

(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2009-521208

(P2009-521208A)

(43) 公表日 平成21年6月4日(2009.6.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁) 最終頁に続く

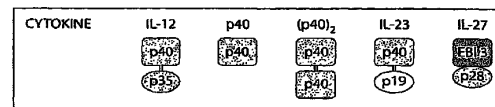
(21) 出願番号 特願2008-532477 (P2008-532477)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月22日 (2006.9.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年5月14日 (2008.5.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/037276
 (87) 国際公開番号 W02007/035922
 (87) 国際公開日 平成19年3月29日 (2007.3.29)
 (31) 優先権主張番号 11/234,676
 (32) 優先日 平成17年9月22日 (2005.9.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507272898
 アーケミックス コーポレイション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, サード スト
 リート 300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ディーナー, ジョン エル.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, ブリステル
 ストリート 87, ユニット 1ビー
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトIL-12サイトカインファミリーに対するアプタマーおよびその自己免疫関連疾患治療薬としての使用

(57) 【要約】

本発明は、サイトカインが病因に關与する免疫疾患を処置する材料および方法を、提供する。本発明の材料および方法は、自己免疫疾患の処置に有用である。本発明の材料および方法は、ヒトIL-23および/またはヒトIL-12サイトカインに結合することができ、それゆえそれらの生物学的活性を調節することができる核酸リガンドに關し、また、本発明の材料および方法は、免疫治療、自己免疫治療および癌治療における治療薬として有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL - 23 に結合するアプタマーであって、該アプタマーは、IL - 23 誘導性 STAT3 リン酸化を阻害し、該アプタマーは、配列番号 309 であるか、または配列番号 309 が IL - 23 誘導性 STAT3 リン酸化を阻害する能力と同じ能力を有するアプタマーであり、そして該アプタマーは、100 nM 未満の K_D を含む、アプタマー。

【請求項 2】

IL - 23 誘導性 STAT3 リン酸化を阻害する前記同じ能力を有する前記アプタマーが、配列番号 306 ~ 308 および配列番号 310 ~ 314 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のアプタマー。

10

【請求項 3】

前記アプタマーが、ヒト IL - 23 と結合する、請求項 1 に記載のアプタマー。

【請求項 4】

前記アプタマーが、少なくとも 1 つの化学変化を含むようにさらに改変されている、請求項 1 に記載のアプタマー。

【請求項 5】

前記改変が、核酸の糖の位置における化学的置換；核酸のリン酸の位置における化学的置換；および核酸の塩基の位置における化学的置換からなる群から選択される、請求項 4 に記載のアプタマー。

【請求項 6】

前記改変が、改変ヌクレオチドの組み込み、3' キャッピング、高分子量で非免疫原性化合物との結合体化および親油性化合物との結合体化からなる群から選択される、請求項 1 に記載のアプタマー。

