリンカー分子が、2つ以上のPEG部分またはHES部分を

50

、本発明による核酸分子につなげる。本発明に関連して使用するリンカーはそれ自身が、直鎖状または分枝状のいずれかであってよい。この種のリンカーは、当業者には知られており、国際特許出願第WO2005/074993号およびWO2003/035665号にさらに記載されている。

【0137】

好ましい実施形態では、リンカーは、生分解性リンカーである。生分解性リンカーによって、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの身体内における滞留時間に関する本発明による核酸分子の特徴を、本発明による核酸分子からの放出の改変により改変することが可能になる。生分解性リンカーの使用によって、本発明による核酸分子の滞留時間をより良好に制御することが可能となる場合がある。そのような生分解性リンカーの好ましい実施形態が、これらに限定されないが、国際特許出願第WO2006/052790号、第WO2008/034122号、第WO2004/092191号および第WO2005/099768号に記載されている生分解性リンカーである。

10

【0138】

改変または改変基が、生分解性の改変であり、生分解性の改変は、本発明の核酸分子に、直接にかまたは間接にのいずれかで、好ましくはリンカーを通してつなげることができることは本発明の範囲に含まれる。生分解性の改変によって、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの身体内における滞留時間に関する本発明による核酸分子の特徴を、本発明による核酸分子からの放出または分解の改変により改変することが可能になる。生分解性リンカーの使用によって、本発明による核酸分子の滞留時間をより良好に制御することが可能となる場合がある。そのような生分解性リンカーの好ましい実施形態が、これらに限定されないが、国際特許出願第WO2002/065963号、第WO2003/070823号、第WO2004/113394号および第WO2000/41647に、好ましくは、第WO2000/41647号では、18頁、4~24行に記載されている。

20

【0139】

上記に記載した修飾以外にも、他の修飾を使用して、本発明による核酸分子の特徴を修飾することができ、このような他の修飾は、タンパク質、コレステロール等の脂質、アミラーゼ、デキストラン等の糖鎖の群から選択され得る。

【0140】

いずれの説にも縛られる意図はないが、好ましくは生理的に許容されるポリマー、より詳細には本明細書に開示するポリマーの1つまたはいくつか等の高分子量部分で本発明による核酸分子を修飾することにより、そのような修飾された本発明の核酸分子の、本発明の修飾核酸分子が投与される動物またはヒトの身体からの排出動態が変化する。より詳細には、そのような修飾をされた本発明の核酸分子の分子量が増加し、特にL型の時に、すなわちL-核酸分子であるときに本発明の核酸分子が代謝にさらされないため、動物の身体、好ましくは哺乳動物の身体、より好ましくはヒトの身体からの排出が減少する。典型的には排出が腎臓を介して行われるので、本発明者らは、こうして修飾された核酸分子の糸球体ろ過率がこの種の高分子量修飾を有さない核酸分子と比較して著しく低下、その結果、動物の身体における修飾核酸分子の滞留時間が増加すると推測している。それに関連して、そのような高分子量修飾にも関わらず、本発明による核酸分子の特異性が、有害な方法で影響を受けないことは特に注目し得る。この限りでは、本発明による核酸分子は、とりわけ、持続性放出をもたらす医薬製剤が本発明による核酸分子の持続性放出をもたらすことが必ずしも必要でないような、薬学的活性化合物から通常は予想できない驚くべき特徴を有する。むしろ、高分子量部分を含む修飾された形態の本発明による核酸分子は、その修飾のため、すでに持続性放出製剤から放出されたかのように働くので、それ自体すでに持続性放出製剤として使用することができる。この限りでは、本明細書に開示する本発明による核酸分子の(1つまたは複数の)修飾およびこうして修飾された本発明による核酸分子ならびにそれらを含む任意の組成物は、独特の、好ましくはその調節された薬物動態および生体内分布をもたらすことができる。これには、動物およびヒトの身体の循環ならびにそのような動物およびヒトの組織への分布における滞留時間も含まれる。その

30

40

50

ような修飾は、特許出願 W O 2 0 0 3 / 0 3 5 6 6 5 にさらに記載されている。

【 0 1 4 1 】

しかしまた、本発明による核酸分子が、いずれの修飾、特に P E G または H E S 等の高分子量修飾も含まないことも本発明の範囲に含まれる。そのような実施形態は、本発明による核酸分子が体内のいずれかの標的の臓器もしくは組織に対して優先的な分布を示す場合または投与後に身体からの本発明による核酸分子の急速なクリアランスが望まれる場合には特に好ましい。体内のいずれかの標的の臓器または組織に対して優先的な分布プロフィールを示す、本明細書に開示する本発明による核酸分子によって、核酸分子の全身濃度は低く保ちながら、標的組織において有効な局所濃度を確立することが可能となるであろう。これによって、低い用量を使用することが可能になり、これは、経済的な観点から有益であるのみならず、また、その他の組織の核酸分子に対する不必要な曝露も減少し、したがって、副作用の潜在的なリスクが低下するであろう。本発明による核酸またはそれを含む医薬品を使用する *in vivo* 画像診断または特異的な治療投与が必要な場合には、とりわけ、投与後の身体からの本発明による核酸分子の急速なクリアランスが望まれるだろう。

10

【 0 1 4 2 】

本明細書では本発明による核酸とも呼ぶ本発明の核酸、および/または本発明によるアンタゴニストを、医薬品を生成または製造するために使用することができる。そのような医薬品、または本発明による医薬組成物は、本発明の核酸のうち少なくとも1つを、場合によりさらなる薬学的に活性な化合物と共に含有し、本発明の核酸はそれ自体が、好ましくは、薬学的に活性な化合物として作用する。そのような医薬品は、好ましい実施形態では、少なくとも薬学的に許容できる担体を含む。そのような担体は、例えば、水、緩衝剤、P B S、グルコース溶液、好ましくは、5%グルコース塩平衡化溶液、デンプン、糖、ゼラチンまたは任意のその他の許容できる担体物質であってよい。そのような担体は一般に当業者に知られている。また、当業者であれば、本発明の医薬品のまたはそれに関するいずれの実施形態、使用および態様も、本発明の医薬組成物に適用可能であり、逆もまた同じであることを認識するであろう。

20

【 0 1 4 3 】

治療および/または予防のために、本発明によるかまたは本発明に従って調製した核酸、医薬組成物および医薬品を使用することができる適応症、疾患および障害は、それぞれの発症機構において C 5 a が直接的にかまたは間接的にのいずれかで関与した結果生じる。

30

【 0 1 4 4 】

C 5 a の炎症部位における局所放出の結果、力強い炎症促進性の刺激が生じる。したがって、C 5 a の中和が、多くの急性または慢性の状態、例えば免疫複合体関連疾患全般 ( H e l l e r ら、1999 ) ; 例えば、アルツハイマー病における神経変性および炎症 ( B o n i f a t i および K i s h o r e、2007 ) において有益な場合があり、補体 C 5 a 受容体アンタゴニストである P M X 2 0 5 は、行動学的パラメータならびに線維状沈着物および活性化グリア等の病理学的マーカーの低下を改善した ( F o n s e c a ら、2009 ) 。 C 5 a が関与する、その他の炎症性疾患は、全身性エリテマトーデス ( J a c o b ら、2010a ; J a c o b ら、2010b ) 、喘息 ( K o h l、2001 ) ; 外傷の二次的損傷 ( Y a o ら、1998 ) ; 敗血症性ショック ( H u b e r - L a n g ら、2001 ) ; 全身性炎症反応症候群 ( S I R S ) ; 多臓器不全 ( M O F ) ; 急性呼吸促進症候群 ( A R D S ) ; 炎症性腸症候群 ( I B D ) ( W o o d r u f f ら、2003 ) ; 免疫複合体媒介性腎臓疾患 ( W a n g、2006 ) 、例えば、全身性エリテマトーデスの合併症として ( M a n d e r s o n ら、2004 ) ; 感染およびその結果 ( 例えば血管漏出または歯周炎の二次的な骨喪失などの骨喪失 ( B r e i v i k ら、2011 ) ) ; 重度の熱傷 ( P i c c o l o ら、1999 ) ; とりわけ臓器移植後臓器機能障害 ( L e w i s ら、2008 ) もしくは線維症および/または、例えば二次的損傷をもたらす心臓、脳または肺の梗塞後の臓器の再構築をもたらす恐れのある、心臓、脾臓、膀胱、膵臓、胃、肺、肝

40

50

臓、腎臓、肢、脳、骨格筋または腸等の臓器の再灌流傷害 (Rileyら、2000) (Guelerら、2008; Khanら、2011; van der Palsら、2010; Zhengら、2008); 乾癬 (Berghら、1993); 心筋炎; 多発性硬化症 (Muller-Ladnerら、1996); 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)、溶血、血栓塞栓症 (Hillmerら、2007)、ならびに関節リウマチ (RA) (Woodruffら、2002) 腎細胞癌の切除、および例えば骨関節炎または遅延治癒をもたらす骨破壊を促進する破骨細胞の活性化である。また、補体 C5a は、加齢黄斑変性においてはドルーゼンの量の増加として見出されており、VEGF 発現の増加をもたらす、視覚障害および失明をもたらす恐れがある脈絡膜血管新生を促進することが示されている (Nozakiら、2006)。

10

## 【0145】

補体系の活性化により、マウスモデルにおける脳性マラリアの発症に対する感受性を高めることも示されている。C5a または C5a 受容体に対する免疫を有するマウス由来の血清を使用する、C5a または C5a 受容体の遮断により、脳性マラリアに対する耐性が付与された。したがって、C5/C5a 軸の遮断は、マラリア、とりわけヒトにおける脳性マラリアの発症の予防に有益であることができる (Patelら、2008)。

## 【0146】

補体が関与する自己免疫炎症性疾患が最近になって総説されている (Chenら、2010)。可能なおよびすでに追求されている補体標的療法について、Nature Biotechnology に専門家が総説している (Ricklin および Lambris、2007)。2011年に、Molecular Medicine に最新情報が公開された (Ehrnthallerら、2011)。

20

## 【0147】

もちろん、本発明による C5a 結合性核酸は、ヒト C5a と相互作用するかまたはそれに結合するので、当業者であれば一般に、本発明による C5a 結合性核酸を、本明細書に記載するヒトおよび動物のいずれかの疾患の治療、予防および/または診断のために容易に使用することができることを理解するであろう。それに関連して、本発明による核酸分子を、本明細書に記載する疾患、障害または状態のうちのいずれかの治療および予防のために、そのような疾患、障害および状態の根拠をなす作用様式に関わらず使用することができることを認識されたい。

30

## 【0148】

以下に、いずれの説にも縛られる意図はないが、本発明による核酸分子を、種々の疾患、障害および状態に関して使用することについての理論的根拠を提供し、したがって、請求している本発明による核酸分子の治療、予防および診断への適用を妥当なものとする。いずれの不必要な反復も回避するために、それに関連して概説するように、C5a - C5a 受容体の軸が関与することから、前記軸は、本発明による核酸分子によって対処することができ、したがって、請求している治療、予防および診断の効果が達成されることを認識されたい。患者の疾患、障害および状態の詳細な事項、ならびにそれに関連して記載する治療計画の詳細のいずれもが、本出願の好ましい実施形態の対象となることもさらに認識されたい。

40

## 【0149】

骨髄由来サプレッサー (略語: MDS) 細胞は、30年を超える昔に癌患者で最初に観測され、その抗腫瘍免疫の妨害者としての役割が今になって評価されている。分化の中間段階で捕捉された正常な骨髄細胞の異種集団である MDS 細胞は、実質的には全ての癌患者において血液、リンパ腺中におよび腫瘍部位に蓄積する。健康な個体では、これらの細胞はマクロファージ、樹状細胞および好中球に分化するが、腫瘍は、免疫前駆細胞の分化を妨害するいくつかの因子を分泌する (Ostrand-Rosenberg、2008)。健康なマウスの末梢血および脾臓から単離した MDS 細胞について示すように、MDS 細胞はその表面上に、その成熟対応物である顆粒球および単球の C5a 受容体と同程度 (大量発現) まで C5a 受容体を発現する。さらに担癌マウスでは、MDS 細胞は C5a

50

受容体を発現するが、腫瘍に関連するMSD細胞の表面上での発現レベルは、末梢血および脾臓におけるMSD細胞上に比べて低い。Markiewskiらにより示されるように、腫瘍に関連する細胞にC5a受容体が内部移行されることから、C5a受容体アンタゴニストはMSD細胞の表面上のC5a受容体の機能を遮断することができ、腫瘍増殖の減少をもたらした(Markiewskiら、2008)。C5aはまた、特定の免疫疾患を患う患者における腫瘍監視およびNK機能障害への補体の悪影響についての説明を提供するナチュラルキラー細胞(NK細胞)機能のサブレッサーとしても作用する(Lira、2012; Minら、2012)。

【0150】

したがって、治療および/または予防のために、本発明による医薬品を使用することができる疾患および/または障害および/または疾患状態として、これらに限定されないが、腫瘍に関連した疾患および/または障害および/または疾患状態が挙げられる。

10

【0151】

好ましい実施形態では、腫瘍(tumor)または腫瘍(tumour)は、細胞の異常な増殖(腫瘍性と命名される)により形成される膨化または病変に関する名称である。腫瘍は良性、前悪性または悪性の腫瘍であることができる。さらに、腫瘍は固体腫瘍であることができ、好ましくは癌腫(carcinoma)、肉腫(sarcoma)、アオテオマ(aotoma)、線維肉腫および骨軟骨腫(chondrosoma)であることができる。

【0152】

特に本発明による医薬品または核酸分子により治療され得る腫瘍は、好ましくは、内分泌系、眼、消化管、生殖系、造血系(混合腫瘍および胚芽腫を含む)、乳腺、神経系、呼吸器系、骨格、皮膚、軟組織、泌尿系の腫瘍を含む群から選択される腫瘍である。

20

【0153】

好ましくは、これらの腫瘍は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、骨肉腫、膠芽腫、黒色腫、小細胞肺癌および結腸直腸癌を含む群から選択される。

【0154】

本発明者らによる核酸をそれぞれ含有する医薬品および医薬組成物を、そのように治療のために使用することができることは本発明の範囲に含まれる。

【0155】

さらなる実施形態では、医薬品は、腫瘍の治療のために薬学的に活性な薬剤をさらに含む。そのようなさらなる薬学的に活性な化合物は、これらに限定されないが、とりわけ、抗腫瘍性の活性物質として知られているもの、アルキル化剤、代謝拮抗剤、血管新生阻害剤、有糸分裂阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞シグナル伝達の阻害剤、ホルモン、抗体、免疫複合体および融合タンパク質である。

30

【0156】

その他の薬学的に活性な化合物は、これらに限定されないが、とりわけ、プレオマイシン、ラルチトレキセドおよびベメトレキセド等のチミジル酸合成酵素(thymidylatsynthase)の阻害剤、L-アスパラギナーゼ、ミルテホシン(Miltefosin)およびアナグレイド等の酵素、ボルテゾミブ等のプロテアソームの阻害剤として知られているものである。

40

【0157】

さらに、本発明による医薬品を、慢性閉塞性(obstructive)の肺疾患の治療および/または予防に使用することができる。

【0158】

慢性閉塞性肺疾患(略語:COPD)は、肺からの気流の持続的な閉塞によって特徴付けられる肺の病気である。COPDは、正常な呼吸を妨げ、完全に可逆性でない、診断が不十分で生命を脅かす肺病である。COPDは少数の肺疾患を含み、最も共通なのは、慢性気管支炎および肺気腫である。COPDを患う多くの人々は、これらの疾患の両方を有する。肺気腫は、気道の先端の肺胞に対する損傷であり、これは身体が必要とする酸素を

50

取り込むことを困難にする。慢性気管支炎中に、気道は炎症を起こし、赤くなり、粘着性の粘液を過剰に作る。気道の壁は腫大し、空気が通過するのを部分的に遮断する。

【0159】

好中球はC5a勾配へ引き付けられ、病原体を死滅させるためにスーパーオキシドラジカルを放出し、炎症部位で複合グルクロニド抱合体を加水分解するためにベータ-グルクロニダーゼを放出する。しかし、好中球が無菌の炎症部位、例えば感染、発作もしくは臓器移植後の再灌流部位に、または自己免疫疾患、アルツハイマー病および以下に列挙されている他のものの場合に動員される場合、好中球の貴重な防御機構は身体に損傷を与える可能性がある。

【0160】

その結果、非常に高いC5a濃度により、とりわけ、敗血症中に現れるように、局所的にのみ上昇しない場合に、(臓器障害をもたらす)好中球の全身的活性化、それに続く、好中球の細胞表面上でのC5a受容体発現の低下による消耗および失活をもたらされる。このことにより、患者は、患者の身体中に存続する病原体に対してさらに脆弱になる(Huber-Langら、2002)。

【0161】

(分化したBAF-3細胞を使用する走化性アッセイによって明らかになるように)その受容体(CD88)に対するC5a媒介性効果についても抑制性があるC5a結合性核酸は、したがって、C5aシグナル伝達の上記結果を遮断する可能性があり、異常なC5aシグナル伝達が関与する多くの疾患および状態において医薬品の一部としての有益性を証明することができた。これらの状態の内の1つは複数菌による敗血症である。敗血症におけるC5aシグナル伝達の有害な役割についての証拠を収集している豊富な本文の文献がある(Ward、2010b)。盲腸結紮穿孔(CLP)の研究において、本発明による核酸は、マウスの生存期間および臓器機能パラメータを改善することが発見された。CLPは、複数菌による敗血症を対象とする十分に確立された齧歯動物モデルである。最近では、盲腸結紮穿孔により誘発される敗血症における補体C5aの役割が、野生型およびC5欠損マウスにおいて調べられた(Flierlら、2008)。C5-/-マウスは野生型マウスと比較して生存期間の優位性を有していなかったが、野生型マウスと比較した場合、血液感染性細菌が400倍に増加することが示された。これらの効果は、C5(-/-)マウスに終末膜侵襲複合体(MAC)を構築する能力がないことと関連した。著者らは、敗血症中において、C5aまたは(C5よりもむしろ)その受容体の選択的な遮断がより期待できる戦略であると思われる結論付ける。なぜならば、C5a遮断により、MACは依然として形成されるがC5aの有害効果が予防されるからである。一致するように、C5a受容体であるCD88およびC5L2の遺伝的欠損、CD88の薬理的遮断、またはC5aの薬理的中和は、盲腸結紮穿孔(CLP)により誘発される敗血症において保護的であることが明らかとなっている(Czermakら、1999; Rittirschら、2008)。ヒト全血液を使用する髄膜炎菌性敗血症のトランスレーショナルin vivoモデルは、選択的C5a阻害は(C5切断の遮断とは対照的に)、細菌排除を含むことなく、潜在的に有害な白血球活性化を予防することを確認する(Sprongら、2003)。C5aの阻害により、全身性炎症、凝固およびその他の発症機構を制限することによって実験敗血症における多臓器不全が予防される(Huber-Langら、2001; Huber-Langら、2002; Laudesら、2002; Rittirschら、2008; Ward、2010a)。本発明による核酸はC5に結合するが、MAC形成に必要であるC5aおよびC5bへのC5切断を遮断しない。むしろ、本発明の核酸はタンパク質C5を占有し、核酸はまた、終末血漿中半減期を増加させ、および例えばC5転換酵素によりC5aが一旦遊離されるとC5aの作用を選択的に遮断する。敗血症モデルでは、本発明による核酸は炎症を限定し、多臓器不全および浮腫形成を予防し、ならびに生存期間を改善することが明らかとなっている。

【0162】

敗血症患者は、急性肺損傷(ALI)および急性呼吸促迫症候群(ARDS)により機

10

20

30

40

50

械的人工呼吸を必要とすることが多い。ALI / ARDSは、肺炎における地域感染または院内感染による肺の直接感染からも発症し得る。ALI / ARDSにおけるC5aの病原的役割に関する十分な証拠がある。C5aにより誘発される組織因子発現は、ALI / ARDS患者の肺胞内での線維素沈着の一因となる(Kambasら、2008)。C5- / -マウスでは実験ALIが軽減され、肺におけるC5a中和またはC5aRのサイレンシングにより炎症反応が抑制され、および血管漏出が予防される(BosmannおよびWard、2012)。

#### 【0163】

さらに、治療および/または予防のために、本発明による医薬品を使用することができる他の疾患および/または障害および/または疾患状態として、これらに限定されないが、自己免疫性疾患、例として、関節リウマチ(略語: RA)、強直性脊椎炎(略語: AS)、全身性エリテマトーデス(略語: SLE)、多発性硬化症(略語: MS)、乾癬、円形脱毛症、温式および冷式の自己免疫性溶血性貧血(略語: AIHA)、非典型溶血性尿毒症、悪性貧血、急性炎症性疾患、自己免疫性副腎炎、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー(略語: CIDP)、チャグ-ストラウス症候群、コーガン症候群、クレスト症候群、尋常性天疱瘡および落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、膵炎、腹膜炎、乾癬性関節炎、リウマチ熱、サルコイドーシス、シェーグレン症候群、強皮症、セリアック病、全身硬直症候群、高安動脈炎、一過性グルテン不耐性、自己免疫性ブドウ膜炎、白斑、多発性軟骨炎、疱疹状皮膚炎(略語: DH)またはジューリング病、線維筋痛症、グッドパスチャー症候群、ギラン-バレー症候群、橋本甲状腺炎、自己免疫性肝炎、炎症性腸疾患(略語: IBD)、クローン病、潰瘍性大腸炎、重症筋無力症、免疫複合体障害、糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、抗リン脂質症候群、多腺性自己免疫性症候群、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑(略語: ITP)、蕁麻疹、自己免疫性不妊、若年性関節リウマチ、サルコイドーシス、自己免疫性心筋症、ランバート-イトン症候群、硬化性苔癬、ライム病、グレープス病、ベーチェット病、メニエル病、反応性の関節炎(ライター症候群); HIV、HBV、HCV、CMV等のウイルス、またはリーシュマニア、リケッチア、クラミジア、コクシエラ、マラリア原虫、ブルセラ、マイコバクテリア、リステリア、トキソプラズマおよびトリパノソーム等の細胞内寄生生物による感染; 外傷の二次的損傷; 局所性炎症、ショック、アナフィラキシー性ショック、熱傷、敗血症性ショック、出血性ショック、全身性炎症反応症候群(略語: SIRS)、多臓器不全(略語: MOF)、喘息およびアレルギー; 側頭動脈炎、血管炎、血管漏出等の血管炎、およびアテローム動脈硬化; 急性中枢神経系傷害、心筋炎、皮膚筋炎、歯肉炎、急性呼吸不全、慢性閉塞性肺疾患、脳卒中、心筋梗塞、再灌流傷害、認知神経科学的機能不全、熱傷; ブドウ膜炎、加齢黄斑変性(略語: AMD)、糖尿病性網膜症(略語: DR)、糖尿病性黄斑浮腫(略語: DME)、眼類天疱瘡、角結膜炎、スティーブン-ジョンソン症候群およびグレープス眼症等の炎症性眼疾患; 全身性疾患の局所的所見、血管構造の炎症性疾患、急性中枢神経系傷害、1型および2型の糖尿病、糖尿病所見、SLE、ならびに眼、脳、血管構造、心臓、肺、腎臓、肝臓、消化管、脾臓、皮膚、骨、リンパ系、血液もしくはその他の臓器系におけるリウマチ性疾患、冠状動脈バイパスグラフト(略語: CABG)、オフポンプ冠状動脈バイパスグラフト(略語: OPCABG)、最小限侵襲直接冠状動脈バイパスグラフト(略語: MIDCAB)、経皮経管的冠状動脈血管形成術(略語: PTCA)、血栓溶解、臓器移植および血管クランプ手術の予防および/または支援および/または術後治療のため; 肝臓、腎臓、腸、肺、心臓、皮膚、肢、角膜、ランゲルハンス島、骨髄、血管および膵臓等の移植された臓器もしくは移植しようとする臓器の臓器損傷の予防のため、または移植された臓器についての移植片拒絶の治療における使用のため; 胎児拒絶が挙げられる。

#### 【0164】

治療および/または予防のために、核酸を使用することができる種々の疾患および障害を、以下のようにグループ化することができる。

#### 【0165】

10

20

30

40

50

## 1. 自己免疫性 / 炎症性の疾患

1.1. アレルギー、敗血症性ショック、外傷の二次的損傷、温式および冷式の自己免疫性溶血性貧血（略語：A I H A）、全身性炎症反応症候群（略語：S I R S）、出血性ショック、糖尿病1型、糖尿病2型、糖尿病所見、びまん性強皮症、歯周炎およびそれに関連する骨喪失、多発性軟骨炎、多腺性自己免疫性症候群、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（略語：S L E）およびその所見、反応性の関節炎（ライター症候群としても知られている）が含まれる、全身性の自己免疫性および / または炎症性の疾患

【0166】

1.2. クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、一過性グルテン不耐性、炎症性腸疾患（略語：I B D）、膵炎、消化管のアレルギー性過敏症、壊死性腸炎が含まれる、消化管の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