20

【請求項 7】

前記非免疫原性で高分子量の化合物が、ポリアルキレングリコールである、請求項 6 に記載のアプタマー。

【請求項 8】

前記ポリアルキレングリコールが、ポリエチレングリコールである、請求項 7 に記載のアプタマー。

【請求項 9】

前記アプタマーが、インビトロにおいて IL - 23 誘導性 STAT3 リン酸化を阻害する、請求項 1 に記載のアプタマー。

30

【請求項 10】

IL - 23 に結合し、そして配列番号 309 と少なくとも 95% 同一のアプタマー核酸配列を含む、アプタマー。

【請求項 11】

配列番号 309 に示される前記アプタマー核酸配列を含む、請求項 10 に記載のアプタマー。

【請求項 12】

PEG をさらに含む、請求項 11 に記載のアプタマー。

40

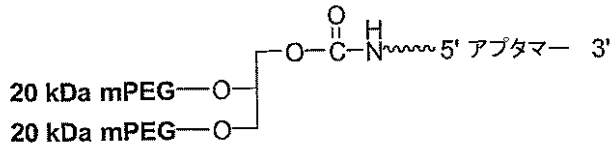
【請求項 13】

前記 PEG が、20 および 40 kDA からなる群から選択される分子量を含む、請求項 12 に記載のアプタマー。

【請求項 14】

以下に示す構造：

【化 1】



ここで：

【化 2】

~~~~~

10

は、リンカーを示し、

## 【化 3】

アプタマー = dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-  
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T (配列番号 309)

ここで、「d」は、2'デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2'-Omeヌクレオチドを示し、sは、非架橋リン酸位のスホロチオエート置換を示し、そして3Tは、逆位デオキシチミジンを示す、構造を有するアプタマー。

## 【請求項 15】

20

前記リンカーが、アルキルリンカーである、請求項 14 に記載のアプタマー。

## 【請求項 16】

前記アルキルリンカーが、2～18個連続したCH<sub>2</sub>基を含む、請求項 15 に記載のアプタマー。

## 【請求項 17】

前記アルキルリンカーが、2～12個連続したCH<sub>2</sub>基を含む、請求項 16 に記載のアプタマー。

## 【請求項 18】

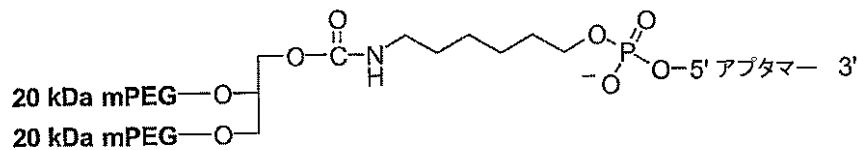
前記アルキルリンカーが、3～6個連続したCH<sub>2</sub>基を含む、請求項 17 に記載のアプタマー。

30

## 【請求項 19】

以下に示す構造：

## 【化 4】



アプタマー = dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-  
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T (配列番号 309)

40

ここで、「d」は、2'デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2'-Omeヌクレオチドを示し、sは、非架橋リン酸位のスホロチオエート置換を示し、そして3Tは、逆位デオキシチミジンを示す、構造を有する、請求項 18 に記載のアプタマー。

## 【請求項 20】

請求項 1 に記載のアプタマーまたはその塩の治療有効量および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む組成物。

50

## 【請求項 2 1】

IL - 2 3 によって媒介される疾患を処置、予防または改善する方法であって、それらを必要とする患者に請求項 1 9 に記載のアプタマーを投与する工程を含む、方法。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 に記載のアプタマーと試験組成物とを接触させる工程および IL - 2 3 の有無を検出する工程を含む、診断方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

(発明の分野)

10

本発明は、核酸分野一般、より詳細には、ヒトインターロイキン - 1 2 ( IL - 1 2 ) サイトカインファミリーのメンバー、より具体的には、ヒトインターロイキン - 1 2 ( IL - 1 2 )、ヒトインターロイキン - 2 3 ( IL - 2 3 ) または IL - 1 2 と IL - 2 3 の両方および他の関連サイトカイン ( 例えば、IL - 2 7 および p 4 0 ダイマー ) に結合することができるアプタマーに関する。そのようなアプタマーは、IL - 1 2 ファミリーのサイトカイン、具体的には IL - 2 3 および IL - 1 2 が関係している自己免疫関連疾患および / または他の疾患もしくは障害の治療薬および診断薬として有用である。本発明は、さらに、IL - 2 3 および / または IL - 1 2 に結合することができるアプタマーを投与するための材料および方法に関する。

## 【背景技術】

20

## 【0 0 0 2】

(発明の背景)

アプタマーは、古典的な Watson - Crick 塩基対形成以外の相互作用を介して分子への特異的な結合親和性を有する核酸分子である。

## 【0 0 0 3】

ファージディスプレイによって生成されるペプチドまたはモノクローナル抗体 ( 「 m A b 」 ) のようなアプタマーは、選択された標的に特異的に結合することができ、そして、例えば、結合アプタマーが、それらの標的が機能する能力を阻止し得ることによって、その標的の活性を調節することができる。ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからインビトロセクション ( in vitro selection ) プロセスによって作製されるアプタマーは、成長因子、転写因子、酵素、免疫グロブリンおよびレセプターを含む 1 0 0 個を超えるタンパク質について作製されている。代表的なアプタマーは、1 0 ~ 1 5 k D a のサイズ ( 3 0 ~ 4 5 ヌクレオチド ) であり、サブナノモル濃度の親和性でその標的と結合し、密接に関連した標的を識別する ( 例えば、アプタマーは、代表的には、同じ遺伝子ファミリー由来の他のタンパク質と結合しない )。一連の構造的研究により、アプタマーは、抗体 - 抗原複合体における親和性および特異性を駆動するのと同じタイプの結合相互作用 ( 例えば、水素結合、静電的相補性 ( e l e c t r o s t a t i c c o m p l e m e n t a r i t i e s )、疎水性接触、立体排除 ) を使用することができることが示されている。

30

## 【0 0 0 4】

40

アプタマーは、治療薬および診断薬として使用するために望ましい多くの特性 ( 高い特異性および親和性、生物学的効率ならびに優れた薬物動態学的特性を含む ) を有する。さらに、アプタマーは、抗体および他のタンパク質生物学よりも特定の競合的な利点をもたらず。例えば：

1 ) 速度および制御。アプタマーは、完全にインビトロプロセスによって作製されるので、治療的リード化合物 ( l e a d s ) を含む最初のリード化合物を迅速に作製することができる。インビトロセクションにより、アプタマーの特異性および親和性を厳密に制御することが可能となり、有毒かつ非免疫原性の標的に対するリード化合物を含むリード化合物を作製することができる。

## 【0 0 0 5】

50

2) 毒性および免疫原性。ある1つのクラスとしてアプタマーは、毒性または免疫原性をほとんどまたは全く示さない。高レベルのアプタマーをラットまたはウッドチャックに長期間投与するとき(毎日10mg/kgを90日間)、いかなる臨床的、細胞性または生化学的な測定によっても毒性が観察されない。多くのモノクローナル抗体の有効性が、抗体自体に対する免疫応答によって厳しく制限され得るのに対し、アプタマーは、MHCを介してT細胞によって提示され得ず、また、免疫応答は一般に、核酸フラグメントを認識するように教育されていない可能性が非常に高いので、アプタマーに対する抗体を誘発することは、極度に困難である。

【0006】

3) 投与。現在承認されている抗体治療法のほとんどが、静脈内注射(代表的には、2~4時間に亘る注射)によって投与されるのに対し、アプタマーは、皮下注射によって投与することができる(皮下投与を介したアプタマーバイオアベイラビリティは、サルを用いた研究において80%超である(非特許文献1))。この差は、主に、溶解性が比較的低いことに起因し、それゆえほとんどの治療的mAbは、大量に必要である。溶解性が良好(150mg/mL超)であり、かつ、比較的低分子量(アプタマー:10~50kDa;抗体:150kDa)であるので、1週間あたりのアプタマー用量は、0.5mL未満の容積で注射により送達され得る。さらに、アプタマーのサイズが小さいことから、抗体または抗体フラグメントが透過できない構造的狭窄領域を透過することができ、これは、アプタマーベースの治療または予防のさらに別の利点であることを示している。

【0007】

4) 拡張性およびコスト。治療的アプタマーは、化学合成されるため、その結果として、生産需要を満たすのに必要なスケールに容易に調節することができる。生産量の調節が困難であることから、現在、いくつかの生物製剤の利用可能性が制限されている。また、大規模タンパク質生産プラントの資本コストが莫大であるのに対し、1台の大規模オリゴヌクレオチド合成装置では100kg/年より多く生産することができ、比較的多くない初期投資ですむ。キログラム規模でのアプタマー合成に対する現在の商品コストは、\$500/gと見積もられており、その額は、高度に最適化された抗体に対するコストに匹敵する。プロセス開発の継続的な改良により、商品コストを5年間で\$100/g未満に抑えられると予想される。

【0008】

5) 安定性。治療的アプタマーは、化学的に頑強である。治療的アプタマーは、因子(例えば、熱および変性剤)に曝露された後に活性を回復するように本質的に順応し、また、凍結乾燥粉末として室温において長期間(1年超)に亘って保存可能である。

【0009】

(サイトカインおよび免疫応答)

哺乳動物における免疫応答は、「免疫ネットワーク」と呼ばれる一連の複雑な細胞相互作用に基づいている。リンパ球、マクロファージ、顆粒球および他の細胞のネットワーク様細胞相互作用に加えて、リンフォカイン、サイトカインまたはモノカインとして知られている可溶性タンパク質は、これらの細胞相互作用を調節する際に重大な役割を果たす。免疫系の細胞によるサイトカイン発現は、免疫応答の制御において重要な役割を果たす。ほとんどのサイトカインは、多面発現性であり、抗原提示; CD4+細胞サブセットの活性化、増殖および分化; B細胞の抗体応答; ならびに過敏症の徴候を含む複数の生物学的活性を有する。サイトカインは、免疫系および/または造血細胞に直接または間接的にかわる、多岐にわたる変性状態または異常状態に関与する。サイトカインの重要なファミリーは、例えば、IL-12、IL-23、IL-27ならびにp40モノマーおよびp40ダイマーを含むIL-12ファミリーである。

【0010】

IL-23は、p19およびp40サブユニット(各々は、別個の遺伝子によってコードされる)を含む共有結合したヘテロダイマー分子である。IL-12はまた、共有結合したヘテロダイマー分子であり、p35およびp40サブユニットからなる。従って、I

10

20

30

40

50

L-23とIL-12の両方が、p40サブユニットを共通して有する(図1)。ヒトおよびマウスのp19は、約70%のアミノ酸配列同一性を有し、p35に密接に関連している(このサブユニットは、IL-12に特有である)。トランスフェクションアッセイにより、p19タンパク質は、p35と同様に、単独で発現される時は、その分泌が不十分であり、高い発現のためには、ヘテロダイマー化パートナーのp40との同時発現が必要であることが明らかになっている。p40およびp19は、一緒になってジスルフィド結合したヘテロ二量体を形成する。p19構成要素は、活性化マクロファージ、樹状細胞(「DC」)、内皮細胞およびT細胞によって大量に生産される。Th1細胞は、Th2細胞よりも大量のp19 mRNAを発現する;しかしながら、これらの細胞タイプのうち、活性化マクロファージおよびDCだけが、恒常的にIL-23の他方の構成要素であるp40を発現する。p19の発現は、Toll様レセプター-2を介してシグナルを送る細菌の生成物によって増大されることから、p19、およびそれに伴ってIL-23は、ある特定の細菌の感染に対する免疫応答において機能し得ることが示唆される。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

IL-12およびIL-23の共通した作用の1つは、T細胞に対する増殖促進効果である(非特許文献2)。しかしながら、これらのサイトカインが作用するT細胞サブセットにおいて明らかな差が存在する。マウスにおいて、IL-12は、マウスナイーブT細胞の増殖を誘導するが、メモリーT細胞の増殖は誘導しないのに対し、IL-23の増殖促進効果は、メモリーT細胞に限定される。ヒトにおいて、IL-12は、ヒトナイーブT細胞およびヒトメモリーT細胞の両方の増殖を促進する;しかしながら、IL-23の増殖促進効果は、なおメモリーT細胞に限られる。また、IFN- $\gamma$ 生成に対するIL-23の作用は、ヒトにおいて主にメモリーT細胞に対するものである。IL-12が、ナイーブT細胞において、およびメモリーT細胞においてはより高い程度で、IFN- $\gamma$ 生成を誘導し得るが、IL-23は、ナイーブT細胞におけるIFN- $\gamma$ 生成に対して非常に小さい効果しか有しない。IFN- $\gamma$ 生成の中程度の増大は、IL-23によって刺激されたメモリーT細胞において観察されるが、この効果は、IL-12による刺激から生じる効果よりもいくらか小さい。

#### 【0012】

従って、IL-23は、IL-12とは異なる生物学的活性を有するが、それらの両方は、自己免疫性疾患および炎症性疾患(例えば、骨粗鬆症における骨吸収(bone resorption)、I型糖尿病および癌などの疾患に加えて、多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus)および過敏性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎を含む))に関与していると考えられている。