10

【0167】

1.3. 乾癬、蕁麻疹、皮膚筋炎、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、水疱性類天疱瘡、モルフェア / 線状強皮症、白斑、疱疹状皮膚炎（略語：D H）またはジューリング病、硬化性苔癬が含まれる、皮膚の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

【0168】

1.4. 血管炎（好ましくは、側頭動脈炎）、血管炎、ヘノッホシェーンライン紫斑病、抗好中球細胞質抗体（A N C A）関連血管炎、血管漏出、リウマチ性多発筋痛症、アテローム動脈硬化、チャージ - ストラウス症候群、高安動脈炎、グッドパスチャー症候群（= 抗糸球体基底膜疾患；多くの場合、腎臓系球体および肺に影響を及ぼす）、糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、ベーチェット病が含まれる、血管構造の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

20

【0169】

1.5. 多発性硬化症（略語：M S）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー（略語：C I D P）、認知神経科学的機能不全、全身硬直症候群、ギラン - バレー症候群、重症筋無力症、ランバート - イートン症候群、視神経脊髄炎（デビック症候群）が含まれる、神経系の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

【0170】

1.6. 関節リウマチ、眼、脳、肺、腎臓、心臓、肝臓、消化管、脾臓、皮膚、骨、リンパ系、血液またはその他の臓器におけるリウマチ性疾患、強直性脊椎炎（略語：A S）、サルコイドーシス、歯周炎および関連する骨喪失、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、乾癬性関節炎、リウマチ熱、多発性軟骨炎、線維筋痛症、若年性関節リウマチ、ライム病、反応性の関節炎（ライター症候群としても知られている）が含まれる、筋肉、骨格の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

30

【0171】

1.7. コーガン症候群、自己免疫性副腎炎、免疫複合体障害、メニエル病、局所性炎症、円形脱毛症、急性炎症性疾患、原発性胆汁性肝硬変、シェーグレン症候群、強皮症、びまん性強皮症、クレスト症候群、モルフェア / 線状強皮症、自己免疫性ブドウ膜炎、橋本甲状腺炎（自己免疫性の甲状腺破壊）、グレーブス病、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、糸球体腎炎、腹膜炎、抗リン脂質症候群、特発性肺線維症、腎線維症、肝線維症、自己免疫性不妊、胎児拒絶または流産、および移植片対宿主病が含まれる、その他の自己免疫性および / または炎症性の疾患。

40

【0172】

2. ブドウ膜炎、結膜炎、加齢黄斑変性（略語：A M D）、糖尿病性網膜症（略語：D R）、糖尿病性黄斑浮腫（略語：D M E）、網膜血管閉塞、緑内障、白内障、自己免疫性の網膜および眼内の炎症性疾患、眼類天疱瘡、角結膜炎、スティーブン - ジョンソン症候群ならびにグレーブス眼症が含まれる眼疾患。

【0173】

3. 脳卒中、心筋梗塞、肝臓（A r u m u g a m ら、2004）、腎臓（A r u m u g a m ら、2003）、腸、肺、心臓、皮膚、肢、角膜、ランゲルハンス島（T o k o d a

50

iら、2010)、骨髄、血管および膵臓等の移植された臓器に対する再灌流傷害、移植後の血栓性微小血管症または臓器損傷、臓器または骨髄の移植後の腎臓損傷が含まれる、再灌流傷害および移植片拒絶。

【0174】

4. 肝臓、腎臓、腸、肺、心臓、皮膚、肢、角膜、ランゲルハンス島、骨髄、血管および膵臓等の移植された臓器の移植片拒絶が含まれる、移植片拒絶の予防。

【0175】

5. アテローム動脈硬化、心筋炎、心筋梗塞、脳卒中、肺動脈高血圧症(PAH)、腹部大動脈瘤、血管構造の炎症性疾患、血管炎、好ましくは、側頭動脈炎、血管炎、血管漏出、糖尿病所見、子癇前症、自己免疫性心筋症、静脈宿主病、催不整脈性右心室異形成/心筋症、冠状動脈バイパスグラフト(略語: CABG)の予防および/または支援および/または術後治療のためが含まれる心血管疾患。

10

【0176】

6. インスリン耐性、耐糖能障害、脂肪炎症および食事性肥満における心血管機能障害が含まれる代謝機能不全。

【0177】

7. 喘息、急性呼吸不全、急性肺損傷、輸血関連肺損傷、成人呼吸促迫症候群、慢性閉塞性肺疾患、人工呼吸器により誘発される肺損傷、肺炎およびそれらの合併症が含まれる呼吸器疾患。

【0178】

8. 炎症性眼疾患、自己免疫性ブドウ膜炎(Coplandら、2010)、結膜炎、春季カタル、全身性疾患の局所的所見が含まれる炎症性疾患。

20

【0179】

9. 外傷および骨折の二次的損傷、ショック、熱傷、アナフィラキシー性ショック、出血性ショック、多臓器不全(略語: MOF)、急性中枢神経系傷害、急性中枢神経系傷害、臓器または膵島の移植後等の活性化した凝固系による過剰なC5a産生に起因する急性損傷が含まれる急性反応。

【0180】

10. 疼痛、急性疼痛、慢性疼痛、神経因性疼痛、モルヒネ耐性および退薬により誘発される痛覚過敏。

30

【0181】

11. 神経障害、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病およびパーキンソン病(Farkasら、1998)が含まれる、神経性および神経変性の疾患。

【0182】

12. 以下が含まれる感染性疾患、

12.1 細菌感染、好ましくは、髄膜炎、ライム病、反応性の関節炎(ライター症候群としても知られている)、尿路および腎臓の感染、敗血症、および臓器不全、心機能不全、全身性低灌流、アシドーシス、成人呼吸促迫症候群等のその合併症、細胞内病原体による感染(Klosら、2009)、

12.2 ウイルス感染、好ましくは、HIV、HBV、HCV、CMV、ウイルス性髄膜炎、

12.3 細胞内寄生生物、好ましくは、リーシュマニア、リケッチア、クラミジア、コクシエラ、マラリア原虫、とりわけ脳性マラリア、ブルセラ、マイコバクテリア、リステリア、トキソプラズマおよびトリパノソーマ。

40

【0183】

13. 凝固および線溶系の活性化に関連する疾患、播種性血管内凝固症候群(DIC)および/または血栓症、悪性貧血、温式および冷式の自己免疫性溶血性貧血(略語: AIHA)、抗リン脂質症候群およびそれに関連する合併症、動脈および静脈の血栓症、反復流産および胎児の死亡等の妊娠合併症、子癇前症、胎盤機能不全、胎児発育不全、子宮頸管のリモデリングおよび早産、特発性血小板減少性紫斑(略語: ITP)、非定型溶血性

50

尿毒症症候群（aHUS）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）およびアレルギー性の輸血反応が含まれる血液学的疾患。

【0184】

14. 補体の生体材料による活性化に関連する臨床的合併症、および血液透析、アフエレーシス、関節炎の関節の粘性補給、心肺バイパス、人工血管移植片、心血管デバイスの使用が含まれる手順で生じる凝固カスケード。

【0185】

また、本発明による核酸は、患者の免疫系への有害な作用を回避するために、手術中に使用することもでき、より好ましくは、冠状動脈バイパスグラフト（略語：CABG）の予防および/または支援および/または術後治療のため、オフポンプ冠状動脈バイパスグラフト（略語：OPCABG）、最小限侵襲直接冠状動脈バイパスグラフト（略語：MIDCAB）、経皮経管的冠状動脈血管形成術（略語：PTCA）、血栓溶解、臓器移植、脳および脊髄の手術、再建手術ならびに血管クランプ手術；血管漏出および/または肺気腫等の人工呼吸器により誘発される肺損傷または二次的損傷を避けるための、人工呼吸または人工呼吸補助による任意の治療の間移植された臓器もしくは移植しようとする臓器の臓器損傷の予防のため、または肝臓、腎臓、腸、肺、心臓、皮膚、肢、角膜、ランゲルハンス島、骨髄、血管および膵臓等の移植された臓器についての移植片拒絶および再灌流傷害の治療における使用のためが含まれる。

10

【0186】

本発明者らによる核酸を含有する医薬品および医薬組成物をそれぞれ、そのような場合における治療のために使用することができることは本発明に含まれる。

20

【0187】

さらなる実施形態では、医薬品は、薬学的に活性な薬剤をさらに含む。そのようなさらなる薬学的に活性な化合物は、これらに限定されないが、とりわけ、免疫系を抑制することが知られているもの、例として、カルシニューリン阻害剤、シクロスポリンA、メトトレキサート、アザチオプリン、タクロリムス、ラバマイシン、クロラムブシル、レフルノミド、ミコフェノール酸モフェチル、プレキナル、ミゾリピン、サリドマイドまたはデオキシスパガリンである。また、さらなる薬学的に活性な化合物は、さらなる実施形態では、ヒスタミン産生を低下させる化合物、例として、メクロジン、クレマスチン、ジメチンデン、パミピン、ケトチフェン、セチリジン、ロベセチリジン（lovecetirizin）、セスロラタジン（cesloratadin）、アゼラスチン、ミゾラスチン、レボカバステチン、テルフェナジン、フェキソフェナジンまたはエバステチンのうちの1つであってもよい。また、そのような化合物は、これらに限定されないが、ステロイドであってもよく、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、デキサメタゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾン、エファーフエセント（effervescent）またはブデソニドのような副腎皮質ステロイドを含む群から選択される。さらに、そのような化合物は、1つまたはいくつかの抗生物質、例として、これらに限定されないが、アミノグリコシド、 $\beta$ -ラクタム抗生物質、ジャイレース阻害剤、糖ペプチド抗生物質、リンコサミド、マクロライド抗生物質、ニトロイミダゾール誘導体、ポリペプチド抗生物質、スルホンアミド、トリメトプリムおよびテトラサイクリンであってもよい。さらに、より特異的な抗炎症性または抗血管新生の生物学的製剤、例として、ベバシズマブ、ラニビズマブ、IL-10、エルリズマブ（erlizumab）、トレルマブ（tolermab）、リツキシマブ、ゴミリキシマブ（gomiliximab）、バシリキシマブ、ダクリズマブ、HuMax-TAC、ピジリズマブ、HuMaxCD4、クレノリキシマブ、MAX16H5、TNX100、トラリズマブ（toralizumab）、アレムツズマブ、CY1788、ガリキシマブ、パキセリズマブ、エクリズマブ、PMX-53、ETI104、FG3019、ベルチリムマブ（bertilimumab）、249417（抗第IX因子）アブシキシマブ、YM337、オマリズマブ、タリズマブ、フォントリズマブ（fontolizumab）、J695（抗IL12）、HuMaxIL-15、メボリズマブ、エルシリモマブ（elsilimomab）、HuD

30

40

50

REG、アナキンラ、Xoma-052、アダリムマブ、インフリキシマブ、セルトリズマブ、アフェリモマブ、Cyt oFab、AME527、ヴァパリキシマブ(Vapaliximab)、ベバシズマブ、ラニビズマブ、ヴィタキシン(vitaxin)、ベリムマブ(belimumab)、MLN1202、ボロシキシマブ(volociximab)、F200(抗51)、エファリズマブ、m60.11(抗CD11b)、エタネルセプト、オナセプト(onercept)、リロナセプト、アバタセプト、ナタリズマブまたはシプリズマブ(siplizumab)、トシリズマブ、ウステキヌマブ、ABT-874を組み合わせて使用することもできる。最後に、さらなる薬学的に活性な薬剤は、いずれかのその他のケモカインの活性調節物質であってもよく、それらは、ケモカインのアゴニストもしくはアンタゴニスト、またはケモカイン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストであってよく、ケモカインは走化性脂質であってもよい。例として、S1P受容体調節物質であるフィンゴリモドが挙げられる。それに代わってまたは追加して、そのようなさらなる薬学的に活性な薬剤は、本発明によるさらなる核酸である。あるいは、医薬品は、C5aとは異なる標的分子に結合するかまたは本発明による核酸のうちの1つとは異なる機能を示す、少なくとも1つのさらなる核酸を含む。

10

## 【0188】

一般に、C5aアンタゴニストは、その他の炎症促進性の分子またはそれらの受容体の阻害剤と組み合わせることができる。その作用を、C5aアンタゴニストと組み合わせることで減弱させることができる炎症促進性の分子についての例には、IL-1、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-23、TNF、47、51、BlyS、カドヘリン、CCR2、CD11a、CD11b、CD125、CD130、CD16、CD18、CD2、CD20、CD22、CD23、CD25、CD28、CD3、CD30、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45R、CD54、CD62E、CD62L、CD68、CD8、CD80、CD86、CD95、CEP、ガストリン-R、C1、C1-エステラーゼ、C5、D因子、MBL、補体受容体1、CRT H2-受容体、CTGF、E-およびP-セレクチン、エオタキシン、第IX因子、FGF-20、Fgl-2、GM-CSF、GP I Ib / I I I a受容体、HMG1、ICAM-1、IgE、胸腺細胞、IFN、IFN $\gamma$ 、IP-10、MCP-1、M-CSF受容体、MIF、MMP9、PDGF-D、SDF-1、TGF $\beta$ 1、組織因子、チロシンキナーゼ受容体、VAP-1、VCAM-1、VEGF、VLA1、フォン-ヴィルブランド因子、スフィンゴシン1ホスフェート、セラミド-1ホスフェート、ならびにマイトジェンの阻害剤、例えばリゾホスファチジン酸の阻害剤がある。

20

30

## 【0189】

最後に、さらなる薬学的に活性な薬剤は、いずれかのその他のケモカインの活性調節物質であってもよく、それらは、ケモカインのアゴニストもしくはアンタゴニスト、またはケモカイン受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストであってよい。それに代わってまたは追加して、そのようなさらなる薬学的に活性な薬剤は、本発明によるさらなる核酸である。あるいは、医薬品は、C5aとは異なる標的分子に結合するかまたは本発明による核酸のうちの1つとは異なる機能を示す、少なくとも1つのさらなる核酸を含む。

40

## 【0190】

原則として、それに代わってまたは追加して医薬品を使用して、疾患を治療するための医薬品の使用に関連して開示する前記疾患のうちのいずれかを予防することは本発明の範囲に含まれる。したがって、それぞれのマーカー、すなわち、それぞれの疾患についてのマーカーが当業者には知られている。好ましくは、それぞれのマーカーはC5aである。

## 【0191】

本発明の医薬品の1つの実施形態では、そのような医薬品は、本明細書に開示する疾患、特に本発明の医薬品を使用すべき疾患のうちのいずれかのために、その他の治療と組み合わせて使用するためのものである。

## 【0192】

50

「併用療法（「combination therapy」または「co-therapy」）」は、本発明の医薬品と、特異的な治療計画の一部としての少なくとも第2の薬剤との投与を含んで、これらの治療剤、すなわち、本発明の医薬品と前記第2の薬剤との共同作用からの有益な効果をもたらす。組合せの有益な効果として、これらに限定されないが、治療剤の組合せの結果として生じる薬物動態学的または薬力学的な共同作用が挙げられる。これらの治療剤を組み合わせた投与は典型的には、（通常、選択された組合せに依存して、分、時間、日または週の）定義された期間にわたり実施される。

【0193】

「併用療法」は、一般にはそうではないが、偶発的かつ任意に本発明の組合せに至る別個の単独療法の投与計画の一部としての、これらの治療剤のうち2つ以上の投与を包含することを意図することができる。「併用療法」は、これらの治療剤を順次に投与すること、すなわち、各治療剤を異なる時期に投与すること、およびこれらの治療剤または治療剤のうち少なくとも2つを実質的に同時に投与することを包括することを意図する。実質的な同時投与は、例えば、対象に、各治療剤の一定比を有する単一のカプセル剤を投与するか、または各治療剤についての単一のカプセル剤を複数投与することによって達成することができる。

10

【0194】

各治療剤の順次投与または実質的な同時投与は、これらに限定されないが、外用経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路および粘膜組織を通しての直接的な吸収を含めた、いずれかの適切な経路によってもたらすことができる。治療剤は、同じ経路によって投与しても、または異なる経路によって投与してもよい。例えば、選択された組合せのうち第1の治療剤を注射により投与することができ、一方、組合せの他方の治療剤を外用として投与することができる。

20

【0195】

あるいは、例えば、全ての治療剤を外用として投与してもよく、または全ての治療剤を注射によって投与してもよい。治療剤を投与する順番には、別段の記載がない限り、あまり重大な意味はない。また、「併用療法」は、上記に記載した治療剤をその他の生物学的に活性な成分とさらに組み合わせた投与も包括することができる。併用療法が非薬物治療をさらに含む場合、治療剤と非薬物治療の組合せの同時作用から有益な効果が達成される限り、非薬物治療をいずれかの適切な時期において実施することができる。例えば、適切な場合には、非薬物治療が治療剤の投与から一時的に、おそらく数日または数週もの間外された場合でも有益な効果が依然として達成される。

30

【0196】

上記で大まかに概説したように、本発明による医薬品は原則として、当業者に知られているいずれかの形態で投与することができる。好ましい投与経路は、全身投与であり、より好ましくは非経口投与、好ましくは注射によるものである。あるいは、医薬品は、局所投与することもできる。その他の投与経路には、筋肉内、腹腔内および皮下、経口（per orum）、鼻腔内、気管内または肺からの経路があり、効率を保證する一方で侵襲性が最も低い投与経路が選好される。

【0197】

非経口投与は一般に、皮下、筋肉内または静脈内への注射および注入のために使用される。さらに、非経口投与のための1つのアプローチは、徐放性または持続放出性のシステムの埋込みを利用し、このシステムによって、一定レベルの投与量の維持が保證され、これは、当業者にはよく知られている。

40

【0198】

さらに、本発明の好ましい医薬品は、適切な鼻腔内ビヒクルを外用として使用することを介する鼻腔内への形態で、すなわち、吸入剤としてか、または経皮経路を介して当業者にはよく知られている経皮皮膚パッチの形態を使用して投与することができる。経皮送達システムの形態として投与するためには、もちろん、投与量は、投与計画全体を通して間欠的ではなくむしろ連続的に投与される。その他の好ましい外用調製物には、クリーム剤

50

、軟膏剤、ローション剤、エアロゾルスプレー剤およびジェル剤があり、活性成分の濃度は典型的には、0.01%～15%、w/wまたはw/vの範囲である。

【0199】

本発明の医薬品は一般に、これらに限定されないが、薬学的に許容できる媒体中に溶解または分散する本発明の核酸分子を含めて、療法の（1つまたは複数の）活性な構成成分の有効量を含む。薬学的に許容できる媒体または担体には、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、被覆、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤は、当技術分野ではよく知られている。また、補助的な活性成分も、本発明の医薬品中に組み込むことができる。

【0200】

さらなる態様では、本発明は、医薬組成物に関する。そのような医薬組成物は、本発明による核酸のうちの少なくとも1つ、および好ましくは薬学的に許容できるビヒクルを含む。そのようなビヒクルは、当技術分野で使用されているおよび/または知られている任意のビヒクルまたは任意の結合剤であってよい。より具体的には、そのような結合剤またはビヒクルは、本明細書に開示する医薬品の製造に関連して論じる任意の結合剤またはビヒクルであってよい。さらなる実施形態では、医薬組成物は、さらなる薬学的に活性な薬剤を含む。

【0201】

医薬品および医薬組成物の調製は、当業者には本開示に照らせば分かる。典型的には、そのような組成物を、液剤もしくは懸濁剤のいずれかとしての注射用として；注射前に液体となす液剤もしくは懸濁剤の中において適した固体の形態；経口投与のための錠剤もしくはその他の固体；時間放出性のカプセル剤；または点眼剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、吸入剤等を含めた、現在使用されている任意のその他の形態として調製することができる。また、手術分野においては、外科医、内科医または医療従事者による、食塩水に基づいた洗浄液等の無菌製剤の特定の領域を治療するための使用が特に有用な場合もある。また、組成物を、微小デバイス、微小粒子またはスポンジを介して送達することもできる。

【0202】

製剤化したら、医薬品を、投与製剤に適合した様式で、薬理的に有効である量で投与する。製剤は、例として、上記の注射用液剤の型等の多様な投与剤型に容易に投与されるが、また、薬物放出カプセル剤等も利用することができる。

【0203】

こうした状況では、投与すべき活性成分の分量および組成物の体積は、治療しようとする個体または対象に依存する。投与に必要な活性化化合物の特異的な量は、開業医の判断によって決まり、各個体に特有である。

【0204】

活性化化合物を分散させるために必要な医薬品の最少体積を、典型的には活用する。また、適切な投与計画は可変であるが、典型的には、最初に化合物を投与し、結果をモニターし、次いで、さらに間を置いて制御した用量をさらに与える。

【0205】

例えば、錠剤またはカプセル剤（例えば、ゼラチンカプセル剤）の形態で経口投与する場合、活性な薬物構成成分、すなわち、本発明の核酸分子および/あるいは本明細書では（1つもしくは複数の）治療剤または（1つもしくは複数の）活性化化合物とも呼ぶ任意のさらなる薬学的に活性な薬剤を、経口で無毒性の薬学的に許容できる不活性な担体、例として、エタノール、グリセロール、水等と組み合わせることができる。またさらに、所望するかまたは必要とする場合には、適切な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤も混合物中に組み込むことができる。適切な結合剤には、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/またはポリビニルピロリドン、グルコースまたはベータ-ラクトース等の天然の糖、トウモロコシ甘味剤、アカシア、トラガントまたはアルギン酸ナトリウム等

10

20

30

40

50

の天然および合成のガム、ポリエチレングリコール、ろう等がある。これらの投与剤型中で使用される滑沢剤には、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、そのマグネシウムもしくはカルシウムの塩および/またはポリエチレングリコール等がある。崩壊剤には、これらに限定されないが、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、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または発泡性混合物等がある。希釈剤には、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび/またはグリシンがある。

#### 【0206】

また、本発明の医薬品は、時限的な放出および持続性放出の錠剤、またはカプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁剤、シロップ剤および乳剤等の経口投与剤型で投与することもできる。坐剤は、脂肪酸の乳剤または懸濁剤から好都合に調製される。

#### 【0207】

医薬組成物または医薬品は、滅菌することができ、かつ/あるいは保存剤、安定化剤、湿潤剤もしくは乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を調節するための塩および/または緩衝剤等のアジュバントを含有することができる。またさらに、それらは、その他の治療上価値のある物質も含有することができる。組成物は、従来の混合、顆粒化または被覆の方法に従って調製され、典型的には、活性成分を約0.1%~75%、好ましくは約1%~50%含有する。

#### 【0208】

液体、特に注射用組成物は、例えば、溶解させる、分散させる等によって調製することができる。活性化化合物を、薬学的に純粋な溶媒、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノール等中に溶解させるかまたはそれらと混合して、それによって、注射用の液剤または懸濁剤を形成する。さらに、注射前に液体中に溶解させるために適した固体の形態としても製剤化することができる。

#### 【0209】

固体の組成物のための賦形剤には、薬学的グレードのマンニトール、ラクトース、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、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等がある。また、上記で定義した活性化化合物は、坐剤として、例えば、担体として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製剤化することもできる。いくつかの実施形態では、坐剤は、脂肪酸の乳剤または懸濁剤から好都合に調製される。

#### 【0210】

また、本発明の医薬品および核酸分子はそれぞれ、リボソーム送達システムの形態、例として、小型の単層状ベシクル、大型の単層状ベシクルおよび多層状ベシクルで投与することもできる。リボソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンを含有する多様なリン脂質から形成することができる。いくつかの実施形態では、脂質の構成成分のフィルムを薬物の水溶液を用いて水和させて、薬物を被包する脂質層を形成する。これは、当業者にはよく知られている。例えば、本明細書に記載する核酸分子を、当技術分野で知られている方法を使用して構築した、親油性化合物または非免疫原性の高分子量化合物との複合体として提供することができる。さらに、リボソームは、表面上には、そのような核酸分子を担って標的化を行い、内部には、細胞の死滅を媒介するための細胞傷害性を示す薬剤を担持することもできる。核酸関連複合体の例が、米国特許第6,011,020号に提供されている。

#### 【0211】

また、本発明の医薬品および核酸分子はそれぞれ、標的化を行うことができる薬物担体としての可溶性ポリマーと結合させることもできる。そのようなポリマーとして、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-メチルアクリルアミド-

10

20

30

40

50

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 (polyhydroxyethylaspanamidephenol)、またはパルミトイル残基で置換されているポリエチレンオキシドポリリジンを挙げることができる。さらに、本発明の医薬品および核酸分子はそれぞれ、薬物の制御放出を達成する場合に有用なクラスが生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびヒドロゲルの架橋結合性または両親媒性のブロックコポリマーに結合させることもできる。

【0212】

また所望により、投与すべき医薬組成物および医薬品はそれぞれ、微量の無毒性の補足的な物質、例として湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、ならびにその他の物質、例えば、酢酸ナトリウムおよびオレイン酸トリエタノールアミン等を含むこともできる。