#### 【0013】

(自己免疫疾患治療薬としてのIL-23および/またはIL-12特異的アプタマー)

理論に拘束する意図はないが、IL-12およびIL-23は、多発性硬化症(「MS」)の病因に関与すると考えられている。例えば、p40レベルは、MS患者の脳髄液においてアップレギュレートされる(非特許文献3)。さらに、抗p40 mAbは、脳における病変に局在することが示されている(非特許文献4)。さらに、より低いベースラインレベルのp40 mRNAは、IFN- $\gamma$ 処置に対する臨床応答を予測することが示されている(非特許文献5)。従って、p40を介したIL-12とIL-23の両方のノックダウンにより、MSの症状が改善し得る。実際に、抗p40抗体が、マウス(非特許文献6)およびマーモセット(非特許文献4)において実験的自己免疫性脳脊髄炎(「EAE」)の発症および重症度を有意に抑制することが示されている。

#### 【0014】

IL-23とIL-12の両方ともをノックアウトすることにより、MSの発症および症状が抑制されることを示す証拠が存在するにもかかわらず、EAEマウスモデルに対するIL-12およびIL-23ノックアウトの効果によって示されているような、マウス

におけるMS/EAE病因において、その2つのうちIL-23のほうが、重要であるという証拠が有力である（非特許文献7）。例えば、p35ノックアウトマウスにおいてEAEは生じ得るが、p19またはp40ノックアウトマウスでは生じ得ない（非特許文献7）。CNSにおけるIL-23の発現は、p19/p40ノックアウトマウスにおいてEAEを救済するが、IL-12の発現は救済せず、IL-12の過剰発現は、EAEを悪化させ、それゆえ、IL-12は、通常のTH1細胞の発達および活性化においていくつかの役割を果たすと見られる（非特許文献7）。ヒトでは、MS患者の中樞神経系（CNS）においてp40 mRNAの過剰発現は、観察されているが、p35 mRNAの過剰発現は観察されていない。

**【0015】**

IL-12は、Th1細胞を活性化する際に通常の役割を果たすことに加えて、感染への対処に対してIL-23よりも重要であり得る。マウスでは、p19ノックアウトにより、古典的なTh1細胞応答（高IFN-ガンマ、低IL-4）が誘導されるのに対し、p35およびp40ノックアウトマウスにおける応答は、Th2細胞に限定される（低IFN-ガンマ、高IL-4）（非特許文献7）。さらに、p19ノックアウト免疫細胞は、強力な炎症促進性サイトカインを生成するのに対し、p40ノックアウト免疫細胞は、それらを生成することができない。最後に、p40、IL-12R1およびIL-12R2ノックアウトマウスは、種々の感染症に罹患しやすい（非特許文献8）。従って、アブタマー治療薬を介して特異的にIL-23を阻害することにより、効果的にIL-23媒介性疾患に対処し得ると同時に、患者を感染に対して一層対処できるようにする。

**【0016】**

IL-23およびIL-12の両方またはいずれかは、末期の関節の炎症を助長するものとして関節リウマチに関与する。理論に拘束する意図はないが、IL-23は、メモリーT細胞および炎症性マクロファージ上のIL-23レセプター（IL-23R）の会合を介してこれらの細胞の機能に影響を及ぼすと考えられている。研究により、IL-23サブユニットのp19および/またはp40は、関節リウマチについてのマウスモデルであるマウスのコラーゲン誘導関節炎（「CIA」）に関わっていることが示唆されている。抗p40抗体は、単独で、そして抗腫瘍壊死因子（抗TNF）処置と併用するとき、マウスCIAにおける症状を改善し、そして発症および進行を防ぐと示されている（非特許文献9、非特許文献10および非特許文献11）。さらに、p35ノックアウトマウスでは、CIAの発症および重症度が悪化するが、p19およびp40ノックアウトマウスは、CIAの発症に対して完全に抵抗性であることが示されている（非特許文献12および非特許文献13）。従って、IL-23に結合し、それを阻害する本発明のアブタマーおよび方法は、関節リウマチに対する治療薬として有用である。

**【0017】**

IL-23およびIL-12の両方またはいずれかはまた、Th-1媒介性疾患（例えば、尋常性乾癬および過敏性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎が挙げられるがこれらに限定されない））における炎症細胞の動員において主要な役割を果たすと考えられている。例えば、高レベルのp19およびp40 mRNAは、尋常性乾癬に罹患した患者の皮膚病変において定量的RT-PCRによって検出されたのに対し、p35 mRNAは、検出されなかった（非特許文献14）。マウスにおける炎症性腸疾患の実験モデルである、2,4,6,トリニトロベンゼンスルホン酸（「TNBS」）大腸炎において、抗IL-12モノクローナル抗体による処置により、粘膜の炎症を完全に改善/予防する際に有効であることが証明された（非特許文献15）。TNBS大腸炎モデルにおいていくつかの異なるIL-12アンタゴニストを評価した別の研究では、抗IL-12 p40抗体は、粘膜の炎症を予防する際に最も有効であったことから、IL-12とIL-23の両方ともが関与することが証明された（非特許文献16）。従って、IL-12および/またはIL-23に結合し、それを阻害する本発明のアブタマーは、乾癬および炎症性腸疾患に対する治療薬として有用である。

**【0018】**

10

20

30

40

50

IL - 12 および / または IL - 23 は、全身性エリテマトーデス (「SLE」) に関わっているとも考えられている。例えば、SLE 患者から得られた血清には、ヘテロ二量体 (例えば、IL - 12 (p35 / p40) および IL - 23 (p19 / p40)) としての p40 の血清レベルよりもモノマーとしての p40 の量が有意に多く含まれていることが見出されたことから、不十分な IL - 23 および / または IL - 12 の生成は、SLE の病因に關与し得ることが示唆される。従って、IL - 23 および / または IL - 12 の生物学的機能を増強する本発明のアプタマーは、全身性エリテマトーデスの処置における治療薬として有用である (非特許文献 17)。

#### 【0019】

(腫瘍学的治療薬としての IL - 23 および / または IL - 12 特異的アプタマー)