10

【0213】

本発明の核酸分子および医薬品それぞれを活用する投与計画は、患者の型、種、年齢、体重、性別および医学的状態；治療しようとする状態の重症度；投与経路；患者の腎臓および肝臓の機能；ならびに利用する特定の Aptamer またはその塩を含めた、多様な要因に従って選択される。通常の技術を有する内科医または獣医であれば、状態の進行を予防する、無効にするまたは静止させるために必要な薬物の有効量を容易に決定し、処方することができる。

【0214】

本発明による核酸の有効な血漿レベルは、好ましくは、本明細書に開示する疾患のうちのいずれかの治療の場合には、500 fM ~ 500 μM の範囲である。

20

【0215】

本発明の核酸分子および医薬品はそれぞれ、好ましくは、1日1回の用量で、2日もしくは3日に1回、毎週、2週に1回、月1回の用量で、または3ヵ月に1回投与することができる。

【0216】

本明細書に記載する医薬品が本明細書に開示する医薬組成物を構成することは本発明の範囲に含まれる。

【0217】

さらなる態様では、本発明は、そのような治療を必要とする対象を治療するための方法に関し、この方法は、本発明による核酸のうちの少なくとも1つを薬学的に活性な量で投与するステップを含む。ある実施形態では、対象は、ある疾患に罹患しているかまたはそのような疾患を発症するリスクを有し、疾患は、本明細書に開示する疾患のいずれかであり、特に、医薬品を製造するための本発明による核酸のうちのいずれかの使用に関連して開示する疾患のうちのいずれかである。

30

【0218】

本発明による核酸およびアンタゴニストは、医薬品として、もしくは医薬品を製造するためのみならず、また、美容上の目的でも、特に皮膚病変の炎症領域における C5a の関与に関して使用することができることを理解されたい。したがって、治療または予防のために本発明による核酸、医薬品および/または医薬組成物を使用することができる、さらなる状態または疾患は、皮膚病変の炎症領域である。

40

【0219】

好ましくは、本明細書で使用する場合、診断器具または診断薬または診断手段は、C5a、好ましくは本明細書に記載する C5a、およびより好ましくは本明細書に記載する種々の障害および疾患に関連して本明細書に記載する C5a を直接的にかまたは間接的にのいずれかで検出するために適している。診断器具は、本明細書に記載する障害および疾患それぞれのうちのいずれかを検出および/または追跡するために適している。そのような検出は、本発明による核酸の C5a への結合を通して可能である。そのような結合は、直接的にかまたは間接的にのいずれかで検出することができる。それぞれの方法および手段が当業者には知られている。とりわけ、本発明による核酸は、本発明による核酸、好まし

50

くはC5aに結合した核酸の検出を可能にする標識を含むことができる。そのような標識は、好ましくは、放射性標識、酵素標識および蛍光標識を含む群から選択される。原則として、本発明による核酸について、抗体について開発されている全ての既知のアッセイを採用することができ、標的結合性抗体が、標的結合性核酸に置換される。未標識の標的結合性抗体を使用する抗体アッセイの場合、検出は、好ましくは、放射性標識、酵素標識および蛍光標識を用いて改変され、標的結合性抗体にそのFc断片において結合する第2の抗体によって行われる。核酸、好ましくは本発明による核酸の場合、核酸をそのような標識を用いて改変し、好ましくは、そのような標識は、ビオチン、Cy-3およびCy-5を含む群から選択され、そのような標識は、そのような標識に対して作られた抗体、例えば、抗ビオチン抗体、抗Cy-3抗体もしくは抗Cy-5抗体によって検出されるか、または標識がビオチンである場合には、標識は、ビオチンに自然に結合するストレプトアビジンもしくはアビジンによって検出される。この場合、そのような抗体、ストレプトアビジンまたはアビジンは、好ましくは、(第2の抗体と同様に)それぞれの標識、例えば、放射性標識、酵素標識または蛍光標識を用いて改変されている。

10

20

30

40

50

#### 【0220】

さらなる実施形態では、本発明による核酸分子を、第2の検出手段によって検出または解析し、前記検出手段は、分子ビーコンである。分子ビーコンの方法は、当業者には知られている。手短にいうと、分子ビーコンとも呼ばれている核酸プローブが、検出しようとする核酸試料に対する逆向き相補体であり、このために、検出しようとする核酸試料の一部にハイブリダイズする。核酸試料に結合すると、分子ビーコンのフルオロフォア基が分離し、その結果、蛍光シグナルの変化、好ましくは強度の変化が生じる。この変化は、存在する核酸試料の量と相関する。

#### 【0221】

本発明による核酸を使用するC5aの検出によって、特に、本明細書で定義するC5aの検出が可能となることを認識するであろう。

#### 【0222】

C5aの検出に関連して、好ましい方法は、  
(a) C5aの存在について試験しようとする試料を提供するステップと、  
(b) 本発明による核酸を提供するステップと、  
(c) 試料を核酸と、好ましくは反応槽中で反応させるステップと  
を含み、  
ステップ(a)をステップ(b)の前に実施してもよく、または(b)をステップ(a)の前に実施してもよい。

#### 【0223】

好ましい実施形態では、試料の核酸との反応を検出することからなる、さらなるステップd)を提供する。好ましくは、ステップb)の核酸は、表面に固定化されている。表面は、反応チューブ、プレートのウエル等の反応槽の表面であっても、またはそのような反応槽中に含有されている装置、例えば、ビーズ等の表面であってもよい。核酸を表面に、これらに限定されないが、非共有結合性または共有結合性の連結を含めた、当業者に既知の任意の手段によって固定化することができる。好ましくは、連結は、表面と核酸との間の共有結合性の化学結合を介して確立される。しかしまた、核酸が表面に間接的に固定化され、そのような間接的な固定化には、さらなる構成成分または一对の相互作用のパートナーの使用が関与することも本発明の範囲に含まれる。そのようなさらなる構成成分は、好ましくは、固定化しようとする核酸と特異的に相互作用し、したがって、核酸が表面へつながることを媒介する、相互作用のパートナーとも呼ばれる化合物である。相互作用のパートナーは、好ましくは、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される。好ましくは、相互作用のパートナーは、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、相互作用のパートナーは、核酸、好ましくは機能性の核酸である。より好ましくは、そのような機能性の核酸は、アプタマー、スピーゲルマー、および当該核酸に対して少なくとも部分的に相補性を示す核酸を含む群から選択される。さらなる

代替の実施形態では、核酸の表面への結合は、多分割の相互作用のパートナーによって媒介される。そのような多分割の相互作用のパートナーは、好ましくは、一对の相互作用のパートナー、または第1のメンバーと第2のメンバーとからなる相互作用のパートナーであり、第1のメンバーは、核酸によって構成されているかまたは核酸につながっており、第2のメンバーは、表面につながっているかまたは表面によって構成されている。多分割の相互作用のパートナーは、好ましくは、ビオチンとアビジン、ビオチンとストレプトアビジン、およびビオチンとニュートラアビジンを含む相互作用のパートナーの対の群から選択される。好ましくは、相互作用のパートナーの対の第1のメンバーは、ビオチンである。

【0224】

そのような方法の好ましい結果が、C5aと核酸との固定化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。複合体から、C5aが検出されることは、ある実施形態の範囲に含まれる。

【0225】

この要件に従うそれぞれの検出手段は、例えば、C5aの(1つまたは複数の)部分に対して特異的である検出手段のいずれかである。特に好ましい検出手段は、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される検出手段であり、これらの生成は当業者であれば知っている。

【0226】

また、C5aを検出する方法は、好ましくはステップc)を実施するために使用された反応槽から、試料を取り出すステップも含む。

【0227】

また、さらなる実施形態では、この方法は、C5aの相互作用のパートナーを表面、好ましくは上記で定義した表面上に固定化するステップも含み、相互作用のパートナーは、本明細書に従って定義され、好ましくは、それぞれの方法に関連して上記に従い、より好ましくは、種々の実施形態における核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む。この実施形態では、特に好ましい検出手段は、本発明による核酸であり、そのような核酸は、好ましくは、標識してもまたは標識しなくてもよい。そのような核酸が標識されている場合、核酸は直接的または間接的に検出することができる。また、そのような検出には、第2の検出手段の使用が関与してよく、第2の検出手段もまた、好ましくは、本明細書に記載する種々の実施形態における核酸、ポリペプチド、タンパク質および実施形態を含む群から選択される。そのような検出手段は、好ましくは、本発明による核酸に対して特異的である。より好ましい実施形態では、第2の検出手段は、分子ビーコンである。好ましい実施形態では、核酸もしくは第2の検出手段のいずれか、または両方が、検出標識を含むことができる。検出標識は、好ましくは、ビオチン、プロモ-デ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分子を含む群から選択される。あるいは、第2の検出手段が、好ましくは、核酸によって含有されている、核酸によって構成されている、または核酸につながっている検出標識と相互作用する。特に好ましいのは、以下の組合せである。

検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がビオチンに対して作られた抗体であるか、または

検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がアビジンもしくはアビジン担持分子であるか、または

検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がストレプトアビジンもしくはストレプトアビジン担持分子であるか、または

検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がニュートラアビジンもしくはニュートラアビジン担持分子であるか、または

検出標識がプロモ-デオキシウリジンであり、第2の検出手段がプロモ-デオキシウリジンに対して作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、第2の検出手段がジゴキシゲニンに対して作られた抗

10

20

30

40

50

体であるか、または

検出標識がキレート剤であり、第2の検出手段が放射性核種であり、前記検出標識が核酸につながっていることが好ましい。また、この種類の組合せは、核酸が表面につながっている実施形態にも適用可能であることを認識されたい。そのような実施形態では、検出標識が相互作用のパートナーにつながっていることが好ましい。

【0228】

最後にまた、第2の検出手段が第3の検出手段を使用して検出され、好ましくは、第3の検出手段は、酵素であり、より好ましくは、第2の検出手段の検出時には酵素反応を示すか、または第3の検出手段は、放射線、より好ましくは、放射性核種から放射された放射線を検出するための手段であることも本発明の範囲に含まれる。好ましくは、第3の検出手段は、第2の検出手段を特異的に検出する、かつ/または第2の検出手段と相互作用する。

10

【0229】

また、C5aの相互作用のパートナーが表面上に固定化されている実施形態においては、本発明による核酸を、好ましくは、相互作用のパートナーとC5aとの間に形成された複合体に添加し、試料を、反応から、より好ましくは、ステップc)および/またはd)が実施される反応槽から取り出すことができる。

【0230】

ある実施形態では、本発明による核酸は、蛍光部分を含み、蛍光部分の蛍光が、核酸とC5aとの間での複合体形成時には、遊離のC5aとは異なる。

20

【0231】

さらなる実施形態では、核酸が本発明による核酸の誘導体であり、核酸の誘導体は、アデノシンに置き換わっている少なくとも1つのアデノシン蛍光誘導体を含む。好ましい実施形態では、アデノシン蛍光誘導体は、エテノアデノシンである。

【0232】

さらなる実施形態では、本発明による核酸の誘導体およびC5aからなる複合体を、蛍光を使用して検出する。

【0233】

方法のある実施形態では、シグナルが、ステップ(c)またはステップ(d)において生み出され、好ましくは、シグナルは、試料中のC5a濃度と相関する。

30

【0234】

好ましい態様では、アッセイを、96ウエルプレート中で実施することができ、構成成分が、上記に記載するように、反応槽中に固定化されており、ウエルが反応槽として働く。

【0235】

本発明の核酸は、薬物設計のための出発材料としてもさらに使用することができる。基本的には、2つの可能なアプローチがある。1つのアプローチは、化合物ライブラリーのスクリーニングであり、そのような化合物ライブラリーは、好ましくは低分子量化合物ライブラリーである。ある実施形態では、スクリーニングは、高スループットスクリーニングである。好ましくは、高スループットスクリーニングは、標的に基づいたアッセイにおいての、化合物の迅速、効率的な試行錯誤評価である。最良の場合には、解析を比色分析測定によって実施する。それに関連して使用するライブラリーが当業者には知られている。

40

【0236】

あるいは、本発明による核酸は、理論的薬物設計ために使用することができる。好ましくは、理論的薬物設計は、薬学的なリード構造の設計である。典型的にはX線結晶解析または核磁気共鳴分光法等の方法によって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をくまなく検索する。選択はコンピュータによって行われ、それに続いて、同定された化合物を実験室で試験することができる。

50

## 【0237】

理論的薬物設計は、本発明による核酸のうちのいずれかから出発することができ、本発明の核酸の構造に類似するか、または本発明の核酸の構造の結合媒介部分に同一である構造、好ましくは、三次元構造に関する。いずれの場合も、そのような構造は、本発明の核酸と同じかまたはそれに類似する結合の特徴を依然として示す。理論的薬物設計において、さらなるステップにおいてかまたは代替のステップとしてのいずれかでは、好ましくは、神経伝達物質に結合する核酸の部分の三次元構造が、ヌクレオチドとも核酸とも異なる化学基によって模倣される。この模倣によって、核酸とは異なる化合物を設計することができる。そのような化合物は、好ましくは、小型分子またはペプチドである。

## 【0238】

化合物ライブラリーをスクリーニングする場合、当業者に知られている競合アッセイを使用すること等によって、適切なC5a類似体、C5aアゴニストまたはC5aアンタゴニストを見出すことができる。そのような競合アッセイは、以下のように組み立てることができる。本発明の核酸、好ましくは、標的結合性L-核酸であるスピーゲルマーを、固相に結合させる。C5a類似体を同定するために、標識したC5aをアッセイに添加することができる。見込みのある類似体であれば、スピーゲルマーに結合するC5a分子と競合し、これには、それぞれの標識によって得られるシグナルの減少が伴う。アゴニストまたはアンタゴニストについてのスクリーニングには、当業者には知られている細胞培養アッセイの使用が関与することができる。

## 【0239】

本発明によるキットは、本発明の核酸のうちの少なくとも1つまたはいくつかを含むことができる。さらに、キットは、少なくとも1つまたはいくつかの陽性または陰性の対照を含むこともできる。陽性対照は、例えば、C5a、特に、それに対して本発明の核酸が選択されるか、またはそれに本発明の核酸が結合する、好ましくは、液体の形態をとるC5aであってよい。陰性対照は、例えば、生物物理学的特性の観点からC5aに類似すると定義されるが、本発明の核酸としては認められないペプチドであってよい。さらに、前記キットは、1つまたはいくつかの緩衝剤も含むことができる。キット中には、種々の成分を、乾燥もしくは凍結乾燥させた形態でか、または液体中に溶解させて含有することができる。キットは、1つまたはいくつかの容器を含むことができ、これは、この場合、キットの1つまたはいくつかの成分を含有することができる。さらなる実施形態では、キットは、キットの使用法およびその種々の成分についての情報を使用者に提供する指示または指示書を含む。

## 【0240】

本発明による核酸の薬学的決定および生物分析決定は、基本的に、ヒトおよび非ヒトの身体の一部のいくつかの体液、組織および臓器において、その薬物動態および生物力学のプロファイルを判定するためである。そのような目的では、本明細書に開示するかまたは当業者に知られている検出方法のうちのいずれかを使用することができる。本発明のさらなる態様では、本発明による核酸を検出するために、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイを提供する。検出アッセイ内部では、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、本発明による核酸の第1の部分に対して相補性を示し、検出プローブは、第2の部分に対して相補性を示す。捕捉プローブおよび検出プローブの両方を、DNAヌクレオチド、改変したDNAヌクレオチド、改変したRNAヌクレオチド、RNAヌクレオチド、LNAヌクレオチドおよび/またはPNAヌクレオチドによって形成することができる。

## 【0241】

したがって、捕捉プローブは、本発明による核酸の5'末端に対して相補性を示す配列ストレッチを含み、検出プローブは、本発明による核酸の3'末端に対して相補性を示す配列ストレッチを含む。この場合、捕捉プローブは、表面またはマトリックスに5'末端を介して固定化されており、捕捉プローブは、その5'末端において直接的にか、またはその5'末端と表面もしくはマトリックスとの間のリンカーを介して固定化することがで

10

20

30

40

50

きる。しかし原則として、リンカーは、捕捉プローブの各ヌクレオチドに連結することができる。リンカーは、当業者の親水性リンカーによってか、またはD-DNAヌクレオチド、変化したD-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、変化した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、変化したL-RNAヌクレオチド、変化したL-DNAヌクレオチドおよび/もしくはL-LNAヌクレオチドによって形成することができる。

【0242】

あるいは、捕捉プローブは、本発明による核酸の3'末端に対して相補性を示す配列ストレッチを含み、検出プローブは、本発明による核酸の5'末端に対して相補性を示す配列ストレッチを含む。この場合、捕捉プローブは、表面またはマトリックスに3'末端を介して固定化されており、捕捉プローブは、その3'末端において直接的にか、またはその3'末端と表面もしくはマトリックスとの間のリンカーを介して固定化することができる。しかし原則として、リンカーは、本発明による核酸に対して相補性を示す配列ストレッチの各ヌクレオチドに連結することができる。リンカーは、当業者の親水性リンカーによってか、またはD-DNAヌクレオチド、変化したD-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、変化した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、変化したL-RNAヌクレオチド、変化したL-DNAヌクレオチドおよび/もしくはL-LNAヌクレオチドによって形成することができる。

10

【0243】

本発明による核酸にハイブリダイズすることができる捕捉プローブおよび検出プローブのヌクレオチドの数は可変であり、捕捉プローブおよび/もしくは検出プローブのヌクレオチドの数、ならびに/または本発明による核酸自体に依存してよい。本発明による核酸にハイブリダイズすることができる捕捉プローブと検出プローブとのヌクレオチドの総数は、最高でも本発明による核酸によって構成されるヌクレオチドの数でなければならない。検出プローブおよび捕捉プローブのヌクレオチドの最低数(2~10個のヌクレオチド)によっても、本発明による核酸の5'末端または3'末端それぞれにハイブリダイゼーションが可能とならなければならない。本発明による核酸と解析する試料中に存在するその他の核酸との間で、高い特異性および選択性を実現するためには、捕捉プローブと検出プローブとのヌクレオチドの総数は、本発明による核酸によって構成されるヌクレオチドの数、または最高数でなければならない。

20

30

【0244】

さらに、検出プローブは、好ましくは、先の本明細書の記載に従って検出することができるマーカ分子または標識を担持する。標識また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することができる。好ましくは、標識またはマーカ分子は、検出プローブの5'末端または3'末端に位置し、本発明による核酸に対して相補性を示す検出プローブ内のヌクレオチドと標識の間には、リンカーを挿入することができる。リンカーは、当業者の親水性リンカーによってか、またはD-DNAヌクレオチド、変化したD-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、変化した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、変化したL-RNAヌクレオチド、変化したL-DNAヌクレオチドおよび/もしくはL-LNAヌクレオチドによって形成することができる。

40

【0245】

本発明による核酸の検出を、以下に従って実施することができる。本発明による核酸を、その一方の末端で捕捉プローブに、他方の末端で検出プローブにハイブリダイズさせる。その後、未結合の検出プローブを、例えば、1または複数回の洗浄ステップによって除去する。それに続いて、好ましくは標識またはマーカ分子を担持する結合された検出プローブの量を、例えば、参照より本明細書に組み込まれているWO/2008/052774のより詳細な概説に従って測定することができる。

【0246】

50

好ましくは、本明細書で使用する場合、治療という用語は、好ましい実施形態では、追加または代替の予防および/または追跡を含む。

【0247】

好ましくは、本明細書で使用する場合、疾患および障害という用語は、別段の記載がない限り、互換的に使用するものとする。

【0248】

本明細書で使用する場合、含む ( c o m p r i s e ) という用語は、好ましくは、そのような用語に続くかまたはそれが説明する主題を制限しないものとする。しかし、代替の実施形態では、この用語は、含有すること ( c o n t a i n i n g ) を意味し、したがって、そのような用語に続くかまたはそれが説明する主題を制限するものと理解されたい。

【0249】

本発明による核酸分子および本明細書で使用する標的分子である C 5 a の種々の配列番号、化学的性質、それらの実際の配列、および内部参照番号を、以下の表に要約する。

【表 1 A】

表 1

配列番号	内部参照		配列
1	274-B5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAAAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
2	274-D5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
3	274-C8-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
4	274-C8-002-G14 (=NOX-D19001)	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
5	274-C5-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGGUGAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
6	274-G6-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGGUGAGGGGAUGUGGGGUGUCGACGCACAGGC
7	274-H6-002	L-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAGGGGUCUGGGGUGUCGACGCACAGGC
8	NOX-D19001-D09	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUAAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
9	NOX-D19001-D16	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGG <u>dg</u> AAAGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
10	NOX-D19001-D17	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGG <u>da</u> AGGGUUUGGGGUGUCGACGCACAGGC
11	NOX-D19001-D30	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUGGG <u>du</u> GUCGACGCACAGGC
12	NOX-D19001-D32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUGGG <u>du</u> CGACGCACAGGC
13	NOX-D19001-D40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUGGGUUGUCGACGCACAGGC <u>dc</u>
14	NOX-D19001-D09-30	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUAAGGGUUUGGG <u>du</u> GUCGACGCACAGGC
15	NOX-D19001-D09-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUAAGGGUUUGGG <u>du</u> CGACGCACAGGC

10

20

30

40

【表 1 B】

配列番号	内部参照		配列
16	NOX-D19001-D09-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGGUUCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
17	NOX-D19001-D30-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCACAGGC
18	NOX-D19001-D30-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
19	NOX-D19001-D32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
20	NOX-D19001-D09-30-32	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCACAGGC
21	NOX-D19001-D09-30-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
22	NOX-D19001-D09-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
23	NOX-D19001-D30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
24	NOX-D19001-D09-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
25	NOX-D19001-D09-16-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
26	NOX-D19001-D09-17-30-32-40	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>
27	NOX-D19001-D09-16-17-30-32-40 (= NOX-D19001-6xDNA)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	GCCUGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CCAGGC</u>

10

20

30

40

配列番号	内部参照	L-RNA/L-DNA	配列
28	NOX-D19001-6xDNA-007	L-RNA/L-DNA	CCUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CCGACGCAd <u>CA</u> GGC
29	NOX-D19001-6xDNA-008	L-RNA/L-DNA	CUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC
30	NOX-D19001-6xDNA-009	L-RNA/L-DNA	UGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC
31	NOX-D19001-6xDNA-010	L-RNA/L-DNA	GAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC
32	NOX-D19001-6xDNA-011	L-RNA/L-DNA	GCUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC
33	NOX-D19001-6xDNA-012	L-RNA/L-DNA	GUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> C
34	NOX-D19001-6xDNA-013	L-RNA/L-DNA	UGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u>
35	NOX-D19001-6xDNA-018	L-RNA/L-DNA	GCCGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> CGGC
36	NOX-D19001-6xDNA-019	L-RNA/L-DNA	GGCGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> CGGC
37	NOX-D19001-6xDNA-020 (=NOX-D20001)	L-RNA/L-DNA	GCGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> CGGC
38	NOX-D19001-6xDNA-021	L-RNA/L-DNA	CUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC
39	NOX-D19001-6xDNA-022	L-RNA/L-DNA	UGAUG <u>du</u> GGUGG <u>u</u> <u>gda</u> AAGGUUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCAd <u>CA</u> GGC

10

20

30

40

【表 1 D】

配列番号	内部参照		配列
40	NOX-D19001-6xDNA-023	L-RNA/L-DNA	CGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CAGC
41	NOX-D19001-6xDNA-024	L-RNA/L-DNA	GAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CAGC
42	NOX-D19001-6xDNA-025	L-RNA/L-DNA	GCUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CAC
43	NOX-D19001-6xDNA-026	L-RNA/L-DNA	GCUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CC
44	NOX-D19001-6xDNA-027	L-RNA/L-DNA	GCUGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CA
45	NOX-D19001-6xDNA-028	L-RNA/L-DNA	CGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CGC
46	NOX-D19001-6xDNA-029	L-RNA/L-DNA	GAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CGC
47	NOX-D19001-6xDNA-030	L-RNA/L-DNA	GCGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CC
48	NOX-D19001-6xDNA-032	L-RNA/L-DNA	GCGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> C
49	NOX-D19001-6xDNA-033	L-RNA/L-DNA	GGAUG <u>du</u> GGUGG <u>gda</u> AGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CC
50	ヒト C5a	L-タンパク質	TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGCVNNDETCEQRAARISLGPRIKAF TECCVVASQLRANISHKDMQLGR
51	ラット C5a	L-タンパク質	DLQLLHQKVEEQAAKYKHRVPPKCCYDGAARENKYETCEQRVARVTIGPHCI RAFNECCTIADKIRKESHKGMLLGR
52	マウス C5a	L-タンパク質	NLHLLRQKIEEQAAKYKHSVPPKCCYDGCARVNFYETCEERVARVTIGPLCI RAFNECCTIANKIRKESPHKPVQLGR

10

20

30

40

【表 1 E】

配列番号	内部参照		配列
53	ヒト C5、アルファ鎖	L-タンパク質	TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGCACVNNDETCEQRAARISLGPCCIKAF TECCVVASQLRANISHKDMQLGRLHMKTLIPVSKPEIRSYFPESWLWEVHL VPRRKQLQFALPDSLTTWEIQIGISNTGICVADTVKAKVKDFLEMNIP YSVVRGEIQIKGTVVNYRTSGMQFCVKMSAVEGICTSESPVIDHQGTKSS KCVRQKVEGSSHLVFTVLPLEIGLHNINFSLETFWFGKEILLVKTLLRVPE GVKRESYSGVTLDPRGIYGTISRRKKEFFYRIPLDLVPKTEIKRILSVKGLL VGEIILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAEALMSVVPVYVFHYLETGNHWNIF HSDPLIEKQKLKKLKEGMLSIMSYRNADYSYVWKGGSASTWLTAFALRV LGQVKNYVEQNQNSICNSLLWLVENYQLDNGSFKENSQYQPIKLQGTLPVE ARENSLYLTAFTVIGIRKAFDICPLVKIDTALIKADNFLENTLPAQSTFT LAISAYALSLGDKTHPQFRISVSALKREALVGNPPIYRFWKDNLQHKDSS VPNTGTARMVETTAYALLTSLNLKDINYVNPVIKWLSEEQRYGGGFYSTQD TINAI EGLTEYSLLVKQLRLSMDIDVSYKHKGALHNYKMTDKNFLGRPVEV LLNDDLIVSTGFGSGLATVHVTTVVHKTSTSEEVCSFYLKIDTQDIEASHY RGYGNSDYKRIIVACASYKPSREESSGSSHAVMDISLPTGISANEEDLKAL VEGVDQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSSDFLCVRFRIIFELFEVGFLLSPATF TVYEHHRPDKQCTMFYSTSNIKIQKVCGEAAKCKVEADCGQMQEELDLTIS AETRKTACKPEIAYAYKVSITSTVENVFKYKATLLDIYKTGEAVAEKD SEITFIKKVTCITNAELVKGRQYLIMGKEALQIKYNFSFRYIYPLDSLTIWIE YWPRDITCSCCQAFLANLDEFAEDIFLNGC MLQEKIEEIAAKYKHLVVKCCYDGVRIINHDETCEQRAARISVGPCCVKAF TECCVVASQLRANNSHKDLQLGR GCGAUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUGCGCACCGC GCGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUGCGACCGCACCGC GCGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> UUGCGACCGCACCGC
54	アカゲザル C5a		
55	NOX-D19001-020		
56	NOX-D19001-1xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	
57	NOX-D19001-2xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	

10

20

30

40

【表 1 F】

配列番号	内部参照		配列
58	NOX-D19001-3xDNA-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CGGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCACGC
59	NOX-D19001-2dU-1dC-020 (=NOX-D21001)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CGGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCACGC
60	NOX-D19001-3dU-1dC-020	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CGGAUG <u>du</u> GGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCAC <u>dc</u> GC
61		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGKUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> RGGGHUGUKGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGC n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
62		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGC n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
63		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGGUUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGC n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
64		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUUGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGC n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
65		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGGUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> AGGGUUGUUGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGC n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である

10

20

30

40

【表 1 G】

配列番号	内部参照		配列
66		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGGUUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
67		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGAUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
68		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGn <sub>1</sub> GGUGUn <sub>2</sub> n <sub>3</sub> GGGGCUGUGGGGn <sub>4</sub> Gn <sub>5</sub> CGACGCA n <sub>1</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>2</sub> は、Gまたは <u>dg</u> であり、n <sub>3</sub> は、Aまたは <u>da</u> であり、n <sub>4</sub> は、Uまたは <u>du</u> であり、n <sub>5</sub> は、Uまたは <u>du</u> である
69		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGKUGARGGGHUGKGGGUGCGACGCA
70		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
71		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
72		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUGAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
73		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>du</u> GGUGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
74		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGGU <u>dg</u> AAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
75		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGGU <u>da</u> AAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA
76		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCA
77		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
78		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>du</u> GGUGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCA
79		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>du</u> GGUGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
80		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUGUGUGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> UCGACGCA

【表 1 H】

配列番号	内部参照		配列
81		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
82		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
83		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
84		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	AUG <u>d</u> UGGUGGUGAAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA
85	274-H6-002	D-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAGGGGUGUGGGGUGUCGACGACAGGC
86	274-D5-002	D-RNA	GCCUGAUGUGGUGUUGAGGGGUGUUGGGGUGUCGACGACAGGC
87	逆 NOX-D19	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- CGGACACGCAGCUGUGGGUUGUUGGGAAAGUGGUGUAGUCCG
88	逆 NOX-D21	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG-- CGdCACGCAGCUGdUGGGUUGUUGGGAAAGUGGdUGUAGCG
89	バイオニン化マウス-D-C5a	D-タンパク質	LLRQKIEEQAAKYKHSVPKKCCYDGARVNFYETCEERVARVTIGPLCIRAF NECCTIANKIRKESPHKPVQLGR- ビオチン
90	NOX-D19001-5'40kDa-PEG (= NOX-D19)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCCUGAUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGGUGUCGACGACAGGC
91	NOX-D19001-6xDNA-020-5'40kDa-PEG (= NOX-D20)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCGAUG <u>du</u> UGGUGGUG <u>gd</u> AAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CGC
92	NOX-D19001-2dU-1dC-020-5'40kDa-PEG (= NOX-D21)	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDaPEG- GCGAUG <u>du</u> UGGUGGUGAAGGGUUGUUGGG <u>du</u> CGACGCA <u>d</u> CGC

10

20

30

40

【表 1 I】

配列番号	内部参照		配列
93	ヒト des-ArgC5a	L-タンパク質	TLQKKIEEIIAAKYKHSVVKCCYDGCVNND <sup>1</sup> ETCEQRAARISLGP <sup>2</sup> RCIKAF TECCVVASQLRANISHKDMQLG
94	マウス des-ArgC5a	L-タンパク質	NLHLLRQKIEEQAAKYKHSV <sup>1</sup> PKKCCYD <sup>2</sup> GARVNFY <sup>3</sup> ETCEER <sup>4</sup> VARV <sup>5</sup> TIG <sup>6</sup> PL <sup>7</sup> CI RAFNECCTIANKIRKESPHKPVQLG

10

20

30

40

さらなる特徴、実施形態および利点を示すことができる図、実施例および配列表によって、本発明をさらに例示する。

【図面の簡単な説明】

【0251】

【図1】表面プラズモン共鳴測定により決定したヒトおよびマウスのC5aに対する $K_D$ 値および相対結合活性を含む、ヒトおよびマウスのC5aに結合することができる核酸分子の配列のアラインメントを示す図である。

【図2】表面プラズモン共鳴測定により決定したヒトC5aに対する $K_D$ 値および相対結合活性を含む、単一のリボヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチドに置換されている核酸分子NOX-D19001の誘導体を示す図である。

【図3】表面プラズモン共鳴測定により決定したヒトC5aに対する $K_D$ 値および相対結合活性を含む、2個、3個、4個、5個または6個のリボヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチドに置換されている核酸分子NOX-D19001の誘導体を示す図である。

【図4A-4B】表面プラズモン共鳴測定により決定したヒトC5aに対する $K_D$ 値および相対結合活性を含む、核酸分子NOX-D19001-6xDNAの切り詰めを示す図である。

【図5】表面プラズモン共鳴測定により決定したヒトC5aに対する $K_D$ 値および相対結合活性を含む、0、1個、2個、3個または4個のリボヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチドに置換されている核酸分子NOX-D20001の誘導体を示す図である。

【図6】核酸分子NOX-D19001、NOX-D19001-D09およびNOX-D19001-D09-16-17-30-32-40(NOX-D19001-6xDNAとも呼ばれる)のBiacore測定によるヒトC5aに対する動態評価を示す図であり、500nMのスピーゲルマーNOX-D19001、NOX-D19001-D09(略語:D09)およびNOX-D19001-D09-16-17-30-32-40(略語:D09-16-17-30-32-40)に関するデータを示す。

【図7】走化性アッセイにおける5'末端40kDa PEG化C5a結合性スピーゲルマーNOX-D19001-5'PEG(NOX-D19とも呼ばれる)NOX-D20(NOX-D19001-6xDNA-020-5'40kDa PEGとも呼ばれる)の効能を示す図であり、様々な量のスピーゲルマーと共に37°Cでブレインキュベートした0.1nMのhuc5aに向けて、細胞を遊走させた。

【図8】核酸分子NOX-D20(NOX-D19001-6xDNA-020-5'40kDa PEGとも呼ばれる)のBiacore測定によるヒトC5a、ラットC5a、マウスC5a、サルC5aに対する動態評価を示す図であり、1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9および1.95~0nMのスピーゲルマーNOX-D20に関するデータを示す。

【図9】核酸分子NOX-D20(NOX-D19001-6xDNA-020-5'40kDa PEGとも呼ばれる)のBiacore測定によるヒトC5およびヒトdesArg-C5aに対する動態評価を示す図であり、1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9および1.95~0nMのスピーゲルマーNOX-D20に関するデータを示す。

【図10】核酸分子NOX-D21(NOX-D19001-2dU-1dC-020-5'40kDa PEGとも呼ばれる)のBiacore測定によるヒトC5a、ヒトC5、ヒトdesArg-C5a、マウスC5aおよびマウスdesArg-C5aに対する動態評価を示す図であり、ヒトC5aおよびヒトC5に結合する、1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9および1.95~0nMのスピーゲルマーNOX-D21に関するデータを示す。

【図11】ヒト、アカゲザル、マウスおよびラット由来のC5aのポリペプチド配列アラインメントを示す図である。

10

20

30

40

50

【図12A】ヒトC5aおよびマウスC5aによる走化性アッセイにおけるC5a結合性スピーゲルマーNOX-D20の効能を示す図であり、様々な量のスピーゲルマーと共に37°Cでプレインキュベートした0.1nMのhuC5aまたは0.3nMのmC5aに向けて細胞を遊走させ、a)細胞数を各データセットの最大値に正規化し、スピーゲルマー濃度に対する百分率数として示し、b)Prism5ソフトウェアによる非線形回帰(4パラメーターフィット)を使用して、走化性が50%阻害されるスピーゲルマー濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

【図12B】ヒトC5aによる走化性アッセイにおけるC5a結合性スピーゲルマーNOX-D21の効能を示す図であり、様々な量のスピーゲルマーと共に37°Cでプレインキュベートした0.1nMのhuC5aに向けて細胞を遊走させ、a)細胞数を各データセットの最大値に正規化し、スピーゲルマー濃度に対する百分率数として示し、b)Prism5ソフトウェアによる非線形回帰(4パラメーターフィット)を使用して、走化性が50%阻害されるスピーゲルマー濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。

【図13】ヒトC5aによる初代ヒトPMNの(A)走化性アッセイおよび(B)エラストラーゼ放出アッセイにおけるC5a結合性スピーゲルマーNOX-D19およびNOX-D20の効能を示す図であり、1nMのhuC5aに向けて細胞を遊走させ、様々な量のスピーゲルマーと共に37°Cでプレインキュベートした30nMのhuC5aによりエラストラーゼ放出を刺激した。

【図14】スピーゲルマー(A)NOX-19およびNOX-D20ならびに(B)NOX-D21によるヒツジ赤血球溶血アッセイを使用するC5切断阻害の評価を示す図である。陽性(C5C6)および陰性の対照(逆NOX-D19および逆NOX-D21)を示す。

【図15】複数菌による敗血症の盲腸結紮穿孔(CLP)マウスモデルにおける生存期間を示す図であり、CLP手術の直後から、示した用量でNOX-D19またはビヒクルを腹腔内に毎日注射した。偽動物にCLPを伴わない手術をし、続いてビヒクルを注射した。

【図16】示した用量でNOX-D19により処理したマウス、ビヒクル処理マウスおよび偽動物における手術前(-4日)およびCLP手術後1日の(A)血清クレアチニンレベルおよび(B)血液尿素窒素(BUN)レベルを示す図である。血清クレアチニンおよびBUNは腎機能に関するバイオマーカーである。

【図17】示した用量でNOX-D19により処理したマウス、ビヒクル処理マウスおよび偽動物における手術前(-4日)およびCLP手術後1日の(A)アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の血清レベルおよび(B)アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベルを示す図である。血清ALTは、肝細胞障害に関するバイオマーカーである。血清ASTは多臓器不全に関するバイオマーカーである。

【図18】複数菌による敗血症の盲腸結紮穿孔(CLP)マウスモデルにおける生存期間を示す図であり、CLP手術の直後から、示した用量でNOX-D20またはビヒクルを腹腔内に毎日注射した。1つの群に、CLP手術の直後に1mg/kgのNOX-D20の単回投与をし、続いてビヒクルを毎日注射した。偽動物にCLPを伴わない手術をし、続いてビヒクルを注射した。

【図19】示した用量でNOX-D20により処理したマウス、ビヒクル処理マウス、および偽動物におけるCLP手術後1日目の(A)血清クレアチニンレベル、(B)血液尿素窒素(BUN)および(C)アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の血清レベルを示す図である。血清クレアチニンおよびBUNは腎機能に関するバイオマーカーである。血清ALTは肝細胞障害に関するバイオマーカーである。

【図20】CLP手術後1日目の、組織傷害に関するバイオマーカーである(A)血清乳酸脱水素酵素(LDH)、(B)血管漏出および(C)腹膜中へのPMN浸潤に関する、示した用量でのNOX-D20の効果を示す図である。ビヒクル処理したマウスおよび偽動物を対照として示す。

【図21】虚血/再灌流損傷により誘発された急性腎傷害のモデルにおける生存期間を示

10

20

30

40

50

す図であり、示した用量でのNOX-D21またはビヒクルを、手術1時間前に静脈内に、続いて3日にわたって24時間毎に腹腔内に注射した。

【図22】本発明による核酸分子を構成する2'デオキシリボヌクレオチドを示す図である。

【図23】本発明による核酸分子を構成するリボヌクレオチドを示す図である。

【実施例1】

【0252】

ヒトおよびマウスのC5aに結合することができる核酸分子

いくつかのC5a結合性核酸分子およびそれらの誘導体を同定し、それらのヌクレオチド配列を図1~図5に示す。C5a結合性核酸分子を、

a) 直接的なプルダウンアッセイ(実施例3)および/または比較競合的なプルダウンアッセイ(comparative competition pull-down assay)を使用して、アダマー、すなわちD-核酸分子として、

b) 表面プラズモン共鳴測定により(実施例4)、およびヒトC5a受容体を発現する細胞によるin vitroアッセイにより(実施例5)、スピーゲルマー、すなわちL-核酸分子として特徴付けた。さらに、スピーゲルマーを、C5aにより誘発される初代ヒト好中球の活性化の阻害に関して(実施例6)およびin vivoで(実施例8、9および10)で試験した。スピーゲルマーおよびアダマーを実施例2に記載するように合成した。

【0253】

こうして生成した核酸分子はわずかに異なる配列を示し、配列を配列ファミリーとして要約するまたは分類することができる。

【0254】

リボヌクレオチド配列モチーフを定義するために、曖昧なヌクレオチドについてのIUPACの略語を使用する。

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

【0255】

別段の記載がない限り、核酸配列またはストレッチの配列それぞれをいずれも5'→3'方向に示す。

【0256】

2'-デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとを区別するために、以下の略語を使用する。

2'-デオキシリボヌクレオチドに関して: dG、dC、dTdAおよびdU(図22を参照されたい)。

リボヌクレオチドに関して: G、C、T、U(図23を参照されたい)。

【0257】

図1~図5に示すように、C5a結合性核酸分子は、潜在的なC5a結合モチーフを定義する、1つの中心ストレッチのヌクレオチドを含み、図1は配列ファミリーの様々な配列を示し、図2~図5は、NOX-D20001(NOX-D19001-6x-DNA-020とも呼ばれる、図4A)およびNOX-D21001(NOX-D19001-

10

20

30

40

50

2 d U - 1 d C - 0 2 0 と呼ばれる、図 5 ) を含む核酸分子 N O X - D 1 9 0 0 1 の誘導体を示す。

【 0 2 5 8 】

一般に、C 5 a 結合性核酸分子は、5' 末端および 3' 末端に末端ストレッチのヌクレオチド、すなわち第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドを含む。第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドと第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドとは相互にハイブリダイズすることができ、ハイブリダイゼーション時に、二本鎖構造が形成される。しかし、そのようなハイブリダイゼーションは、*in vivo* および *in vitro* で分子内に必ずしも与えられるわけではない。

【 0 2 5 9 】

C 5 a 結合性核酸分子の 3 つのストレッチのヌクレオチドである第 1 の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチドおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドは、5' 3' 方向に相互に、すなわち第 1 の末端ストレッチのヌクレオチド - 中心ストレッチのヌクレオチド - 第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドで相互に配列されている。しかし、あるいは、第 1 の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチドおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドは、5' 3' 方向に相互に、すなわち第 2 の末端ストレッチのヌクレオチド、中心ストレッチのヌクレオチド - 第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドで相互に配列されている。

【 0 2 6 0 】

定義したストレッチの配列が、C 5 a 結合性核酸分子の間で異なる場合があり、このことは、C 5 a に対する結合親和性に影響を与える。異なる C 5 a 結合性核酸分子の結合解析に基づくと、以下に記載する中心ストレッチのヌクレオチドおよびそのヌクレオチド配列が個々に、より好ましくはそれらの全体が、ヒト C 5 a への結合のために不可欠である。

【 0 2 6 1 】

図 1 に示す本発明による C 5 a 結合性核酸分子はリボヌクレオチドからなり、図 1 ~ 図 5 に示す。C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - H 6 - 0 0 2 を、C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - D 5 - 0 0 2 に対する比較競合的なプルダウンアッセイ ( プロトコルに関して実施例 3 を参照されたい ) でアプタマーとして試験した。C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - H 6 - 0 0 2 は、C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - D 5 - 0 0 2 と比較して弱い結合親和性を示した。プラズモン共鳴測定により、C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - B 5 - 0 0 2、2 7 4 - D 5 - 0 0 2、2 7 4 - C 8 - 0 0 2、2 7 4 - C 8 - 0 0 2 - G 1 4 ( = N O X - D 1 9 0 0 1 )、2 7 4 - C 5 - 0 0 2 および 2 7 4 - G 6 - 0 0 2 を、それらのヒトおよびマウスの C 5 a への結合能力に関してスピーゲルマーとして試験した ( 実施例 4、図 1 を参照されたい ) 。

【 0 2 6 2 】

C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - C 8 - 0 0 2 - G 1 4 ( = N O X - D 1 9 0 0 1 ) は、マウス C 5 a に関しては  $K_D$  が 0 . 3 n M であり、ヒト C 5 a に関しては  $K_D$  が 1 . 3 8 n M である最大の結合親和性を示す ( 図 1 ) 。

【 0 2 6 3 】

C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - B 5 - 0 0 2、2 7 4 - D 5 - 0 0 2、2 7 4 - C 8 - 0 0 2、2 7 4 - C 8 - 0 0 2 - G 1 4 ( = N O X - D 1 9 0 0 1 )、2 7 4 - C 5 - 0 0 2、2 7 4 - G 6 - 0 0 2 および 2 7 4 - H 6 - 0 0 2 は、配列  
5' AUGUGGUGKUGARGGGHUGUKGGGUGUCGACGCA 3' [ 配列番号 6 9 ] を共有し、  
G、A、U、C、H、K および R は、リボヌクレオチドである。

【 0 2 6 4 】

C 5 a 結合性核酸分子 2 7 4 - C 8 - 0 0 2、2 7 4 - C 8 - 0 0 2 - G 1 4 ( = N O X - D 1 9 0 0 1 ) および 2 7 4 - C 5 - 0 0 2 は C 5 a に対する最大の結合親和性を示し、中心ストレッチに関して以下の配列

10

20

30

40

50

- a) 274 - C8 - 002 : 5' AUGUGGUGUUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号70]、  
 b) 274 - C8 - 002 - G14 : 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号71]、  
 c) 274 - C5 - 002 : 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA 3' [配列番号72]を含み、  
 d) G、A、UおよびCは、リボヌクレオチドである。

【0265】

発明者らは、驚くべきことに、中心ストレッチのヌクレオチドおよび第2の末端ストレッチのヌクレオチドの配列内において2'-デオキシリボヌクレオチドでリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性が向上することを発見した。特に、C5a結合性核酸分子NOX-D19001中において2'-デオキシリボヌクレオチドで6個以下のリボヌクレオチドを置換することにより、ヒトC5aに対する結合親和性が3.5倍向上した。より詳細には、本発明者らは、驚くべきことに以下のことを発見した。

a) C5a結合性核酸分子NOX-D19001の中心ストレッチのヌクレオチド中の4、11、12、25または27位において1個の2'-デオキシリボヌクレオチドで1個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性と比較してヒトC5aに対する結合親和性の向上がもたらされた(図2を参照されたい;スピーゲルマーNOX-D19001-D09、NOX-D19001-D16、NOX-D19001-D17、NOX-D19001-D30、NOX-D19001-D32);

b) C5a結合性核酸分子NOX-D19001の第2の末端ストレッチのヌクレオチド中の1位において1個の2'-デオキシリボヌクレオチドで1個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性と比較してヒトC5aに対する結合親和性の向上がもたらされた(図2を参照されたい;スピーゲルマーNOX-D19001-D40);

c) C5a結合性核酸分子NOX-D19001の中心ストレッチのヌクレオチド中の4/25、4/27または25/27位において2個の2'-デオキシリボヌクレオチドで2個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性と比較してピオチン化C5aに対する結合親和性の向上がもたらされた(図3を参照されたい;スピーゲルマーNOX-D19001-D09-30、NOX-D19001-D09-32、NOX-D19001-D30-32);

d) 2個のリボヌクレオチドを置換することであって、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の第2の末端ストレッチのヌクレオチド中の1位において1個の2'-デオキシリボヌクレオチドで1個のリボヌクレオチドを置換することにより、およびC5a結合性核酸分子NOX-D19001の中心ストレッチのヌクレオチド中の4、25または27位において1個の2'-デオキシリボヌクレオチドで1個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性と比較してヒトC5aに対する結合親和性の向上がもたされた(図3を参照されたい;スピーゲルマーNOX-D19001-D09-40、NOX-D19001-D30-40、NOX-D19001-D32-40);

e) 3個のリボヌクレオチドを置換することであって、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の第2の末端ストレッチのヌクレオチド中の1位において1個の2'-デオキシリボヌクレオチドで1個のリボヌクレオチドを置換することにより、およびC5a結合性核酸分子NOX-D19001の中心ストレッチのヌクレオチド中の4/25、4/27、25/27位において2個の2'-デオキシリボヌクレオチドで2個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a結合性核酸分子NOX-D19001の結合親和性と比較してヒトC5aに対する結合親和性の向上がもたされた(図3を参照されたい;スピーゲルマーNOX-D19001-D09-30-40、NOX-D19001-D09

10

20

30

40

50

- 32 - 40、NOX - D19001 - D30 - 32 - 40) ;

f) C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の中心ストレッチのヌクレオチド中の 04 / 25 / 27 位において 3 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 3 個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の結合親和性と比較してピオチン化 C5a に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 を参照されたい ; スピーゲルマー NOX - D19001 - D09 - 30 - 32) ;

g) 4 個のリボヌクレオチドを置換することであって、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の第 2 の末端ストレッチのヌクレオチド中の 1 位において 1 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 1 個のリボヌクレオチドを置換することにより、および C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の中心ストレッチのヌクレオチドの 04 / 25 / 27 10  
位において 3 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 3 個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の結合親和性と比較してヒト C5a に対する結合親和性の向上がもたされた (図 3 を参照されたい ; スピーゲルマー NOX - D19001 - D09 - 30 - 32 - 40) ;

h) 5 個のリボヌクレオチドを置換することであって、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の第 2 の末端ストレッチのヌクレオチド中の 1 位において 1 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 1 個のリボヌクレオチドを置換することにより、および C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の中心ストレッチのヌクレオチドの 04 / 11 / 25 / 27 または 04 / 12 / 25 / 27 位において 4 個の 2' - デオキシリボヌクレオチド 20  
で 4 個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の結合親和性と比較してヒト C5a に対する結合親和性の向上がもたされた (図 3 を参照されたい ; スピーゲルマー NOX - D19001 - D09 - 16 - 30 - 32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 17 - 30 - 32 - 40) ;

i) 6 個のリボヌクレオチドを置換することであって、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の第 2 の末端ストレッチのヌクレオチド中の 1 位において 1 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 1 個のリボヌクレオチドを置換することにより、および C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の中心ストレッチのヌクレオチドの 04 / 11 / 12 / 25 / 27 位において 5 個の 2' - デオキシリボヌクレオチドで 5 個のリボヌクレオチドを置換することにより、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 の結合親和性と比較してヒト C5a に対する結合親和性の向上がもたされた (図 3 を参照されたい ; スピーゲルマー NOX - D19001 - D09 - 16 - 17 - 30 - 32 - 40 = NOX - D19 - 001 - 6 x DNA) 。 30

#### 【0266】

C5a 結合性核酸分子の中心ストレッチのヌクレオチドのいくつかの位置における 2' - デオキシリボヌクレオチドによるリボヌクレオチドの置換によって C5a に対する結合の向上がもたらされることを示すデータに基づいて、試験した全ての C5a 結合性核酸分子の中心ストレッチを以下の一般式