IL - 12 の抗腫瘍活性は、十分に特性付けられており、また、最近の研究により、IL - 23 もまた抗腫瘍活性および抗転移性活性を有することが示されている。例えば、レトロウイルスにより IL - 23 を形質導入された結腸癌腫細胞は、免疫適格マウスにおける細胞株によって確立された結腸腫瘍の増殖がコントロール細胞株と比較して有意に低下したことから、腫瘍における IL - 23 の発現は、抗腫瘍効果をもたらすことが示唆される (非特許文献 18)。同様に、一本鎖 IL - 23 (「scIL - 23」) を放出するようにレトロウイルスにより操作された肺癌腫細胞株は、BALB / c マウスにおいて肺転移を有意に抑制し、ほぼ完全な腫瘍拒絶をもたらされた (非特許文献 19)。従って、IL - 23 および / または IL - 12 に結合し、それらの生物学的機能を増強するアプタマーは、結腸癌、肺癌、具体的には肺転移ならびに IL - 23 および / または IL - 12 が抗腫瘍効果を有する他の腫瘍学的疾患の処置に対する腫瘍学的治療薬として有用である。

#### 【0020】

ヒト IL - 23 を特異的に標的にする治療薬は、現在のところ知られていない。IL - 23 を標的にする利用可能な薬剤としては、R & D Systems (Minneapolis, MN) を介して入手可能な研究使用目的のみの抗ヒト IL - 23 p19 ポリクローナル抗体、IL - 12 と IL - 23 の両方が p40 サブユニットを共通して有するために両方のサイトカインを標的にする抗ヒト p40 モノクローナル抗体、および抗マウス IL - 23 p19 ポリクローナル抗体および抗マウス IL - 23 p19 モノクローナル抗体 (マウス IL - 23 を標的にするが、ヒト IL - 23 を標的にしない) (非特許文献 20) が挙げられる。先に説明したように、IL - 23 と IL - 12 の両方ともの活性を阻害する薬剤は、患者を感染症によりかかりやすくし得、一般に、治療薬を開発する点で IL - 23 のみを阻害する薬剤よりも多くの合併症を引き起こし得る。IL - 23 が、脳および関節における自己免疫性炎症に対して IL - 12 よりも重要な役割を果たすという証拠が存在するので、IL - 23 だけに特異的な治療薬は、両方のサイトカインを標的にする薬剤 (例えば、抗 p40 ヒト mAb) よりも有益であり得る。

【非特許文献 1】Tuckerら、J. Chromatography B. 732 : 203 - 212, 1999

【非特許文献 2】Brombacherら、Trends in Immun. (2003)

【非特許文献 3】Fassbenderら、(1998) Neurology 51 : 753

【非特許文献 4】Brokら、JI (2002) 169 : 6554

【非特許文献 5】Van-Boxel-Dezaireら、1999

【非特許文献 6】Constantinescuら、JI (1998) 161 : 5097

【非特許文献 7】Cuara, (2003) Nature 421 : 744

【非特許文献 8】Adorini, Contemporary Immunology (2003) pg. 253

【非特許文献 9】Malfaitら、Clin. Exp. Immunol. (1998) 111 : 377

【非特許文献 10】Matthysら、Eur. J. Immunol. (1998) 28

10

20

30

40

50

: 2 1 4 3

【非特許文献 11】Butler R、Eur. J. Immunol. (1999) 29 : 2205

【非特許文献 12】McIntyre R、Eur. J. Immunol. (1996) 26 : 2933

【非特許文献 13】Murphy R、J. Exp. Med. (2003) 198 : 1951

【非特許文献 14】Lee R、J. Exp. Med. (2004) 199 (1) : 125 - 30

【非特許文献 15】Neurath R、J. Exp. Med. (1995) 182 : 1281 - 1290

【非特許文献 16】Schmidt R、Pathobiology (2002 - 03) ; 70 : 177 - 183

【非特許文献 17】Lauwerys R、Lupus (2002) 11 (6) : 384 - 7

【非特許文献 18】Wang R、Int. J. Cancer : 105 , 820 - 824 (2003)

【非特許文献 19】Lo R、J. Immunol. 2003 , 171 : 600 - 607

【非特許文献 20】Pirhonen R (2002) , J. Immunology 169 : 5673 - 5678

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

アプタマーの特異性、小ささおよび親和性が、治療薬として有利である場合、ヒトサイトカイン、具体的には IL - 23 および IL - 12 が病因に関わっている疾患を処置するアプタマー治療薬のための材料および方法を有することが有益であり得る。本発明は、これらの必要性およびその他の必要性を満たす材料および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0022】

(発明の要旨)

本発明は、自己免疫性疾患および炎症性疾患、ならびに IL - 23 および / または IL - 12 が病因に関与する他の関連疾患 / 障害の処置のための材料および方法を提供する。

【0023】

1つの実施形態において、本発明の材料は、IL - 23 に特異的に結合するアプタマーを提供する。1つの実施形態において、本発明のアプタマーが結合する IL - 23 は、ヒト IL - 23 であるのに対し、別の実施形態では、IL - 23 は、ヒト IL - 23 の改変体である。1つの実施形態において、IL - 23 の改変体は、ヒト IL - 23 の機能と本質的に同じ生物学的機能を示し、実質的に同じ構造を有し、そしてヒト IL - 23 が前記アプタマーに結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

【0024】

1つの実施形態において、ヒト IL - 23 またはその改変体は、配列番号 4 および / または 5 を含む配列と少なくとも 70 % 同一、好ましくは少なくとも 80 % 同一、より好ましくは少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ヒト IL - 23 またはその改変体は、配列番号 4 および 5 を含むアミノ酸配列を有する。

【0025】

1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、約 100 nM 以下、好ましくは 50 nM 以下、より好ましくは 10 nM 以下、さらにより好ましくは 1 nM 以下のヒト IL - 23 またはその改変体に対する解離定数を有する。

【0026】

1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒト IL - 23 またはその改変体の

10

20

30

40

50