5' AUG<sub>n<sub>1</sub></sub> GGUGKUN<sub>2</sub>n<sub>3</sub> RGGGHUGUKGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号 61] に要約することができ、

n<sub>1</sub> は、U または dU であり、n<sub>2</sub> は、G または dG であり、n<sub>3</sub> は、A または dA であり、n<sub>4</sub> は、U または dU であり、n<sub>5</sub> は、U または dU であり、かつ 40  
G、A、U、C、H、K

および R は、リボヌクレオチドであり、かつ dU、dG および dA は、2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

a) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n<sub>1</sub></sub> GGUGUUN<sub>2</sub>n<sub>3</sub> AGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC  
A 3' [配列番号 62] (274 - B5 - 002 を参照されたい) ;

の配列を含み、または

b) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n<sub>1</sub></sub> GGUGUUN<sub>2</sub>n<sub>3</sub> GGGGUUGUGGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC 50

A 3' [ 配列番号 63 ] ( 274 - D5 - 002 を参照されたい )

の配列を含み、または

c) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC

A 3' [ 配列番号 64 ] ( 274 - C8 - 002 を参照されたい )

の配列を含み、または

d) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>AGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC

A 3' [ 配列番号 65 ] ( NOX - D19001 を参照されたい )

の配列を含み、または

e) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGUUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC

A 3' [ 配列番号 66 ] ( 274 - C5 - 002 を参照されたい )

の配列を含み、または

f) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n1</sub>GGUGGUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGAUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC

A 3' [ 配列番号 67 ] ( 274 - G6 - 002 を参照されたい )

の配列を含み、または

g) 好ましい実施形態では、中心ストレッチのヌクレオチドは、

5' AUG<sub>n1</sub>GGUGUUn<sub>2</sub>n<sub>3</sub>GGGGCUGUUGGGn<sub>4</sub>Gn<sub>5</sub>CGACGC

A 3' [ 配列番号 68 ] ( 274 - H6 - 002 を参照されたい )

の配列を含む。

【 0267 】

C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 - D09、NOX - D19001 - D16、NOX - D19001 - D17、NOX - D19001 - D30、NOX - D19001 - D32、NOX - D19001 - D09 - 30、NOX - D19001 - D09 - 32、NOX - D19001 - D09 - 40、NOX - D19001 - D30 - 32、NOX - D19001 - D30 - 40、NOX - D19001 - D32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 30 - 32、NOX - D19001 - D09 - 30 - 40、NOX - D19001 - D09 - 32 - 40、NOX - D19001 - D30 - 32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 30 - 32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 16 - 30 - 32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 17 - 30 - 32 - 40、NOX - D19001 - D09 - 16 - 17 - 30 - 32 - 40 ( 図2および図3を参照されたい ) は C5a に対する最大の結合親和性を示し、中心ストレッチのヌクレオチドに関して以下の配列を含み、

a) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 73 ] ( NOX - D19001 - D09、NOX - D19001 - D09 - 40 を参照されたい ) ; または

b) 5' AUGUGGUGGUGdGAAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 74 ] ( NOX - D19001 - D16 参照 ) ; または

c) 5' AUGUGGUGGUGdAAGGGUUGUUGGGUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 75 ] ( NOX - D19001 - D17 参照 ) ; または

d) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 76 ] ( NOX - D19001 - D30、NOX - D19001 - D30 - 40 を参照されたい ) ; または

e) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGUGdUCGACGCA

3' [ 配列番号 77 ] ( NOX - D19001 - D32、NOX - D19001 - D32 - 40 を参照されたい ) ; または

f) 5' AUGdUGGUGGUGAAGGGUUGUUGGGdUGUCGACGCA

3' [ 配列番号 78 ] ( NOX - D19001 - D09 - 30、NOX - D19001

10

20

30

40

50

- D 0 9 - 3 0 - 4 0 を参照されたい) ; または

g) 5' AUG dUGGUGGUGAAGGGUUUGUUUGGGUG dUCGACGCA  
3' [配列番号79] (NOX - D19001 - D09 - 32、NOX - D19001  
- D09 - 32 - 40 を参照されたい) ;

h) 5' AUGUGGUGGUGAAGGGUUUGUUUGGG dUG dUCGACGCA  
3' [配列番号80] (NOX - D19001 - D30 - 32、NOX - D19001  
- D30 - 32 - 40 を参照されたい) ; または

i) 5' AUG dUGGUGGUGAAGGGUUUGUUUGGG dUG dUCGACGC  
A 3' [配列番号81] (NOX - D19001 - D09 - 30 - 32、NOX - D1  
9001 - D09 - 30 - 32 - 40) ; または

j) 5' AUG dUGGUGGU dGAAGGGUUUGUUUGGG dUG dUCGACG  
CA 3' [配列番号82] (NOX - D19001 - D09 - 16 - 30 - 32 - 40  
を参照されたい) ; または

k) AUG dUGGUGGUG dAAGGGUUUGUUUGGG dUG dUCGACGCA  
3' [配列番号83] (NOX - D19001 - D09 - 17 - 30 - 32 - 40 を参  
照されたい) ; または

l) 5' AUG dUGGUGGU dGdAAGGGUUUGUUUGGG dUG dUCGAC  
GCA 3' [配列番号84] (NOX - D19001 - D09 - 16 - 17 - 30 - 3  
2 - 40 = NOX - D19001 - 6 x DNA を参照されたい) 、

G、A、U および C は、リボヌクレオチドであり、かつ dG、dA および dU は、2' -  
デオキシリボヌクレオチドである。

#### 【0268】

表面プラズモン共鳴測定により決定し、C5a 結合性核酸分子 NOX - D19001 -  
D09 および NOX - D19001 - D09 - 16 - 17 - 30 - 32 - 40 (NOX -  
D19001 - 6 x DNA と呼ばれる) に関して例示するように、C5a 結合性核酸分  
子 NOX - D19001 の結合親和性は、2' - デオキシリボヌクレオチドで 1 ~ 6 個の  
リボヌクレオチドを置換することにより著しく改善された (図 6) :

NOX - D19001 : 1.38 nM の  $K_D$ 、

NOX - D19001 - D09 : 709 pM の  $K_D$ 、

NOX - D19001 - D09 - 16 - 17 - 30 - 32 - 40 : 361 pM の  $K_D$ 。

#### 【0269】

NOX - D19001 - 6 x DNA は、リボヌクレオチドの代わりに 5 個の 2' - デオ  
キシリボヌクレオチドを有する中心ストレッチのヌクレオチド、5 個のリボヌクレオチド  
を有する第 1 の末端ストレッチのヌクレオチド、および 4 個のリボヌクレオチドと 1 個の  
2' - デオキシリボヌクレオチドとを有する第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドを含む  
。驚くべきことに、発明者らは、4 個または 3 個のヌクレオチドに対する親和性を低下さ  
せることなく、第 1 のおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドを切り詰めることがで  
きることを明らかにすることができた。本明細書に示すように、親和性を保持しつつ、N  
OX - D19001 - 6 x DNA の第 1 のおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドを  
5 個のヌクレオチドから 3 個のヌクレオチドに切り詰めることができた (NOX - D20  
001 と呼ばれる NOX - D19001 - 6 x DNA - 020 を参照されたい) (図 4  
A)。

#### 【0270】

図 4 は、リボヌクレオチドの 2' - デオキシリボヌクレオチドへの置換および切り詰め  
の成功した組み合わせを実証し、それぞれリボヌクレオチドならびに 5 個のヌクレオチド  
を有する第 1 のおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドからなる NOX - D1900  
1 - 6 x DNA および NOX - D19001 - 6 x DNA - 020 (NOX - D2000  
1 と呼ばれる) の母分子である NOX - D19001 は、1.38 nM の結合親和性 ( $K_D$ )  
を有する。6 個のリボヌクレオチドの (NOX - D19001 - 6 x DNA をもた  
らす) 2' - デオキシリボヌクレオチドへの置換、ならびに (NOX - D20001 と

10

20

30

40

50

呼ばれる NOX - D 1 9 0 0 1 - 6 x DNA - 0 2 0 をもたらす) 3 個のヌクレオチドを有する第 1 のおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドへの切り詰め後に、ヒト C 5 a に対する結合親和性は 4 を超える倍数で向上した (NOX - D 2 0 0 0 1、0.3 nM の  $K_D$ )。ヌクレオチドの第 1 のまたは第 2 のストレッチのヌクレオチドの 1 個のヌクレオチドへの切り詰めにより活性の低下がもたらされるが、そのような分子は、10 nM 未満の  $K_D$  で C 5 a に依然として結合する (図 4 A、図 4 B を参照されたい)。

#### 【0271】

2' - デオキシリボヌクレオチドによるリボヌクレオチドの成功した置換に関する別の例を図 5 に示す。分子 NOX - D 1 9 0 0 1 - 0 2 0 は、NOX - D 1 9 0 0 1 の切り詰められた誘導体であり、NOX - D 1 9 0 0 1 に関して決定した 1.38 nM (図 1 および図 2 を参照されたい) の代わりに 11.3 nM (図 5 を参照されたい) の  $K_D$  を有する。両方の分子が同一の中心ストレッチのヌクレオチドを含むが、NOX - D 1 9 0 0 1 - 0 2 0 は、5 個のリボヌクレオチドの代わりに 3 個のみの第 1 の末端ストレッチと、5 個のリボヌクレオチドの代わりに 3 個のみの第 2 の末端ストレッチとを含む。中心ストレッチのヌクレオチドにおける 2' - デオキシリボヌクレオチドによる 2 個または 3 個のリボヌクレオチドの置換、および任意選択的に、第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドにおける 2' - デオキシリボヌクレオチドによる 1 個のリボヌクレオチドの置換により、NOX - D 1 9 0 0 1 - 0 2 0 の結合親和性を、10 を超える倍数で改善することができる (図 5、NOX - D 1 9 0 0 1 - 2 x DNA - 0 2 0、NOX - D 1 9 0 0 1 - 3 x DNA - 0 2 0、NOX - D 2 1 0 0 1 と呼ばれる NOX - D 1 9 0 0 1 - 2 d U - 1 d C - 0 2 0、NOX - D 1 9 0 0 1 - 3 d U - 1 d C - 0 2 0 を参照されたい)。

#### 【0272】

これらをまとめると、C 5 a 結合性核酸分子の第 1 のおよび第 2 の末端ストレッチは、1 個、2 個、3 個、4 個または 5 個のヌクレオチドを含み (図 1 ~ 図 5)、ストレッチは任意選択的に、相互にハイブリダイズし、ハイブリダイゼーション時に二本鎖構造が形成される。この二本鎖構造は、1 ~ 5 個の塩基対からなることができる。しかし、そのようなハイブリダイゼーションは、必ずしも分子内で生じるとは限らない。

#### 【0273】

試験した全ての C 5 a 結合性核酸分子の第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドおよび第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドの解析により、第 1 の末端ストレッチのヌクレオチドの一般式は 5' Z<sub>1</sub> Z<sub>2</sub> Z<sub>3</sub> Z<sub>4</sub> G 3' であり、第 2 の末端ストレッチのヌクレオチドの一般式は 5' Z<sub>5</sub> Z<sub>6</sub> Z<sub>7</sub> Z<sub>8</sub> Z<sub>9</sub> 3' であり、

Z<sub>1</sub> は、G または不在であり、Z<sub>2</sub> は、S または不在であり、Z<sub>3</sub> は、S または不在であり、Z<sub>4</sub> は、B または不在であり、Z<sub>5</sub> は、C または dC であり、Z<sub>6</sub> は、V または不在であり、Z<sub>7</sub> は、S または不在であり、Z<sub>8</sub> は、S または不在であり、Z<sub>9</sub> は、C または不在であり、かつ

G、S、B、C、V は、リボヌクレオチドであり、かつ dC は 2' - デオキシリボヌクレオチドであり、

第 1 の好ましい実施形態では、

a) Z<sub>1</sub> は、G であり、Z<sub>2</sub> は、S であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、C であるか、または

b) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、S であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、S であり、Z<sub>9</sub> は、不在であるか、または

c) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、S であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、S であり、Z<sub>8</sub> は、不在であり、Z<sub>9</sub> は、不在であるか、または

d) Z<sub>1</sub> は、不在であり、Z<sub>2</sub> は、不在であり、Z<sub>3</sub> は、不在であり、Z<sub>4</sub> は、B であり、Z<sub>5</sub> は、C もしくは dC であり、Z<sub>6</sub> は、V であり、Z<sub>7</sub> は、不在であり、Z<sub>8</sub> は、不

10

20

30

40

50

在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

e) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、Sであり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

f) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

g) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

h) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、Cであるか、または

i) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

j) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

k) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、Sであり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

l) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、Sであり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

m) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、Sであり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

n) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、不在であり、Z<sub>5</sub>は、Cであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

o) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、不在であり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、Sであり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

p) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、Vであり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であるか、または

q) Z<sub>1</sub>は、不在であり、Z<sub>2</sub>は、不在であり、Z<sub>3</sub>は、Sであり、Z<sub>4</sub>は、Bであり、Z<sub>5</sub>は、CもしくはdCであり、Z<sub>6</sub>は、不在であり、Z<sub>7</sub>は、不在であり、Z<sub>8</sub>は、不在であり、Z<sub>9</sub>は、不在であり、

第2の好ましい実施形態では、

a) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCUG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CAGGC'のヌクレオチド配列を含むか、または

b) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCUG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGGC3'のヌクレオチド配列を含むか、または

c) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CCUG3'もしくは5'CUG

10

20

30

40

50

- 3'もしくは5'UG3'もしくは5'G3'のヌクレオチド配列を含み、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGGC3'のヌクレオチド配列  
 を含むか、または
- d)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCUG3'のヌクレオチド配列  
 を含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGC3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、または
- e)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCCG3'のヌクレオチド配列  
 を含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGGC3'のヌクレオチド配列を 10  
 含むか、または
- f)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GGCG3'のヌクレオチド配列  
 を含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGCC3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、または
- g)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CUG3'もしくは5'UG3'  
 もしくは5'CG3'もしくは5'G3'のヌクレオチド配列を含み、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAGC3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、または
- h)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCUG3'のヌクレオチド配列 20  
 を含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAC3'もしくは5'dCC3'  
 もしくは5'dCA3'のヌクレオチド配列を含むか、または
- i)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GUG3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCAC3'のヌクレオチド配列を含  
 むか、または
- j)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'UG3'のヌクレオチド配列を含  
 み、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCA3'のヌクレオチド配列を含む 30  
 か、または
- k)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCG3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGC3'のヌクレオチド配列を含  
 むか、または
- l)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CG3'のヌクレオチド配列を含  
 み、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGC3'のヌクレオチド配列を含  
 むか、または
- m)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'G3'のヌクレオチド配列を含み 40  
 、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCGC3'のヌクレオチド配列を含  
 むか、または
- n)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCG3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCC3'のヌクレオチド配列を含む  
 か、または
- o)前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCG3'のヌクレオチド配列を  
 含むか、かつ  
 前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dC3'のヌクレオチド配列を含むか 50

、または

p) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'dCC3'のヌクレオチド配列を含むか、または

q) 前記第1の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'GCG3'のヌクレオチド配列を含み、かつ

前記第2の末端ストレッチのヌクレオチドが、5'CGC3'のヌクレオチド配列を含む。

#### 【0274】

これらの機能性を証明するために、C5a結合性核酸分子NOX-D19001、NOX-D20001およびNOX-D21001を、その5'末端にアミノ基を含むスピーゲルマーとして合成した。前記アミノ修飾スピーゲルマーに対して40kDaのPEG部分を結合させ、C5a結合性スピーゲルマーNOX-D19、NOX-D20およびNOX-D21をもたらした。スピーゲルマーの合成およびPEG化を実施例2に記載する。

#### 【0275】

C5a結合性核酸分子の機能性に関して、結合親和性の向上の効果を明らかにすることができた。走化性アッセイにより決定したように(実施例5)、リボヌクレオチドのみからなるC5a結合性核酸分子NOX-D19( $IC_{50} = 1.9 \text{ nM}$ )は、NOX-20、6個のリボヌクレオチドが2'-デオキシリボヌクレオチドに置換されているNOX-D19の誘導C5a結合性核酸分子( $IC_{50} = 0.28 \text{ nM}$ )よりもヒトC5aの機能を阻害する作用が弱かった(図7)。

#### 【0276】

NOX-D20は、19pMの解離定数 $K_D$ でマウスC5aに対する非常に高い結合親和性を示したが、ヒトC5aに関しては299pMの $K_D$ を決定した(実施例4、図8)。NOX-D20は、走化性アッセイにより決定した275pMの阻害定数 $IC_{50}$ でヒトC5aの機能を阻害する(実施例5、図7および図12A)。化学量論的理由のために、マウスC5aに関する走化性アッセイの感度は、300pMであるマウスC5aの刺激濃度に起因して150pMに制限される。したがって、マウスC5aに関しては、NOX-D20に関して140pMの $IC_{50}$ に決定した(実施例5、図12A)。

#### 【0277】

NOX-D20はラットまたはアカゲザル由来のC5aへの結合を示さず、非常に高い標的特異性を示した(図8)。ヒト、マウス、ラットおよびアカゲザルのC5aのポリペプチド配列アラインメントおよび決定した特異性から、ヒトC5aの残基セリン16およびバリン28がC5a上の不可欠の結合残基である可能性が最も高い(図11)。これらはヒトおよびマウスのC5aで保存されているが、アカゲザルおよびラットのC5aでは異なる。

#### 【0278】

NOX-D21はNOX-D20の主要な親和性向上部位を含有し、Biacore測定により明らかなように、ヒトおよびマウスのC5aに対する高い親和性を示した( $K_D$ (マウスC5a) = 29pM、 $K_D$ (ヒトC5a) = 815pM、 $K_D$ (ヒトC5) = 413pM、図11を参照されたい)。NOX-D21は、走化性アッセイにより決定したように476pMの阻害定数 $IC_{50}$ でヒトC5aの機能を阻害する(実施例5、図12B)。

#### 【0279】

C末端のアルギニン残基の酵素的切断により、des-Arg-C5a(C5adesArgとも呼ばれる)として知られているC5aの切り詰められたバージョンをin vivoで生成した。des-Arg-C5aの生物学的機能は完全に理解されていないが、des-Arg-C5aが白血球活性化機能を保持する証拠がある。したがって、NOX-D20もdes-Arg-C5aに結合するかどうかを調べた。NOX-D20は、

10

20

30

40

50

固定化した組み換えヒト des - Arg - C5a に用量依存的に結合することを示した ( 図 9 )。

#### 【 0 2 8 0 】

記載した詳細な動態評価は、ヒト des - Arg - C5a が、同等の親和性を有する NOX - 20 により完全長のヒト C5a に結合し、それぞれの解離定数が 316 pM および 299 pM であることを示した。NOX - D21 は、マウスおよびヒトの des - Arg - C5a に、それぞれ 28 pM および 854 pM の解離定数で結合した ( 図 10 )。したがって、C5a の des - Arg - C5a への切断後であっても、NOX - 20 および NOX - D21 等の C5a 結合性核酸分子は、依然としてその標的に結合する。

#### 【 0 2 8 1 】

驚くべきことに、NOX - D20 および NOX - D21 も、ヒト血漿から精製した C5 に、それぞれ 164 pM および 413 pM の親和性で結合することを示した ( 図 9 および 図 10 )。この現象を予測することができなかった。しかし、C5a は C5 の一部であることから、補体系が活性化される場合に C5 転換酵素により、または活性化された凝固系の トロンビン またはその他のメンバーにより C5 が切断される可能性がある。さらに、ヒト血漿から精製した C5 は、アスパラギン 64 上に天然グリコシル化構造を担持する。グリコシル化は、NOX - D19、NOX - D20、NOX - D21 および本発明によるその他の核酸分子の同定に使用したマウスの鏡像 C5a ポリペプチド上には存在しなかった。

#### 【 0 2 8 2 】

大型の C5 タンパク質の予想される低クリアランスおよび 350 ~ 390 nM の公開された血漿濃度により、C5 への結合が薬物動態に影響を及ぼす場合がある。C5 への結合は薬力学にも影響を及ぼす場合がある。C5 は、NOX - 20 および NOX - D21 等の C5a 結合性核酸分子により結合されるが、C5a は、C5a が遊離されて受容体のシグナル伝達をもたらす可能性がある前に、スピーゲルマーによりすでに遮断されている。

#### 【 実施例 2 】

#### 【 0 2 8 3 】

アプタマーおよびスピーゲルマーの合成および誘導体化

小規模な合成

アプタマー ( D - RNA 核酸 ) およびスピーゲルマー ( L - RNA 核酸 ) を、ABI 394 合成機 ( Applied Biosystems、Foster City、CA、米国 ) を用いて、2' TBDMS RNA ホスホラミダイト化学 ( Damha および Ogilvie、1993 ) を使用する固相合成によって生成した。D - および L - 立体配置の rA ( N - Bz ) -、rC ( Ac ) -、rG ( N - ibu ) - および rU - ホスホラミダイトを ChemGenes、Wilmington、MA から購入した。アプタマーおよびスピーゲルマーを、ゲル電気泳動によって精製した。

#### 【 0 2 8 4 】

大規模な合成および改変

スピーゲルマーを、Aktapilot 100 合成機 ( Amersham Biosciences ; General Electric Healthcare、Freiburg ) を用いて、2' TBDMS RNA ホスホラミダイト化学 ( Damha および Ogilvie、1993 ) を使用する固相合成によって生成した。L - rA ( N - Bz ) -、L - rC ( Ac ) -、L - rG ( N - ibu ) - および L - rU - ホスホラミダイトを、ChemGenes、Wilmington、MA から購入した。5' - アミノ改変体を、American International Chemicals Inc. ( Framingham、MA、米国 ) から購入した。未改変または 5' - アミノ改変のスピーゲルマーの合成を、L - riboG、L - riboC、L - riboA または L - riboU 改変 CPG ポアサイズ 1000 ( Link Technology、Glasgow、英国 ) 上で開始した。カップリング ( 1 サイクルあたり 15 分 ) のために、アセトニトリル中の 0.3 M ベンジルチオテトラゾール ( CMS - Chemicals、A

10

20

30

40

50

bingdon、英国)、およびアセトニトリル中の3.5当量のそれぞれの0.1Mホスホラミダイト溶液を使用した。酸化-カップリングのサイクルを使用した。オリゴヌクレオチド合成のためのさらなる標準的な溶媒および試薬は、Biosolve (Valkenswaard、オランダ)から購入した。スピーゲルマーをDMT-ONで合成した。脱保護の後、スピーゲルマーを調製用RP-HPLC (Wincottら、1995)によって、Source 15 RPC媒体 (Amersham)を使用して精製した。5' DMT基を、80%酢酸を用いて除去した(室温にて30分)。それに続いて、2M NaOAc水溶液を添加し、スピーゲルマーを、接線フローろ過によって、5K再生セルロースメンブラン (Millipore、Bedford、MA)を使用して脱塩した。

#### 【0285】

##### スピーゲルマーのPEG化

*in vivo*におけるスピーゲルマーの血漿滞留時間を延長させるために、スピーゲルマーを、5'末端において40kDaのポリエチレングリコール(PEG)部分に共有結合によって結合させた。

PEG化するために(PEG化のための方法の技術的な詳細については、欧州特許出願第EP1 306 382号を参照されたい)、精製した5'-アミノ改変スピーゲルマーを、H<sub>2</sub>O(2.5ml)、DMF(5ml)および緩衝液A(5ml;クエン酸H<sub>2</sub>O[7g]、ホウ酸[3.54g]、リン酸[2.26ml]および1M NaOH[343ml])を混合し、水を添加して1lの最終容積となすことによって調製し;1M HClを用いてpH=8.4に加減した)の混合液中に溶解させた。

#### 【0286】

スピーゲルマー溶液のpHを、1M NaOHを用いて8.4とし、次いで、40kDaのPEG-NHSエステル(Jenkem Technology、Allen、TX、米国)を、37°Cにおいて各0.25当量を6回に分けて30分毎に添加して、75~85%の収率を達成した。反応混合物のpHは、PEG-NHSエステルを添加する間、1M NaOHを用いて8~8.5に保った。

#### 【0287】

反応混合物を、4mlの尿素溶液(8M)および4mlの緩衝液B(H<sub>2</sub>O中の0.1M酢酸トリエチルアンモニウム)と混ぜ、15分かけて95°Cまで加熱した。次いで、PEG化スピーゲルマーを、RP-HPLCにより、Source 15 RPC媒体(Amersham)を用いて、アセトニトリル勾配(緩衝液B;緩衝液C:アセトニトリル中の0.1M酢酸トリエチルアンモニウム)を使用して精製した。過剰なPEGは5%緩衝液Cにおいて、PEG化スピーゲルマーは10~15%緩衝液Cにおいて溶出した。>95%の純度(HPLCによって判定)を有する生成物の画分を組み合わせ、40mlの3M NaOAcと混合した。PEG化スピーゲルマーは、接線フローろ過(5K再生セルロースメンブラン、Millipore、Bedford、MA)によって脱塩した。

#### 【実施例3】

#### 【0288】

##### アプタマーのためのC5aへの結合定数の決定(プルダウンアッセイ)

##### 直接的なプルダウンアッセイ

C5a結合性核酸の親和性を、ビオチン化マウスD-C5a(配列番号89)に対するアプタマー(D-RNA核酸)の結合として、プルダウンアッセイのフォーマットにおいて37°Cで測定した。アプタマーは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(Invitrogen)によって、[<sup>-32</sup>P]-標識ATP(Hartmann Analytic、Braunschweig、ドイツ)を使用して5'-リン酸標識した。標識されたアプタマーの特異的な放射活性は、200,000~800,000cpm/ピコモルであった。アッセイを、選択緩衝液(20mM Tris-HCl、pH 7.4;150mM NaCl;5mM KCl;1mM MgCl<sub>2</sub>;1mM CaCl<sub>2</sub>;4U/ml RNase阻害剤(RNaseOUT、Invitrogen);結合パートナーが、使用するプラスチック製品または固定化マトリックスの表面に吸着するのを予防するため

10

20

30

40

50

に、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ血清アルブミン (Sigma) および  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の非特異的スピーゲルマーを補充した  $0.1\% [w/vol]$  ツイーン 20) 中で実施した。低い濃度において平衡に達するために、アプタマーを、変性および再生の後に、 $0.2 \sim 1 \text{ nM}$ の濃度で、選択緩衝液中、ビオチン化マウス D - C 5 a の変化させた量と一緒に  $37^\circ\text{C}$  で  $3 \sim 4$  時間インキュベートした。ビオチン化マウス D - C 5 a の濃度範囲は、 $640 \text{ pM} \sim 10 \mu\text{M}$  に設定し；全反応容積は  $80 \sim 200 \mu\text{l}$  であった。選択緩衝液を用いてあらかじめ平衡化してある  $5 \mu\text{l}$  の Neutr Avidin Agarose Plus 粒子 (Pierce Biotechnology) 上に、ビオチン化マウス D - C 5 a 、およびアプタマーとビオチン化マウス D - C 5 a との複合体を固定化した。粒子を、サーモミキサー中で、懸濁液中に  $37^\circ\text{C}$  で  $30$  分間保った。上清を取り除き適切に洗浄した後、固定化した放射活性をシンチレーションカウンター中で定量化した。結合のパーセントを、ビオチン化マウス D - C 5 a の濃度に対してプロットし、解離定数を、 $1:1$  の化学量論を推測し、ソフトウェアアルゴリズム (GraphPad Prism) を使用することによって得た。

【0289】

#### 競合的なプルダウンアッセイ

異なる D - C 5 a 結合性核酸を比較するために、競合的なランク付けアッセイを実施した。この目的では、利用可能な最もアフィンなアプタマーを放射標識し (上記を参照されたい)、参照として用いた。それを、変性および再生の後、選択緩衝液中で、ビオチン化マウス D - C 5 a と共に  $37^\circ\text{C}$  で、競合がない場合には  $4 \mu\text{l}$  の Neutr Avidin Agarose Plus 粒子 (Pierce Biotechnology) 上への固定化および洗浄の後に約  $5 \sim 10\%$  のビオチン化マウス D - C 5 a への結合をもたらす条件下でインキュベートした。過剰量の変性および再生した非標識 D - RNA アプタマー変異体を、 $9 \text{ pM} \sim 400 \text{ nM}$  の範囲の濃度で、標識参照アプタマーと共に平行結合反応に添加し；全反応容積は  $160 \sim 400 \mu\text{l}$  であった。 $3 \sim 4$  時間のインキュベーション後にビオチン化マウス D - C 5 a 、およびアプタマーとビオチン化との複合体を固定化し、アッセイを上記に記載したように解析した。試験しようとするアプタマーは、参照アプタマーと競合して標的に結合し、したがって、それらの結合の特徴に依存して、結合のシグナルが減少した。次いで、このアッセイにおいて最も活性であることが見出されたアプタマーを、さらなるアプタマー変異体の競合解析のための新しい参照として用いることができた。

【実施例 4】

【0290】

#### C 5 a および関連ペプチドに結合するスピーゲルマーの Biacore 測定

装置を  $37^\circ\text{C}$  の不変温度に設定した。DESORB法を使用して Biacore 2000 装置を洗浄した後、新しいチップについて各実験 / 固定化を開始した。メンテナンスチップのドッキング後、装置に脱着溶液 1 ( $0.5\%$  のドデシル硫酸ナトリウム、SDS)、脱着溶液 2 ( $50 \text{ mM}$  のグリシン、 $\text{pH} 9.5$ ) および HBS - EP 緩衝液を連続してプライミングした。最後に、系に HBS - EP 緩衝液をプライミングした。

【0291】

Biacore 実験用に C 5 a 結合性スピーゲルマーを滅菌水で調製し、濃度を  $100 \mu\text{M}$  とした。

【0292】

CM5 チップを HBS - EP 緩衝液でプライミングし、安定したベースラインが観察されるまで平衡化した。フローセルを、フローセル 4 から始めてフローセル 1 まで固定化した。 $0.4 \text{ M}$  の EDC および  $0.1 \text{ M}$  の NHS の  $1:1$  混合物  $100 \mu\text{l}$  を、QUICK INJECT コマンドを使用して  $10 \mu\text{l}/\text{分}$  の流量で注入した。NHS / EDC 注入後の RU の増加 (典型的には、CM5 チップで  $150 \sim 500 \text{ RU}$ ) により、フローセルの活性化をモニタリングした。C 5 a に関しては  $10 \text{ mM}$  の NaAc  $\text{pH} 5.5$  中の、またはヒト C 5 に関しては  $10 \text{ mM}$  の NaAc  $\text{pH} 5.5$  中の、 $0.1 \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の

10

20

30

40

50

溶液をバイアルに移し、MANUAL INJECTコマンドを使用して10  $\mu$ l / 分の流量で注入した。1000 ~ 3000 RUをチップに固定化した。次いで、70  $\mu$ lの1 M エタノールアミン塩酸塩、pH 8を10  $\mu$ l / 分の流量で注入することにより、全てのフローセルを遮断した。30  $\mu$ lの再生溶液(1 MのNaCl)を30  $\mu$ l / 分の流量で注入し、非特異的に結合しているタンパク質をチップ表面から除去した。

#### 【0293】

最低濃度で開始して、実行緩衝液で希釈した2,000 - 1,000 - 500 - 200 - 125 - 62.5 - 31.3 - 15.6 (2x) - 7.8 - 3.9 - 1.95 - 0.98 - 0.48 - 0.24 - 0.12 - 0 nMの濃度での一連のスピーゲルマー注入により、動態パラメータおよび解離定数を評価した。全ての実験において、30  $\mu$ l / 分の流量で、240の会合時間および240秒の解離時間を定義するKinjectコマンドを使用して、37°Cで解析を実施した。アッセイを二重参照し、FC1は(遮断)表面对照として用い(各スピーゲルマー濃度のバルク寄与)、被検体を含まない一連の緩衝液注入は、緩衝液それ自体のバルク寄与を決定した。少なくとも1つのスピーゲルマー濃度を2回注入し、実験中の再生効率およびチップの完全性をモニタリングした。30  $\mu$ l / 分の流量で60  $\mu$ lの1 M NaClを注入することにより再生を実施した。各再生サイクル後のベースラインの安定化時間を30  $\mu$ l / 分で1分に設定した。

10

#### 【0294】

データ解析および解離定数(KD)の算出を、定数RIおよび $1 \times 10^7$  [RU / M \* s]の質量輸送係数による質量輸送評価によって改変されたLangmuir 1:1化学量論適合アルゴリズムを使用するBIAevaluation 3.1.1ソフトウェア(BIACORE AB、Uppsala、スウェーデン)により行なった。

20

#### 【実施例5】

#### 【0295】

走化性アッセイにおける阻害濃度の決定

C5aのためのヒト受容体を発現する細胞株の生成

ヒトC5a受容体をコードするプラスミド(NCBI寄託NM\_001736、pcDNA3.1+)でBA/F3マウスプロB細胞をトランスフェクトすることにより、C5aのためのヒト受容体を発現する安定的なトランスフェクト細胞株を生成した。C5aRを発現する細胞をゲネチシン処理により選択し、RT-PCRにより発現に関して試験し、走化性アッセイにより機能性に関して試験した。

30

#### 【0296】

走化性アッセイ

実験前日、細胞を $0.3 \times 10^6$ 個/mlで新しいフラスコ中に播種する。実験のために、細胞を遠心分離し、HBH(HBS、1 mg/mlのウシ血清アルブミンおよび20 mMのHEPESを含有する)中で1回洗浄し、 $1.33 \times 10^6$ 個の細胞/mlで再懸濁させた。この懸濁液75  $\mu$ lを、5  $\mu$ mの細孔を有する96ウエルのCorning Transwellプレート(Costar Corning、#3388; NY, USA)の上側のコンパートメントに添加した。下側のコンパートメントでは、組み換えヒトC5a(配列番号50)またはマウスC5a(配列番号54)を、細胞の添加前に、20 ~ 30分間にわたって37°Cにおいて、235  $\mu$ lのHBH中において様々な濃度でスピーゲルマーと一緒にプレインキュベートした。細胞を37°Cで3時間遊走させた。その後、挿入プレート(上側のコンパートメント)を除去し、リン酸塩緩衝食塩水中の440  $\mu$ Mのレサズリン(Sigma、Deisenhofen、ドイツ)30  $\mu$ lを下側のコンパートメントに添加した。2.5時間にわたる37°Cでのインキュベーション後、蛍光を、544 nmの励起波長および590 nmの発光波長で測定した。

40

#### 【0297】

蛍光値を、バックグラウンドの蛍光(ウエル中にC5aなし)について補正し、スピーゲルマー濃度に対してプロットした。GraphPad Prismを使用する非線形回帰(4パラメータフィット)で、IC<sub>50</sub>値を決定した。あるいは、スピーゲルマーを含

50

まない試料 (C5aのみ) に関する値を100%に設定し、スピーゲルマーを含む試料に関する値をこのパーセントとして算出する。パーセント値をスピーゲルマー濃度に対してプロットし、IC<sub>50</sub>値を上記に記載したように決定する。

#### 【0298】

ヒトおよびマウスのC5aについての最大半量有効濃度 (EC<sub>50</sub>) の決定

様々なヒトC5aまたはマウスC5a濃度の方向へのBA/F3/C5aR細胞の3時間の遊走後、ヒトおよびマウスのC5aについての用量応答曲線を得たが、これは、huC5aについては0.1nMの半量有効濃度 (EC<sub>50</sub>) を示し、mC5aについては0.3nMの半量有効濃度 (EC<sub>50</sub>) を示した。スピーゲルマーによる走化性の阻害に関する実験のために、0.1nMのヒトC5aおよび0.3nMのマウスC5aを使用した。

10

#### 【実施例6】

#### 【0299】

C5aにより誘発される初代ヒト好中球の活性化の阻害

ヒトPMNの単離

室温での不連続勾配遠心分離により、多形核白血球 (PMN) を全血液から単離した。クエン酸デキストロス含有採血管 (Sarstedt) 中に血液を収集した。デキストラン500 (Accurate Chemical) を2重量/体積%の最終濃度まで添加し、血液/デキストランをHistopaque (1.077g/ml, Sigma) 上に積層した。遠心分離後、勾配界面上の全ての液体および細胞を破棄した。ペレットおよび上記の残存する液体の約80%超を回収し、ボルベン80体積/体積% (Fresenius Kabi)、PBS16体積/体積% (Sigma) およびACD4体積/体積% (Sigma) の混合物で1:1に希釈した。混合物を400rpmで15分にわたり遠心分離した。上清を収集し、1,000rpmで7分にわたり遠心分離した。ペレットを徐々に再懸濁させ、残存する赤血球を溶解により除去した。

20

#### 【0300】

C5aにより誘発されるヒトPMNの走化性の阻害

走化性プレート下方チャンパー中において、HBSS + 0.01% BSA + 25mM HEPES中の示した濃度のNOX-D19またはNOX-D20と共にヒトC5a (1nM) をプレインキュベートした。走化性プレート上方チャンパーにヒト好中球を添加し、37°Cおよび5%CO<sub>2</sub>で25分を超えて走化性を実施した。インキュベーション後に、Accutaseを含有する白色発光プレートに上方チャンパーを取り付け、走化性メッシュの裏面に結合した細胞を回収した。Glo試薬 (Promega) を添加し、10分にわたり平衡化した。Biotek Synergy 2プレートリーダーを使用して発光を測定した。

30

#### 【0301】

C5aにより誘発されるエラスターゼ放出のヒトPMNによる阻害

37°C、5%CO<sub>2</sub>で30分にわたり、TNF (10ng/ml) およびサイトカリンB (5μg/ml) によりヒト好中球を予備刺激した。示した濃度でNOX-D19またはNOX-D20と共にプレインキュベートしたヒトC5a (30nM) により、細胞を45分にわたり刺激した。次いで、遠心分離により細胞を分離し、25μlの上清を、Tris-HCl 0.1M pH7.4中のエラスターゼ基質 (Calbiochem) と共に37°Cで1時間にわたりインキュベートし、5分毎に405nmの吸光度で読み取りを行なった。動態データを解析し、各試料についてのv<sub>max</sub>を決定した。各試料について、対照に対するエラスターゼ活性の平均パーセントを算出した (バックグラウンドを減じていない)。

40

#### 【0302】

結果

NOX-D19およびNOX-D20は、新鮮単離したヒト末梢血PMNのC5aによる活性化を効果的に阻害する。10nMのNOX-D19またはNOX-D20は、hu

50

C5aにより誘発されるヒトPMNの走化性の85%超を遮断するのに十分であった(図13A)。huC5aにより誘発される抗菌性エラストーゼの放出は、NOX-D19およびNOX-D20により効果的に阻害された(図13B)。30nMのNOX-D19またはNOX-D20は、C5aにより誘発されるエラストーゼ放出の約50%を抑制した。注目すべきことに、化学量論的理由のために、このアッセイの感度は、エラストーゼ放出が30nMのhuC5aにより誘発される $IC_{50} = 15nM$ に制限される。

#### 【実施例7】

#### 【0303】

C5a結合性核酸は補体依存性溶血を妨げない。

補体カスケードの最終生成物は、膜侵襲複合体(MAC)であるC5b-9からなる細孔である。MACは病原体の細胞膜中に挿入され、細胞質漏出の誘発により病原体を死滅させると考えられる。

#### 【0304】

本明細書に示すC5a結合性核酸(スピーゲルマー)は、C5との関連においてC5aを認識することが分かっている(実施例1、図9および図10を参照されたい)。したがって、MACの一部である、アナフィラトキシンC5aおよびC5bへのC5の切断が、これらのスピーゲルマーにより阻害されるかどうかを調べた。このことを、補体依存性のヒツジ赤血球溶血試験を使用することによって達成した。

#### 【0305】

#### 方法

元に戻したヒト凍結乾燥血清(「ヒト補体血清」(Sigma Aldrich、ドイツ)を、96ウエルプレート(Nunc-Immuno(商標)プレート、Maxi Sorp Surface(商標))中において10nM~10,000nMの範囲のPEG化スピーゲルマーNOX-D19、NOX-D20およびNOX-D21と共にプレインキュベートした。陽性対照として、C5切断を阻害する、最大の2'OMeプリンおよび2'フルオロピリミジン置換を有するC5結合性アプタマーC5C6(Bieseckerら、1999)(インハウスで合成した)を同じ濃度範囲で使用した。アッセイでの潜在的に非特異的なスピーゲルマー効果についての対照として、NOX-D19およびNOX-D21の逆配列である逆NOX-D19および逆NOX-D21を有するPEG化スピーゲルマーを含めた。逆NOX-D19および逆NOX-D21は、Biacoreおよび細胞に基づくアッセイにおいてC5aを阻害しないことがすでに明らかであった。37°Cでの1時間のインキュベーション後、溶血系(Institut Virion/Serion GmbH、ドイツ)として知られている、ウサギ抗ヒツジ赤血球抗体でオプソニン化したヒツジ赤血球を、プレインキュベートした血清補体阻害剤混合物に添加する。C5のC5aおよびC5bへの切断をもたらす古典経路を介して補体を活性化した。次いで、C5bはC6-C9と会合して溶解性の膜侵襲複合体(MAC)を形成する。無傷細胞の沈降から30分後に、比色測定により、MAC形成に起因するヒツジ赤血球溶血を測定した。溶血の程度が高くなるほど、(Fluostarプレートリーダー中で測定した)405nmでの吸収が高くなる。

#### 【0306】

#### 結果

アプタマーC5C6は、およそ1 $\mu$ Mの $IC_{50}$ でヒツジ赤血球の補体依存性溶血を阻害した(図14A、図14B)。試験したスピーゲルマー、すなわちC5およびC5a結合性核酸NOX-D19およびNOX-D20(図14A)およびNOX-D21(図14B)ならびにC5またはC5a非結合性スピーゲルマーである逆NOX-D19(図14A)および逆NOX-D21(図14B)は溶血を阻害しなかった。

#### 【0307】

#### 考察

試験したC5a結合性スピーゲルマーはMAC形成を阻害しないことが明らかとなり、したがって、試験したC5a結合性スピーゲルマーはC5aのみの選択的アンタゴニスト

10

20

30

40

50

である。医薬品として使用される場合、このことは有利であることができ、なぜならば、M A C 形成の阻害は、侵入する病原体、主にグラム陰性細菌に対する身体の防御機構を損なう可能性があるからである。

#### 【実施例 8】

#### 【0308】

C 5 a 結合性核酸分子 N O X - 1 9 は、複数菌による敗血症に関するマウスの盲腸結紮穿孔モデルにおいて効能を示す。

複数菌による敗血症の経過における N O X - D 1 9 の腹腔内注射の効果を、齧歯動物の盲腸結紮穿孔 ( C L P ) モデルで試験した。

#### 【0309】

方法

動物モデル

10 ~ 12 週齢の雄 C 5 7 B L / 6 マウス ( C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s 、ドイツ) を本研究に使用した。軽いイソフルラン ( i s o f l u r a n ) 麻酔下で、腹膜炎を外科的に誘発させた。腹腔の左上腹部 ( 盲腸の正常な位置 ) を切開した。盲腸を露出させ、盲腸の周囲に結紮糸をきつく巻き、小腸の挿入より遠位で縫合した ( 7 5 % を結紮した ) 。 2 4 ゲージ針によって盲腸に 1 つの穿孔創を形成し、少量の盲腸内容物を穿孔創から押し出した。盲腸を腹腔中に戻し、開腹部位を塞いだ。 5 0 0  $\mu$  l の生理食塩水を補液として皮下注射した。盲腸の結紮および穿孔を除いて、偽動物に同じ手順を施した。最後に、動物を、食料および水に自由にアクセスできるケージに戻した。

#### 【0310】

研究群

以下の 4 つの群 ( 偽手術に関して  $n = 6$  のマウスおよび C L P 手術に関して群当たり  $n = 10$  のマウス ) を試験した : ( 1 ) ビヒクル ( 生理食塩水 ) 処理を伴う偽手術、 ( 2 ) ビヒクル処理を伴う C L P 手術、 ( 3 ) 低用量の N O X - D 1 9 ( 1 m g / k g ) 処理を伴う C L P 手術、および ( 4 ) 高用量の N O X D 1 9 ( 1 0 m g / k g ) 処理を伴う C L P 手術。研究者らは処理戦略を把握しておらず、どの化合物がビヒクルまたは本物 ( v e r u m ) を含有するか分からなかった。投与ルートは、C L P 手術時から始まり 6 日にわたって毎日、腹腔内であった。

#### 【0311】

生存期間

経過観察は各群において 7 日であった。マウスを毎日モニタリングし、G r a p h P a d P r i s m 4 ソフトウェアを使用してカプランマイヤー生存曲線を生成した。

#### 【0312】

採血

手術前 ( ベースライン、 - 4 日 ) および手術後 1 日目に、毛細管により海綿静脈洞から軽いエーテル麻酔下で血液試料を得て、急性腎傷害 ( 血清クレアチニンおよび血液尿素窒素、B U N ) および急性肝不全 ( 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ、血清 A L T ) の通常の血清マーカーを測定した。多臓器不全のマーカーとして、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ ( 血清 A S T ) の血清中のレベルを測定した。臨床化学パラメータの測定を O l y m p u s 分析器 ( A U 4 0 0 ) 上で実施した。

#### 【0313】

統計

スチューデントの T 検定により統計的有意性を算出した。生存期間に関して、カプランマイヤー曲線を生成し、有意性に関するログランク検定を実施した。G r a p h P a d P r i s m 4 ソフトウェアを使用した。

#### 【0314】

結果

生存期間

10

20

30

40

50

予想したように、CLPを伴わない偽手術を施した動物は死亡しなかった(図15)。CLP手術したマウスおよびビヒクルのみで処理したマウスでは、生存期間中央値は1.5日であり、CLP手術後のNOX-D19処理により生存期間中央値が改善された(図15)。低用量のNOX-D19(1mg/kg)で処理したマウスは、最長の生存期間中央値を示した(5日、ビヒクルに対して $p < 0.0001$ )。高用量のNOX-D19(10mg/kg)で処理したマウスは、ビヒクル処理マウス( $p = 0.0401$ )に比べて有意に長いが高用量のNOX-D19処理( $p = 0.4875$ )と有意差がない3日の生存期間中央値を有した。100%のビヒクルマウスがCLP手術後4日以内に死亡した。低用量のNOX-D19および高用量のNOX-D19それぞれで処理したマウスでは、7日までに死亡率は100%および90%になっていなかった(図15)。

10

## 【0315】

## 臨床化学

## 腎機能

血清クレアチニンおよび血液尿素窒素(BUN)濃度は腎機能に関するパラメータである。研究の開始前(-4日)およびCLP手術後1日目に腎機能の評価した。1日までに、CLPは、ビヒクル処理マウスにおける血清クレアチニンレベルの有意な増加を誘発した。低用量のNOX-D19処理(1mg/kg)により、この増加が予防された(図16A)。高用量のNOX-D19(10mg/kg)で処理されたマウスでは、血清クレアチニンレベルの中程度ではあるが統計的に有意ではない増加を観察した(ビヒクルに対して $p = 0.1873$ )(図16A)。

20

## 【0316】

クレアチニンに比べて敏感な腎機能のパラメータであるBUN(図16B)は、ビヒクル処理マウスにおいて、CLP手術後1日目に有意に増加した。低用量のNOX-D19および高用量のNOX-D19で処理したマウスでは、CLPによるBUNの増加が有意に抑制された(図16B)。

## 【0317】

## 肝機能

肝臓細胞の損傷または壊死の最も確実なマーカーは、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(血清ALT)である。全ての群が、CLP手術後1日目に血清ALTの増加を示した。しかし、NOX-D19処理した敗血症マウスの両方の群は、ビヒクル処理したマウスと比べて肝機能の改善を実証した(図17A)。

30

## 【0318】

## 多臓器不全

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの血清レベル(血清AST)(図17B)を多臓器不全のマーカーとして測定した。なぜならば、ASTは、心筋梗塞、急性膵炎、急性溶血性貧血、重度の熱傷、急性腎臓疾患、筋骨格系疾患および外傷等の、肝臓以外の臓器に影響を及ぼす疾患で上昇することが明らかになっているからである。ALTと同様に、全ての群は、CLP手術後1日目にASTレベルの上昇を示した(偽に対して $p < 0.001$ )。しかし、肝機能と同様に、NOX-D19処理した敗血症マウスの両方の群は、ビヒクル処理したマウスと比べてあまりはっきりとしないASTレベルを実証した(図17B)。

40

## 【実施例9】

## 【0319】

改善されたC5a結合性核酸NOX-D20は、複数菌による敗血症に関するマウスの盲腸結紮穿孔モデルにおいて効能を示す。

複数菌による敗血症の経過におけるNOX-D20の腹腔内注射の効果、齧歯動物の盲腸結紮穿孔(CLP)モデルで試験した。

## 【0320】

## 方法

## 動物モデル

50

実施例 8 に記載したように、複数菌による敗血症を、盲腸の 60 ~ 75 % が結紮されている 10 ~ 12 週齢の雄 C57BL/6 マウス (Charles River Laboratories、ドイツ) に誘発させた。

#### 【0321】

##### 生存期間

経過観察は各群において 7 日であった。マウスを毎日モニタリングし、GraphPad Prism 4 ソフトウェアを使用してカプランマイヤー生存曲線を生成した。

#### 【0322】

##### 研究群

以下の 5 つの群 (偽手術に関して  $n = 6$  のマウスおよび CLP 手術に関して群当たり  $n = 10$  のマウス) を試験した: (1) ビヒクル (生理食塩水) 処理を伴う偽手術、(2) ビヒクル処理を伴う CLP 手術、(3) 毎日の低用量の NOX-D20 (1 mg/kg) 処理を伴う CLP 手術、(4) 毎日の高用量の NOX-D20 (3 mg/kg) 処理を伴う CLP 手術、および (5) 手術後に単回の低用量の NOX-D20 (1 mg/kg)、続いて毎日のビヒクル処理を伴う CLP 手術。研究者らは処理戦略を把握しておらず、どの化合物がビヒクルまたは本物を含有するか分からなかった。投与ルートは腹腔内であった。