機能を調節する。1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-23の機能を刺激する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-23またはその改変体の機能を阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-23またはその改変体の機能をインビボにおいて阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、IL-23がIL-23レセプターに結合するのを防ぐ。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマーによって調節されるヒトIL-23またはその改変体の機能は、ヒトIL-23関連疾患（例えば：自己免疫疾患（多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、全身性エリテマトーデスおよび過敏性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎））、炎症性疾患、癌（結腸癌、肺癌および肺転移が挙げられるがこれらに限定されない）、骨粗鬆症における骨吸収およびI型糖尿病が挙げられるがこれらに限定されない）を媒介する。

10

【0027】

1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0028】

【化5】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96,

配列番号 103-118, 配列番号 124-130, 配列番号 135-159, 配列番号 162,および

配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196,および 配列番号

203-314

20

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーがヒトIL-23に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0029】

【化6-1】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88,

【0030】

【化6-2】

配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-130, 配列番号

135-159, 配列番号 162,および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号

181-196,および 配列番号 203-314.

30

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーと実質的に同じ構造およびそれらのアプタマーがIL-23に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

【0031】

1つの実施形態において、本発明は、

【0032】

【化7】

配列番号

13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号

124-130, 配列番号 135-159, 配列番号 162,および 配列番号 164-172, 配列番号

176-178, 配列番号 181-196,および 配列番号 203-314.

40

からなる群から選択される配列のいずれか1つと少なくとも80%同一、より好ましくは少なくとも90%同一である、核酸配列を含むヒトIL-23に結合するアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、

【0033】

50

## 【化 8】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88, 配列番号  
 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-130, 配列番号 135-159, 配列番号  
 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196, および  
 配列番号 203-314

の群から選択される配列のいずれか 1 つの固有配列領域中の 4、8 または 20 個連続したヌクレオチドの配列と同一である 4 個連続したヌクレオチド、好ましくは 8 個連続したヌクレオチド、より好ましくは 20 個連続したヌクレオチドを含むアダマーを提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、

【0034】

## 【化 9】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88,  
 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-130, 配列番号 135-159,  
 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196,  
 および 配列番号 203-314.

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むヒト IL - 23 またはその改変体と結合することができるアダマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号 177、好ましくは配列番号 224、より好ましくは配列番号 309、より好ましくは配列番号 310 およびより好ましくは配列番号 311 に示される配列を有するアダマーを提供する。

【0035】

1 つの実施形態において、本発明は、マウス IL - 23 に特異的に結合するアダマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、マウス IL - 23 の機能と本質的に同じ生物学的機能を示し、マウス IL - 23 の構造と実質的に同じ構造およびマウス IL - 23 が前記アダマーに結合する能力と実質的に同じ能力を有する、マウス IL - 23 の改変体に結合するアダマーを提供する。

【0036】

1 つの実施形態において、本発明のアダマーが結合するマウス IL - 23 またはその改変体は、配列番号 321 および / または 322 を含む配列と少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、マウス IL - 23 またはその改変体は、配列番号 321 および 322 を含むアミノ酸配列を有する。

【0037】

1 つの実施形態において、本発明のアダマーは、約 100 nM 以下、好ましくは 50 nM 以下、より好ましくは 10 nM 以下のマウス IL - 23 またはその改変体に対する解離定数を有する。

【0038】