#### 【0323】

##### 臨床化学および炎症パラメータ

手術後 1 日目に、毛細管により海綿静脈洞から軽いエーテル麻酔下で実施例 8 に記載したように血液試料を得た。急性腎傷害 (血清クレアチニンおよび血液尿素窒素、BUN)、急性肝不全 (血清 ALT) および内皮損傷 (血清乳酸脱水素酵素、血清 LDH) の通常の血清マーカーを測定した。3 ml の PBS を使用して腹腔洗浄 (PL) を実施した。各試料において PL の収集量を測定し、血球計 (Neubauer Zählkammer、Gehrden、ドイツ) を使用して全細胞数を評価した。腫瘍壊死因子アルファ (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-6 (IL-6) および CCL2 (=マクロファージ走化タンパク質-1、MCP-1) の血清レベルおよび PL レベルをビーズベースのフローサイトメトリーアッセイ (CBA キット、BD Biosciences、Heidelberg、ドイツ) により定量化した。CXCL1 (=ケラチノサイト化学誘因物質、KC) および CXCL2 (=マクロファージ炎症性タンパク質 2、MIP-2) の血清濃度および PL 濃度を、ELISA (R&D Systems、Wiesbaden、ドイツ) により測定した。ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 染色サイトスピン (サイトスピン 4、Thermo Scientific) 上で、PL における差分細胞計数を実施した。

#### 【0324】

##### 毛細血管漏出

CLP 手術直後に、0.25 重量/体積%のエバンスブルー (200  $\mu$ l) を静脈注射した。18 時間後にマウスを屠殺し、上記に記載したように PL を実施した。血清流体および PL 流体におけるエバンスブルー染料の濃度を 620 nm で分光光学的に測定した。ヘム色素の混入のために、以下の式を使用して光学濃度を補正した:  $E_{620}(\text{補正}) = (E_{620}(\text{未加工}) - (E_{405}(\text{未加工}) \times 0.014))$ 。PL 流体中における消光と血漿中における消光との比率として血漿滲出を定量化した。

#### 【0325】

##### 統計

一元 ANOVA および Dunnett's 検定により統計的有意性を算出した。生存期間に関して、有意性に関するログラंक検定を実施した。GraphPad Prism 4 ソフトウェアを使用した。

#### 【0326】

##### 結果

##### 生存期間

10

20

30

40

50

予想したように、偽手術したマウスは手術後7日以内に死亡しなかった(図18)。ビヒクル処理したCLPマウスでは、生存期間中央値は3日であった。1mg/kgのNOX-D20で毎日処理したマウスでは、生存期間中央値が7日に有意に延びた(ビヒクルに対して $p = 0.0043$ )。NOX-D20の投与量を3mg/kgに増加させても、さらなる保護効果はなく、生存期間中央値は同様に6.5日であった(ビヒクルに対して $0.0092$ )。特に、CLP手術後の1mg/kgのNOX-D20の単回注射は毎日の処理と同じように効果的であり、生存期間中央値が6.5日に有意に延びた(図18)。ビヒクル処理したマウスの100%が5日以内に死亡するが、NOX-D20で処理したマウスの30~40%は7日目において実験の終了時に依然として生存した(図18)。

10

### 【0327】

#### 臓器機能

全身性炎症は多臓器不全を起こすことが多い。クレアチニンおよびBUNの血清レベルの増加は、糸球体ろ過率の低下および腎不全に関するパラメータである。両方のパラメータは、偽マウスと比べて、CLP手術後1日に、ビヒクル処理したマウスにおいて有意に増加した。NOX-D20処理により両方のマーカーの増加が効果的に防止され、このことは腎機能に関するNOX-D20の保護効果を示唆した(図19A、図19B)。アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)は肝臓細胞の損傷および壊死の一般的なマーカーであり、CLPにより誘発された敗血症は、ALTの血清レベルの増加と関連した。NOX-D20処理したマウスは、ビヒクル処理したマウスと比べて血清ALTの有意な低下を実証し、このことは肝機能の改善を示唆した(図19C)。乳酸脱水素酵素(LDH)の血清レベルの上昇は組織傷害後に起こり、したがって臓器不全の一般的なマーカーである。CLPによって引き起こされるLDHレベルの上昇は、NOX-D20により効果的に遮断された(図20A)。内皮バリアの崩壊および浮腫形成は、敗血症で通常の致命的事象である。偽手術したマウスと比べて、ビヒクル処理において、敗血症の誘発により、関連する血漿タンパク質の腹腔腔中への溢出が2倍に増加した。NOX-D20処理により毛細血管漏出が有意に阻害された(図20B)。本明細書で試験した全てのパラメータに関して、1mg/kgのNOX-D20は、臓器機能を有意に改善するのに十分であり、このことは、NOX-D20処理したマウスの生存期間の改善に反映される。

20

### 【0328】

#### 炎症

CLPにより、炎症促進性のサイトカインおよびケモカインの強局在のおよび全身の上方制御がもたらされた。NOX-D20によるC5aの遮断より、CLP後1日目において、腹膜および血清中のTNF、IL-6、CCL2、CXCL1およびCXCL2の濃度が効果的に低下した。これらのケモカインの上方制御は、多形核白血球(PMN)の腹膜への動員と関係する。したがって、NOX-D20によるC5a-阻害によって、腹腔腔中でのPMNの蓄積が阻害された(図20C)。同様に、NOX-D20によって単球の浸潤が遮断された。

30

### 【実施例10】

### 【0329】

虚血再灌流により誘発される急性腎傷害のモデルにおけるNOX-D21の効能

腎虚血/再灌流損傷(IRI)の齧歯動物モデルにおいて、急性腎傷害(AKI)についてのNOX-D21の効果を試験した。

40

### 【0330】

#### 方法

#### 動物モデル

鼻マスクによってインフルランを使用し、12~15週齢の雄C57BL/6マウス(Charles River、ドイツ)に麻酔をかけ、暖房テーブル上に仰向けに寝かせて体温を約32°Cに維持した。正中線切開を実施し、30分にわたりマイクロ動脈瘤クリップで右および左の腎茎を挟んだ。クリップの除去および皮膚の縫合後にマウスをケー

50

ジに戻し、完全に目が覚めるまでモニタリングした。

【0331】

研究群

以下の3つの群(群当たりn = 10のマウス)を試験した:(1)ビヒクル処理を伴うIRI手術、(2)低用量のNOX-D21(1mg/kg)処理を伴うIRI手術、(3)高用量のNOX-D21(10mg/kg)処理を伴うIRI手術。研究者らは処理戦略を把握しておらず、どの化合物がビヒクルまたは本物を含有するか分からなかった。NOX-D21を0日目において手術前に1時間点滴し、次の3日の間(1日目~3日目)、NOX-D21を1日に1回、腹腔内に投与した。

【0332】

生存期間

14日にわたり毎日マウスをモニタリングした。カプランマイヤー生存曲線を生成し、GraphPad Prism4ソフトウェアを使用してログランク検定により有意性を決定した。

【0333】

結果

高NOX-D21での処理によって、生存期間が有意に改善された(図21)。低用量のNOX-D21処理では、生存期間はまだ統計的に有意に改善されないことは明らかだった。ビヒクルのみで処理した対照群では、1匹のマウスが14日まで生存した。NOX-D21処理により、生存しているマウスの割合が45~55%に増加した(図21)。

【0334】

参考文献

本明細書に列挙した文献の完全な書誌データを以下に示す。これらの開示は、別段の記載がない限り、参照により組み込まれている。

10

20

## 【表 2 A】

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.
- 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.* 25(17):3389-402.
- Arumugam TV, Shiels IA, Strachan AJ, Abbenante G, Fairlie DP, Taylor SM (2003) A small molecule C5a receptor antagonist protects kidneys from ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 63(1): 134-142 10
- Arumugam TV, Woodruff TM, Stocks SZ, Proctor LM, Pollitt S, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM (2004) Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol* 40(6): 934-941
- Bergh K, Iversen OJ, Lysvand H. (1993). Surprisingly high levels of anaphylatoxin C5a des Arg are extractable from psoriatic scales. *Arch Dermatol Res* 285(3):131-134.
- Biesecker G, Dihel L, Enney K, Bendele RA (1999) Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5. *Immunopharmacology* 42(1-3): 219-230. 20
- Bonifati DM, Kishore U. (2007) Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* 44(5): 999-1010.
- Bosmann M, Ward PA (2012) Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis. *Adv Exp Med Biol* 946: 147-159
- Breivik T, Gundersen Y, Gjermo P, Taylor SM, Woodruff TM, Opstad PK (2011) Oral treatment with complement factor C5a receptor (CD88) antagonists inhibits experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 46(6): 643-647 30
- Chen M, Daha MR, Kallenberg CG (2010) The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* 34(3): J276-286
- Copland DA, Hussain K, Baalasubramanian S, Hughes TR, Morgan BP, Xu H, Dick AD, Nicholson LB (2010) Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol* 159(3): 303-314
- Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA (1999) Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5(7): 788-792 40
- Damha MJ and Ogilvie KK, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 Protocols for oligonucleotides and analogs, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. (1993)
- Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA (1999) Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5(7): 788-792

## 【表 2 B】

- Czermak BJ, Sarma V, Pierson CL, Warner RL, Huber-Lang M, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA (1999) Protective effects of C5a blockade in sepsis. *Nat Med* 5(7): 788-792
- Damha MJ and Ogilvie KK, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 Protocols for oligonucleotides and analogs, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. (1993)
- Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M (2011) New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med* 17(3-4): 317-329 10
- Farkas I, Baranyi L, Liposits ZS, Yamamoto T, Okada H (1998) Complement C5a anaphylatoxin fragment causes apoptosis in TGW neuroblastoma cells. *Neuroscience* 86(3): 903-911
- Fernandez HN, Hugli TE (1978) Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. *J Biol Chem* 253(19): 6955-6964 20
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Day DE, Zetoune FS, Sarma JV, Huber-Lang MS, Ward PA (2008) Functions of the complement components C3 and C5 during sepsis. *FASEB J* 22(10): 3483-3490
- Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, LaFerla FM, Taylor SM, Woodruff TM, Tenner AJ (2009) Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol* 183(2): 1375-1383
- Gueler F, Rong S, Gwinner W, Mengel M, Brocker V, Schon S, Greten TF, Hawlisch H, Polakowski T, Schnatbaum K, Menne J, Haller H, Shushakova N (2008) Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 19(12): 2302-2312 30
- Heller T, Hennecke M, Baumann U, Gessner JE, zu Vilsendorf AM, Baensch M, Boulay F, Kola A, Klos A, Bautsch W, Kohl J. (1999) Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 163(2):985-994.
- Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socie G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 110(12):4123-8 40
- Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R, Curnutte JT, Ward PA (2001) Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 166(2): 1193-1199

## 【表 2 C】

- Huber-Lang MS, Younkin EM, Sarma JV, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA (2002) Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis. *J Immunol* 169(6): 3223-3231
- Jacob A, Hack B, Bai T, Brorson JR, Quigg RJ, Alexander JJ (2010a) Inhibition of C5a receptor alleviates experimental CNS lupus. *J Neuroimmunol* 221(1-2):46-52
- Jacob A, Hack B, Chiang E, Garcia JG, Quigg RJ, Alexander JJ (2010b) C5a alters blood-brain barrier integrity in experimental lupus. *FASEB J* 24(6):1682-8 10
- Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, Rafail SS, Theodorou V, Konstantonis D, Kourtzelis I, Doumas MN, Magotti P, Deangelis RA, Lambris JD, Ritis KD (2008) C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 180(11): 7368-7375
- Khan MA, Jiang X, Dhillon G, Beilke J, Holers VM, Atkinson C, Tomlinson S, Nicolls MR (2011) CD4+ T cells and complement independently mediate graft ischemia in the rejection of mouse orthotopic tracheal transplants. *Circ Res* 109(11): 1290-1301 20
- Kirschfink M. (1997) Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology* 38(1-2):51-62.
- Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* 46(14): 2753-2766
- Klussmann S. (2006). "The Aptamer Handbook – Functional Oligonucleotides and their Applications." Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2
- Kohl J. (2001) Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Mol Immunol* 38(2-3):175-187. 30
- Kusser W (2000). *J Biotechnol* 74:27-38
- Laudes IJ, Chu JC, Sikranth S, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann N, Sarma JV, Schmaier AH, Ward PA (2002) Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am J Pathol* 160(5): 1867-1875
- Lewis AG, Kohl G, Ma Q, Devarajan P, Kohl J. (2008) Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clin Exp Immunol* 153(1): 117-126. 40
- Li K, Wang N, Peng Q, Lu B, Ma L, Lambris JD, Sacks S, Zhou W (2012) C5a/C5aR signaling is an important negative regulator of murine nature killer cell homeostasis and effector function. *Immunobiology* 217(11): 1146
- Makrides SC. (1998) Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev* 50(1):59-87.

## 【表 2 D】

- Manderson AP, Botto M, Walport MJ. (2004) The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 22: 431-456
- Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, Ricklin-Lichtsteiner SK, Koutoulaki A, Gerard C, Coukos G, Lambris JD (2008) Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol.*(11):1225-35
- 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. 10
- Min X, Wei L, Li Z, Sacks S, Zhou W, Li K (2012) Negative regulation of human nature killer cells by complement. *Immunobiology* 217(11): 1189
- Muller-Ladner U, Jones JL, Wetsel RA, Gay S, Raine CS, Barnum SR. (1996) Enhanced expression of chemotactic receptors in multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 144(1-2):135-141.
- 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. 20
- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2328-2333
- Ostrand-Rosenberg S (2008) Cancer and complement. *Nat Biotechnol.* 26(12):1348-9.
- Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, Min-oo G, Gowda DC, Sarma JV, Rittirsch D, Ward PA, Liles WC, Gros P, Kain KC (2008) C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med* 205(5): 1133-1143
- Pearson & Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 30
- Piccolo MT, Wang Y, Sannomiya P, Piccolo NS, Piccolo MS, Hugli TE, Ward PA, Till GO. (1999) Chemotactic mediator requirements in lung injury following skin burns in rats. *Exp Mol Pathol* 66(3):220-226.
- Ricklin D, Lambris JD. (2007) Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 25(11): 1265-1275
- Riley RD, Sato H, Zhao ZQ, Thourani VH, Jordan JE, Fernandez AX, Ma XL, Hite DR, Rigel DF, Pellas TC, Peppard J, Bill KA, Lappe RW, Vinten-Johansen J. (2000) Recombinant human complement C5a receptor antagonist reduces infarct size after surgical revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120(2):350-358. 40
- Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, Zetoune FS, Gerard NP, Cianflone K, Kohl J, Gerard C, Sarma JV, Ward PA (2008) Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med* 14(5): 551-557

## 【表 2 E】

- Sim RB, Laich A. (2000) Serine proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 28(5):545-550.
- Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Sprong T, Brandtzaeg P, Fung M, Pharo AM, Hoiby EA, Michaelsen TE, Aase A, van der Meer JW, van Deuren M, Mollnes TE (2003) Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis. *Blood* 102(10): 3702-3710 10
- Tokodai K, Goto M, Inagaki A, Nakanishi W, Ogawa N, Satoh K, Kawagishi N, Sekiguchi S, Nilsson B, Okada N, Okada H, Satomi S (2010) Attenuation of cross-talk between the complement and coagulation cascades by C5a blockade improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Transplantation* 90(12): 1358-1365
- van der Pals J, Koul S, Andersson P, Gotberg M, Ubachs JF, Kanski M, Arheden H, Olivecrona GK, Larsson B, Erlinge D (2010) Treatment with the C5a receptor antagonist ADC-1004 reduces myocardial infarction in a porcine ischemia-reperfusion model. *BMC Cardiovasc Disord* 10:45 20
- Venkatesan N, Kim SJ, Kim BH (2003) Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides. *Curr Med Chem* 10(19): 1973-1991
- Wagner E, Frank MM (2010) Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov* 9(1): 43-56
- Walport MJ. (2001a) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14):1058-1066.
- Walport MJ. (2001b) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344(15):1140-1144.
- Wang Y. (2006) Complementary therapies for inflammation. *Nat Biotechnol* 24(10): 1224-1226 30
- Ward PA (2010a) The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *J Innate Immun* 2(5): 439-445
- Ward PA (2010b) Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorldJournal* 10: 2395-2402
- Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, and Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 23:2677-2684.
- Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. (2003) A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 171(10):5514-5520. 40
- Woodruff TM, Strachan AJ, Dryburgh N, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. (2002) Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 46(9):2476-2485.

【表 2 F】

Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. (1998) The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 47(5): 201-210.

Zheng X, Zhang X, Feng B, Sun H, Suzuki M, Ichim T, Kubo N, Wong A, Min LR, Budohn ME, Garcia B, Jevnikar AM, Min WP (2008) Gene silencing of complement C5a receptor using siRNA for preventing ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 173(4): 973-980

10

【 0 3 3 5 】

本明細書に開示した本発明の特徴、特許請求の範囲、配列表および/または図面は、別個にも、それらを任意に組み合わせても、本発明をその種々の形態として実現するための材料となり得る。

【 図 1 】

名前	配列番号	配列: 5' -3'	KD [nM]
			mC5a
			huC5a
274-B5-002	001	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	3.5
274-D5-002	002	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	2.2
274-C8-002	003	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.9
274-C8-002-G14 (=NOX-D19001)	004	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.3
274-CS-002	005	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.3
274-G6-002	006	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	1.0
274-H6-002	007	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	未決定

G, C, U および A のいずれか又は、'G' 以外の材料で、 で縁取られている材料は、C5a 結合モチーフを示す;  
 KD: スピーグアルマー(L-核糖)の解離定数 K<sub>d</sub>。示した配列の分子を、共有結合的に固定化したヒト C5a(huC5a)またはマウス C5a(mC5a)への直接結合を使用して Biacore 上での表面プラズモン共鳴として測定したスピーグアルマー(L-核糖)として試験した

図 1

【 図 2 】

名前	配列番号	配列: 5' -3'	KD [nM]
			huC5a
NOX-D19001	004	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	1.38
NOX-D19001-D09	008	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.71
NOX-D19001-D16	009	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	1.03
NOX-D19001-D17	010	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.91
NOX-D19001-D30	011	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.77
NOX-D19001-D32	012	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.92
NOX-D19001-D40	013	gcccuc <u>g</u> auuguguguguaaggguuuggggugugcagccgca <u>gagcc</u>	0.88

G, C, U および A のいずれか又は、'G' 以外の材料である;  
 dG, dC, dU および dA のいずれか又は、  
 2'-デオキシリボヌクレオチド(脱氧リボヌクレオチド)である;

で縁取られている材料は、C5a 結合モチーフを示す;  
 KD: スピーグアルマー(L-核糖)の解離定数 K<sub>d</sub>。示した配列の分子を、共有結合的に固定化したヒト C5a(huC5a)への直接結合を使用して Biacore 上での表面プラズモン共鳴として測定したスピーグアルマー(L-核糖)として試験した

図 2



【 図 5 】

名前	配列番号	配列: 5'-3'	KD [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]
NOX-D19001-020	55	GCCTAGTGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	1.13	9.4
1 個の RNA から DNA への置換:				
NOX-D19001-1xDNA-020	56	GCTATGATGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	1.34	3
2 個の RNA から DNA への置換:				
NOX-D19001-2xDNA-020	57	GCTATGATGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	0.73	2.2
3 個の RNA から DNA への置換:				
NOX-D19001-3xDNA-020	58	GCTATGATGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	0.91	3.7
NOX-D19001-2dU-1dC-020 (=NOX-D21001)	59	CCCTAGTGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	0.82	0.6
4 個の RNA から DNA への置換:				
NOX-D19001-3dU-1dC-020	60	GCTATGATGGTGGTGAAGGGGUGUUGGGUGUUGGACGACGCC	0.87	0.6

G, C, U および A のいずれかは、塩基配列である;  
 で線画されている材料は、C5a 結合モチーフを示す;  
 KD: スピーグアルマー(L-核酸)の解離定数 K<sub>d</sub>、示した配列の分子を、共有配対的に固定化したヒト C5a(huC5a)への直接結合を、Biacore 上での表面プラズモン共振として測定したスピーグアルマー(L-核酸)として試験した  
 IC<sub>50</sub>: スピーグアルマー(L-核酸)の 50%阻害濃度(IC50)、示した配列の分子を、C5a を阻害するための細胞培養 in vivo 走査アッセイにおけるスピーグアルマーとして試験した

【 図 7 】

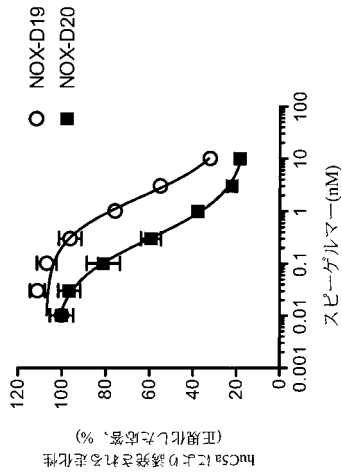


図 7

【 図 6 】

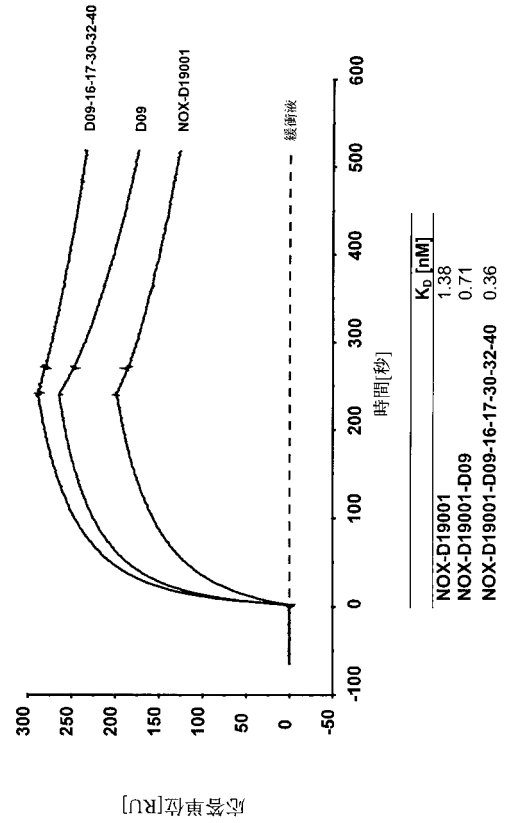


図 5

図 6

【 図 8 - 1 】

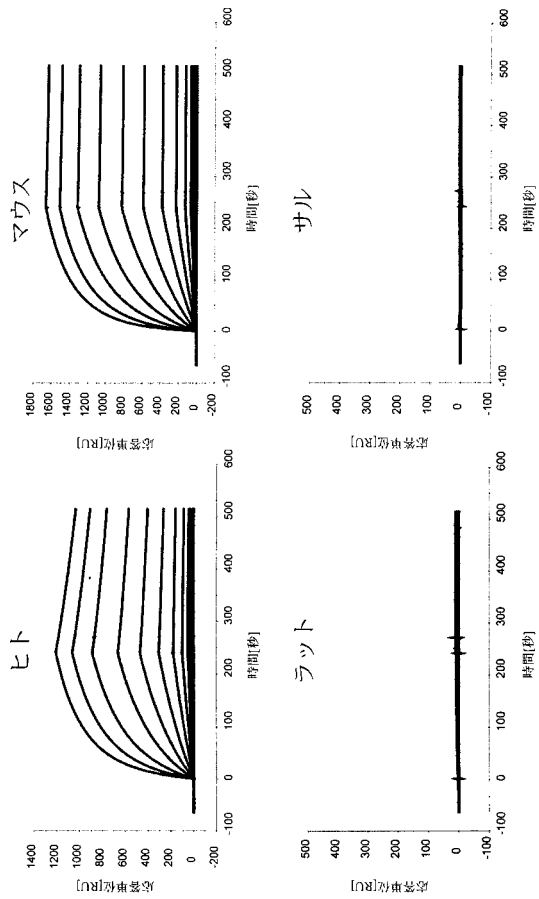


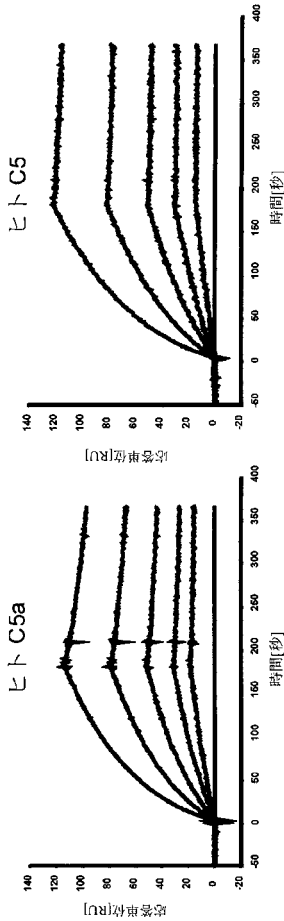
図 8

【 図 8 - 2 】

に結合する NOX-D20:	K <sub>D</sub> [pM]
マウス C5a	19.1
ヒト C5a	299
ラット C5a	--
アカゲザル C5a	--

図 8 続き

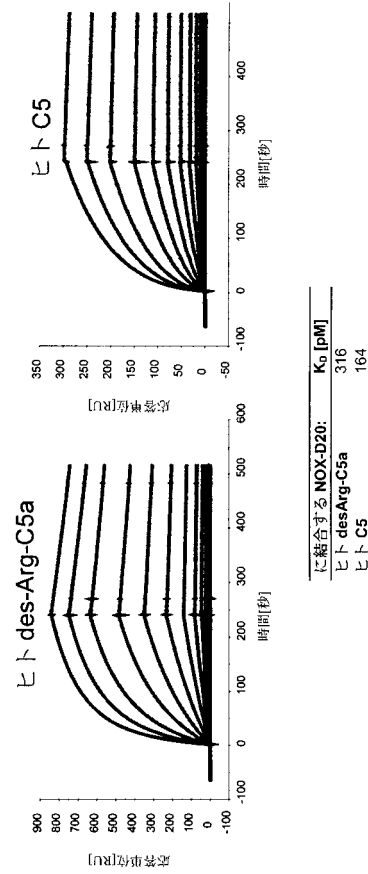
【 図 1 0 】



に結合する NOX-D21:	K <sub>D</sub> [pM]
ヒト C5a	815
ヒト C5	413
ヒト des-ArgC5a	854
マウス C5a	29.4
マウス des-ArgC5a	27.6

図 10

【 図 9 】



に結合する NOX-D20:	K <sub>D</sub> [pM]
ヒト desArg-C5a	316
ヒト C5	164

図 9

【 図 1 1 】

選択した種由来の C5a のアラインメント

ヒト: TLOKLEIEIAAKYKHSVVKCCYDGDACVNNDETCEORAAKISLGFRCIKAFTECCVVASQLRANISHKDMOLGR  
 [配列番号 050]  
 アカゲザル: MLOEKTEIAAKYKHLVVKCCYDGVFINHDETCERAAKISLVGPRCVAFTECCVVASQLRANNSHKDLQIGR  
 [配列番号 054]  
 マウス: NLHLLRQKTEEQAAKYKHSYFPAKCCYDGDARVNFVETCEERVAARVTIGPLCIRAFNECCTIANKIRKESPHKPFVQIGR  
 [配列番号 052]  
 ラット: DLQLLHQKVEEQAAKYHRVFKCCYDGDARENKVFETCEQRVARVVTIGPHCTIRAFNECCTIADKIRKESHHKQMLLGR  
 [配列番号 051]

図 11

【 図 1 2 A - 1 2 B 】

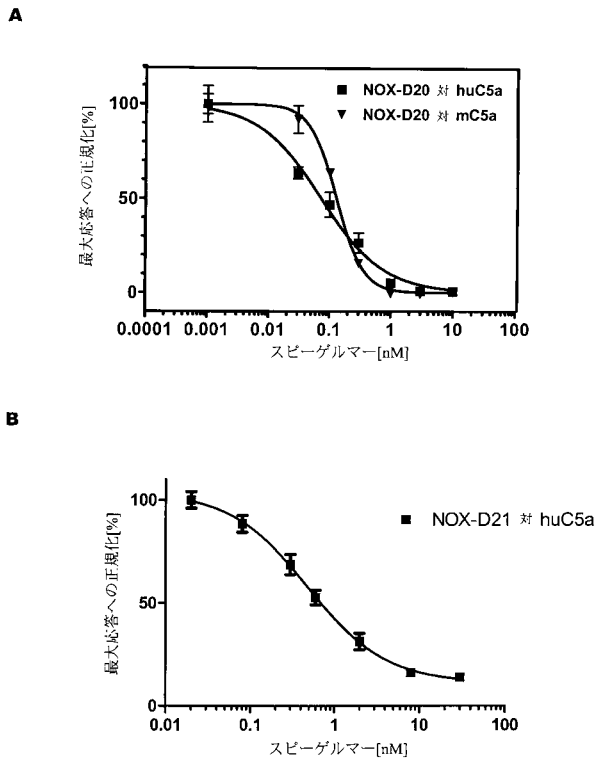


図 12

【 図 1 3 】

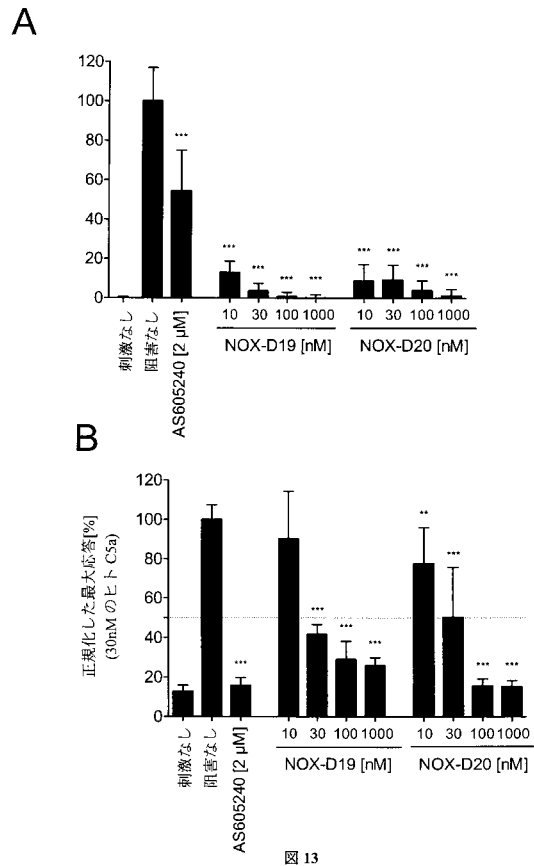


図 13

【 図 1 4 】

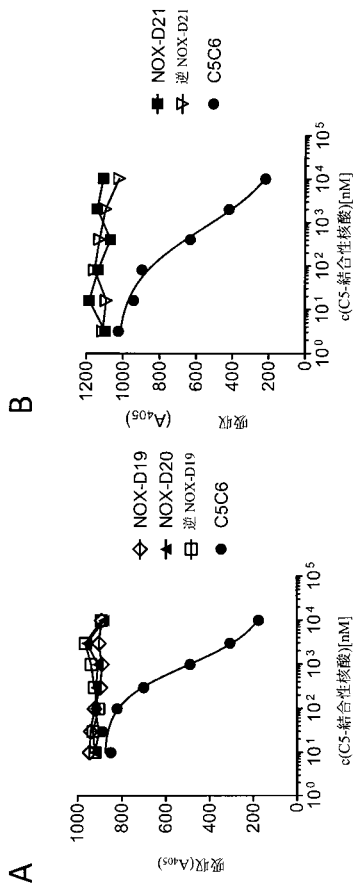


図 14

【 図 1 5 】

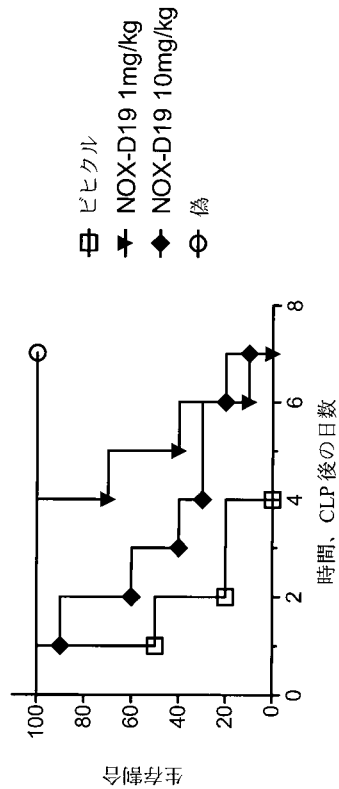


図 15

【 図 16 】

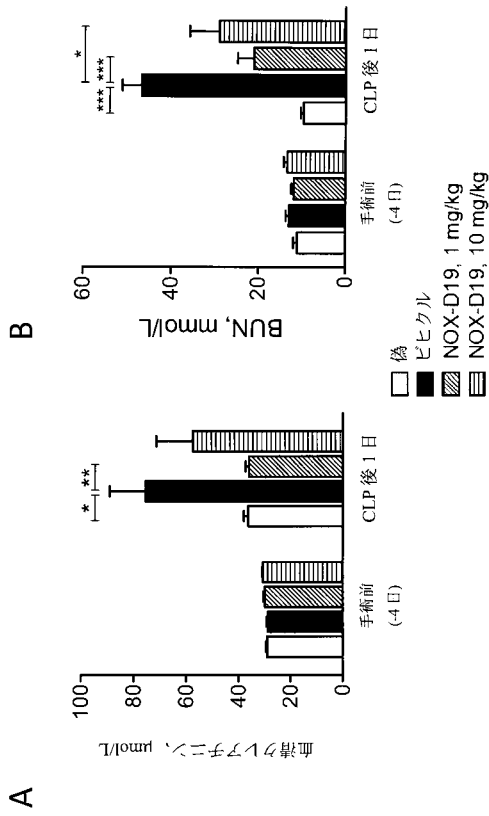


図 16

【 図 17 】

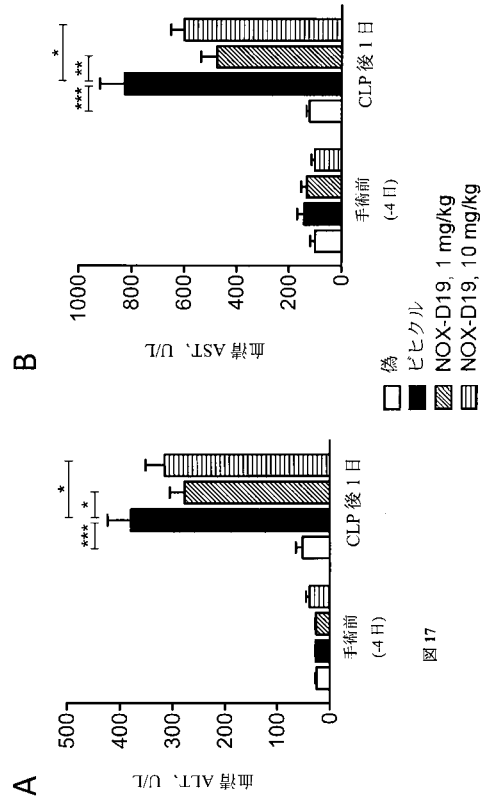


図 17

【 図 18 】

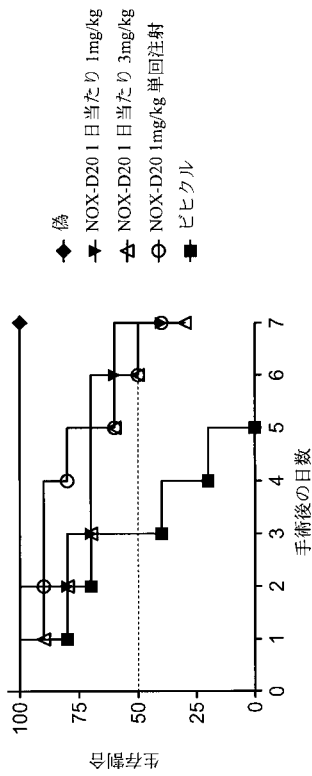


図 18

【 図 19 】

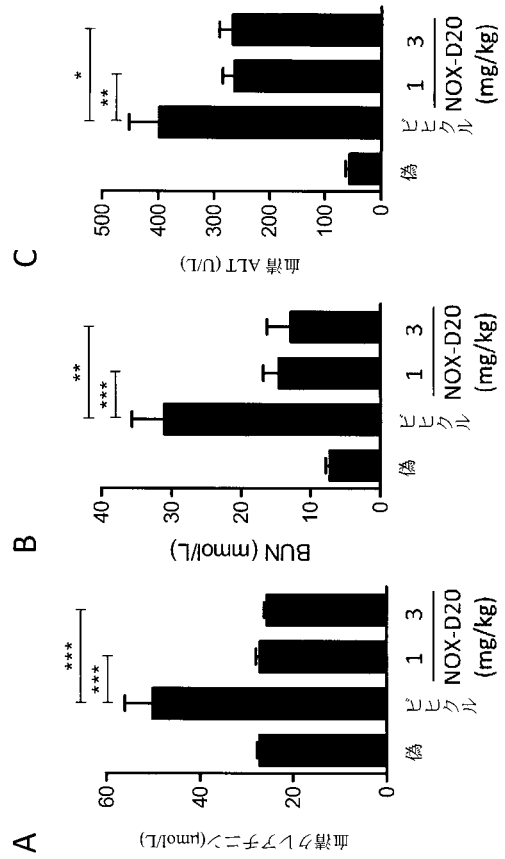


図 19

【 図 2 0 】

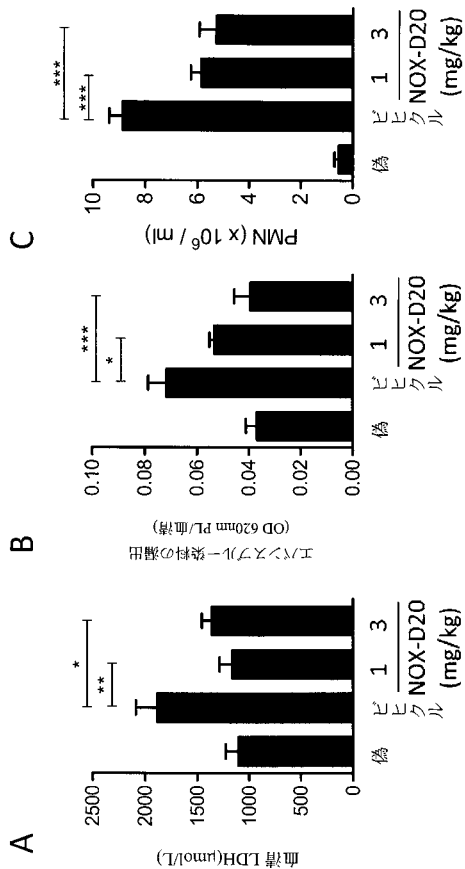


図 20

【 図 2 1 】

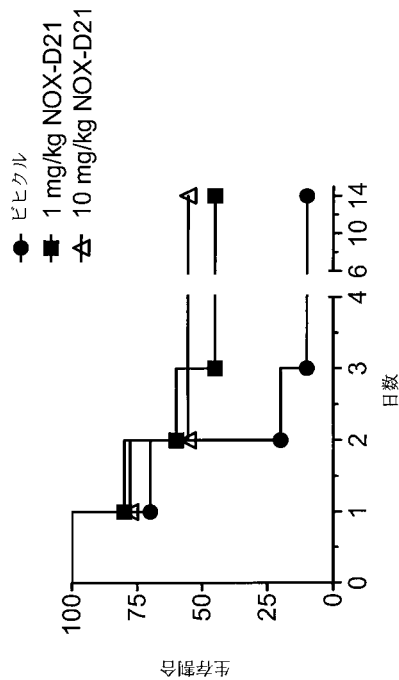


図 21

【 図 2 2 】

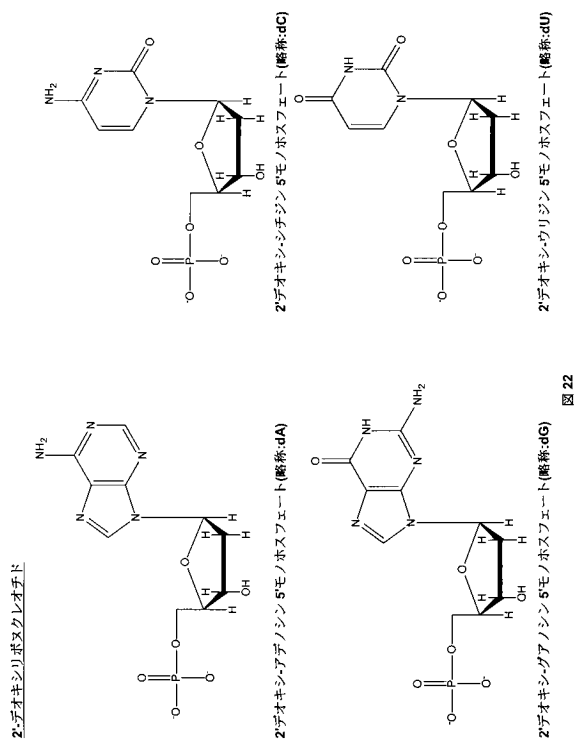


図 22

【 図 2 3 】

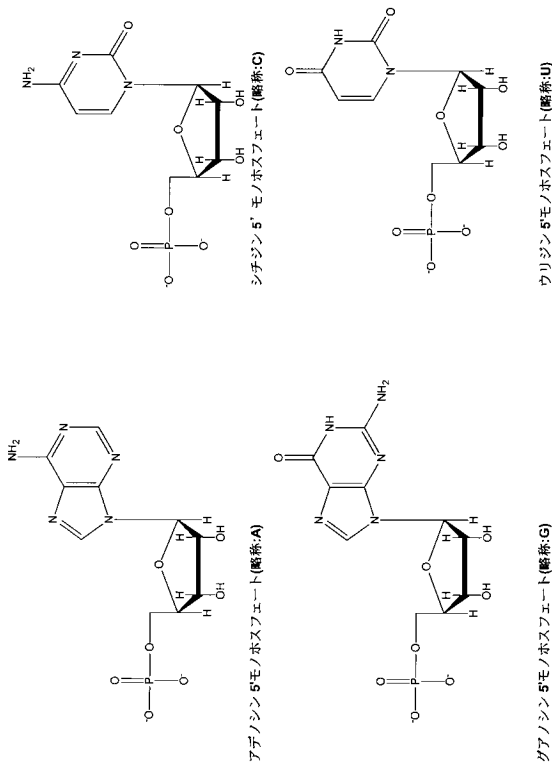


図 23

2'-デオキシリボスクレオチド

リボスクレオチド

グアノシン 5'-ホスフェート (糖糸-G)

ウリジン 5'-ホスフェート (糖糸-U)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/000056
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/115 A61K31/7088 A61P29/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VATER A ET AL: "Identification and characterisation of C5a-inhibiting biostable aptamers", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 47, no. 13, August 2010 (2010-08), page 2290, XP027120376, ISSN: 0161-5890 [retrieved on 2010-07-03] the whole document	1-54
Y	WO 99/41271 A1 (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC [US]) 19 August 1999 (1999-08-19) examples 3,8	1-54
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  16 April 2013		Date of mailing of the international search report  24/04/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bucka, Alexander

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/000056

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EATON B E ET AL: "Post SELEX combinatorial optimization of aptamers", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 5, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 1087-1096, XP002985590, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/S0968-0896(97)00044-8 page 1090 - page 1091 page 1095 -----	1-54
Y	J. H. LEE: "Interaction of C5 protein with RNA aptamers selected by SELEX", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 30, no. 24, 15 December 2002 (2002-12-15), pages 5360-5368, XP55058107, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkf694 the whole document -----	1-54
Y	S. G. TREVINO ET AL: "Evolution of functional nucleic acids in the presence of nonheritable backbone heterogeneity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 33, 16 August 2011 (2011-08-16), pages 13492-13497, XP55021251, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1107113108 figure 2 -----	1-54
A	BIESECKER G ET AL: "Derivation of RNA aptamer inhibitors of human complement C5", IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 42, no. 1-3, May 1999 (1999-05), pages 219-230, XP002377259, ISSN: 0162-3109, DOI: 10.1016/S0162-3109(99)00020-X the whole document -----	1-54
A	US 2011/060027 A1 (BENEDICT CLAUDE [US] BENEDICT CLAUDE [US] ET AL) 10 March 2011 (2011-03-10) the whole document -----	1-54
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/000056

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VATER A ET AL: "TOWARD THIRD-GENERATION APTAMERS: SPIEGELMERS AND THEIR THERAPEUTIC PROSPECTS", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 6, no. 2, March 2003 (2003-03), pages 253-261, XP008031617, ISSN: 1367-6733 the whole document	1-54
A	BUNKA D H ET AL: "Development of aptamer therapeutics", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 10, no. 5, 17 July 2010 (2010-07-17), pages 557-562, XP027289412, ISSN: 1471-4892 [retrieved on 2010-09-15] table 1	1-54
A	ULRICH H: "RNA APTAMERS: FROM BASIC SCIENCE TOWARDS THERAPY", HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, no. 173, 2006, pages 305-326, XP001249105, ISSN: 0171-2004 figure 4	1-54
A	JAGAT R. KANWAR ET AL: "Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery", CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 28 September 2011 (2011-09-28), pages 1-19, XP55058076, ISSN: 1040-9238, DOI: 10.3109/10409238.2011.614592 page 461; figure 1	1-54
A	NIMJEE S M ET AL: "APTAMERS: AN EMERGING CLASS OF THERAPEUTICS", ANNUAL REVIEW OF MEDICINE : SELECTED TOPICS IN THE CLINICALSCIENCES, ANNUAL REVIEWS INC, US, vol. 56, 2005, pages 555-583, XP009055846, ISSN: 0066-4219, DOI: 10.1146/ANNUREV.MED.56.062904.144915 page 573 - page 574; table 2	1-54
X,P	WO 2012/095303 A1 (NOXXON PHARMA AG [DE]; JAROSCH FLORIAN [DE]; KLUSMANN SVEN [DE]; SELL) 19 July 2012 (2012-07-19) example 3	1-54

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/000056

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9941271	A1	19-08-1999	
		AU 765668 B2	25-09-2003
		AU 2660999 A	30-08-1999
		CA 2320100 A1	19-08-1999
		EP 1062226 A1	27-12-2000
		US 6395888 B1	28-05-2002
		US 2003078221 A1	24-04-2003
		US 2003191084 A1	09-10-2003
		US 2006079477 A1	13-04-2006
		US 2011196021 A1	11-08-2011
		WO 9941271 A1	19-08-1999
-----			
US 2011060027	A1	10-03-2011	
		US 2011060027 A1	10-03-2011
		US 2012322860 A1	20-12-2012
-----			
WO 2012095303	A1	19-07-2012	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M

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

(74) 代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74) 代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74) 代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74) 代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72) 発明者 ヘーリッヒ, カイ

ドイツ連邦共和国, 1 0 3 1 7 ベルリン, カスケルシュトラッセ 5 3

(72) 発明者 ファーター, アクセル

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 7 ベルリン, ヒルマンシュトラッセ 1 8 ベー

(72) 発明者 ブッフナー, クラウス

ドイツ連邦共和国, 1 4 1 9 7 ベルリン, アスマンスハウザー・シュトラッセ 3  
 (72)発明者 マーシュ, クリスティアン  
 ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 9 ベルリン, エルンストシュトラッセ 2 7  
 (72)発明者 クルースマン, スヴェン  
 ドイツ連邦共和国, 1 0 5 8 5 ベルリン, トラゾルトシュトラッセ 1  
 F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA09 CA10 CA11 CA20 HA01 HA11  
 HA17  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35  
 QR55 QR62 QR63 QS25 QS32 QX02  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA51  
 ZA59 ZA89 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZB32 ZB35 ZC21  
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA54 CA40 EA20 EA50 FA10

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015509705A5</a>	公开(公告)日	2016-03-03
申请号	JP2014551570	申请日	2013-01-10
申请(专利权)人(译)	Nokuson制药股份公司		
[标]发明人	ヘーリッヒカイ ファーターアクセル ブッフナークラウス マーシュクリスティアン クルースマンズヴェン		
发明人	ヘーリッヒ,カイ ファーター,アクセル ブッフナー,クラウス マーシュ,クリスティアン クルースマン,ズヴェン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12N15/115 C07K14/47 A61P37/06 A61P29/00 A61P27/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P11/00 A61P31/00 A61P25/00 A61P43/00 A61P7/00 A61P3/00 A61P35/00 A61P31/04 A61P17/02 A61K31/7088 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7088 A61P3/00 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P17/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/472 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/344 G01N2333/4716 C12N2310/322 C12N2310/3531		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N15/00.H C07K14/47 A61P37/06 A61P29/00 A61P27/02 A61P9/10 A61P9/00 A61P11/00 A61P31/00 A61P25/00 A61P43/00.105 A61P7/00 A61P3/00 A61P35/00 A61P31/04 A61P17/02 A61K31/7088 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA33 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA59 4C086/ZA89 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZB35 4C086/ZC21 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA10		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 角田恭子 田中宇 徳本光一 渡边淳		
优先权	2012000106 2012-01-10 EP 2012006960 2012-10-08 EP PCT/EP2012/000089 2012-01-10 WO		
其他公开文献	JP2015509705A JP6415327B2		
摘要(译)			

本发明涉及能够结合人C5a的核酸分子，其中所述核酸分子包含中央核苷酸区段，其中中央核苷酸区段包含5'<math>AUGn\_1GGUGKUn\_2n\_3RGGGHUGUKGGGn\_4Gn\_5CGACGCA</math>3'的核苷酸序列[SEQ ID NO : 61]，其中n1是U或dU，n2是G或dG，n3是A或dA，n4是U或dU，n5是U或dU，G，A，U，C，H，K和R是核糖核苷酸和dU，dG和dA是2'-脱氧核糖核苷酸。