1 つの実施形態において、本発明のアダマーは、マウス IL - 23 またはその改変体の機能を調節する。1 つの実施形態において、本発明のアダマーは、マウス IL - 23 の機能を刺激する。別の実施形態において、本発明のアダマーは、マウス IL - 23 またはその改変体の機能を阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアダマーは、マウス IL - 23 またはその改変体の機能をインビボにおいて阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアダマーは、マウス IL - 23 がマウス IL - 23 レセプターに結合するのを防ぐ。いくつかの実施形態において、本発明のアダマーによって調節されるマウス IL - 23 の機能は、マウス IL - 23 関連疾患モデル（例えば、実験的自己免疫性脳脊髄炎、マウスのコラーゲン誘導関節炎および TNBS 大腸炎）を媒介する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号124～134および配列番号199～202からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーがマウスIL-23に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号124～134および配列番号199～202からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーと実質的に同じ構造およびそれらのアプタマーがマウスIL-23に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

## 【 0 0 4 0 】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号124～134および配列番号199～202からなる群から選択される配列のいずれか1つと少なくとも80%同一、好ましくは少なくとも90%同一である核酸配列を含む、マウスIL-23に結合するアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号124～134および配列番号199～202からなる群から選択される配列のいずれか1つの固有配列領域中の4、8または20個連続したヌクレオチドの配列と同一である、4個連続したヌクレオチド、好ましくは8個連続したヌクレオチド、より好ましくは20個連続したヌクレオチドを含むアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号124～134および配列番号199～202からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、マウスIL-23またはその改変体と結合することができるアプタマーを提供する。

## 【 0 0 4 1 】

1つの実施形態において、本発明の材料は、IL-12に特異的に結合するアプタマーを提供する。1つの実施形態において、本発明のアプタマーが結合するIL-12は、ヒトIL-12であるのに対し、別の実施形態では、IL-12は、ヒトIL-12の改変体である。1つの実施形態において、IL-12の改変体は、ヒトIL-12の機能と本質的に同じ生物学的機能を示し、ヒトIL-12と実質的に同じ構造およびヒトIL-12が前記アプタマーと結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

## 【 0 0 4 2 】

1つの実施形態において、ヒトIL-12またはその改変体は、配列番号4および/または6を含む配列と少なくとも80%同一、好ましくは少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ヒトIL-12またはその改変体は、配列番号4および6を含むアミノ酸配列を有する。

## 【 0 0 4 3 】

1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-12またはその改変体の機能を調節する。1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-23の機能を刺激する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-12またはその改変体の機能を阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、ヒトIL-12またはその改変体の機能をインビボにおいて阻害する。さらに別の実施形態において、本発明のアプタマーは、IL-12がIL-12レセプターに結合するのを防ぐ。1つの実施形態において、本発明のアプタマーによって調節されるヒトIL-12またはその改変体の機能は、ヒトIL-12関連疾患（例えば：自己免疫疾患（多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、全身性エリテマトーデスおよび過敏性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）が挙げられるがこれらに限定されない）、炎症性疾患、癌（結腸癌、肺癌および肺転移が挙げられるがこれらに限定されない）、骨粗鬆症における骨吸収およびI型糖尿病）を媒介する。

## 【 0 0 4 4 】

1つの実施形態において、本発明は、リボ核酸またはデオキシリボ核酸のいずれかであるアプタマーを提供する。さらなる実施形態において、これらのリボ核酸またはデオキシリボ核酸のアプタマーは、一本鎖である。別の実施形態において、本発明は、少なくとも1つの化学改変を有するアプタマーを提供する。1つの実施形態において、その改変は、核酸の糖の位置における化学的置換；核酸のリン酸の位置における化学的置換；および核酸の塩基の位置における化学的置換；改変ヌクレオチドの組み込み；3'キャッピング；

10

20

30

40

50

高分子量で非免疫原性の化合物との結合体化；親油性化合物との結合体化；およびリン酸骨格の改変からなる群から選択される。1つの実施形態において、本発明のアプタマーと結合体化される非免疫原性で高分子量の化合物は、ポリアルキレングリコール、好ましくはポリエチレングリコールである。1つの実施形態において、骨格の改変は、リン酸骨格への1つ以上のホスホロチオエートの組み込みを含む。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、リン酸骨格における10個未満、6個未満または3個未満のホスホロチオエートの組み込みを含む。

【0045】

1つの実施形態において、本発明の材料は、

【0046】

【化10】

配列番号 13-

66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-130,  
配列番号 135-159, 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178,  
配列番号 181-196, および 配列番号 203-314,

からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーまたはその塩の治療有効量および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を提供する。別の実施形態において、本発明の材料は、

【0047】

【化11】

配列番号

14, 配列番号 17-19, 配列番号 21, 配列番号 27-32, 配列番号 34-40, 配列  
番号 42, 配列番号 49, 配列番号 60-61, 配列番号 91-92, 配列番号 94, および  
配列番号 103-118,

からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーまたはその塩の治療有効量および薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を提供する。好ましい実施形態において、本発明の材料は、配列番号177、配列番号224および配列番号309～312からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーの治療有効量を含む薬学的組成物を提供する。

【0048】

1つの実施形態において、本発明は、IL-23によって媒介される疾患を処置、予防または改善する方法を提供し、その方法は、

【0049】

【化12】

配列番号 13-66, 配列番号

71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-130, 配列番号  
135-159, 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号  
181-196, および 配列番号 203-314

からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーの治療有効量を含む組成物を脊椎動物に投与する工程を含む。別の実施形態において、本発明は、IL-23および/またはIL-12によって媒介される疾患を処置、予防または改善する方法を提供し、その方法は、

【0050】

10

20

30

40

## 【化 1 3】

配列番号 14, 配列番号 17-19, 配列番号 21, 配列番号  
27-32, 配列番号 34-40, 配列番号 42, 配列番号 49, 配列番号 60-61,  
配列番号 91-92, 配列番号 94, および 配列番号 103-118

からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーの治療有効量を含む組成物を脊椎動物に投与する工程を含む。好ましい実施形態において、脊椎動物に投与されるアプタマーの治療有効量を含む組成物は、配列番号 177、配列番号 224 および配列番号 309 ~ 312 からなる群から選択される核酸配列を含む。1つの実施形態において、薬学的組成物を投与される脊椎動物は、哺乳動物である。好ましい実施形態において、その哺乳動物は、ヒトである。

10

## 【0051】

1つの実施形態において、本発明の方法によって処置、予防または改善される疾患は、自己免疫疾患（多発性硬化症、関節リウマチ、乾癬、全身性エリテマトーデスおよび過敏性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）が挙げられるがこれらに限定されない）、炎症性疾患、癌（結腸癌、肺癌および肺転移が挙げられるがこれらに限定されない）、骨粗鬆症における骨吸収およびI型糖尿病からなる群から選択される。

## 【0052】

1つの実施形態において、本発明は、

20

## 【0053】

## 【化 1 4】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号  
103-118, 配列番号 124-134, 配列番号 135-159, 配列番号 162, および 配列番号  
164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196, および 配列番号 199-314  
からなる群から選択される核酸配列を有するアプタマーを、IL-23 および / もしくは IL-12 またはその改変体を含むと思われる組成物と接触させる工程ならびに IL-23 および / もしくは IL-12 またはその改変体の有無を検出する工程を含む診断方法を提供する。

30

## 【0054】

1つの実施形態において、本発明は、

## 【0055】

## 【化 1 5】

配列番号 13-66, 配列番号 71-  
88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-134, 配列番号 135-  
159, 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-  
196, および 配列番号 199-314

40

からなる群から選択される核酸配列を有し、インビトロ診断薬として使用するためのアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、

## 【0056】

## 【化 1 6】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号  
103-118, 配列番号 124-134, 配列番号 135-159, 配列番号 162, および 配列番号  
164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196, および 配列番号 199-314

からなる群から選択される核酸配列を有し、インビボ診断薬として使用するためのアプタ

50

マーを提供する。さらに別の実施形態において、本発明は、

【0057】

【化17】

配列番号

13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-  
134, 配列番号 135-159, 配列番号 162, および配列番号 164-172, 配列番号 176-  
178, 配列番号 181-196, および配列番号 199-314

からなる群から選択される核酸配列を有し、疾患をインビボにおいて処置、予防または回復するために使用するためのアプタマーを提供する。

10

【0058】

別の実施形態において、IL-23に結合するアプタマーが提供され、ここで、そのアプタマーは、IL-23誘導性STAT3リン酸化を阻害し、そしてそのアプタマーは、配列番号309であるか、または配列番号309がIL-23誘導性STAT3リン酸化を阻害する能力と同じ能力を有するアプタマーであり、ここで、このアプタマーは、100nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの実施形態において、本発明のこの局面のアプタマーは、500nM未満の $K_D$ 、いくつかの実施形態では50nM未満の $K_D$ を含む。本発明のこの局面の実施形態において、アプタマーは、IL-23誘導性STAT3リン酸化をインビトロにおいて阻害する。いくつかの実施形態において、IL-23誘導性STAT3リン酸化のアプタマー阻害は、末梢血単核球の溶解産物を測定するのに対し、他の実施形態においては、PHA Blastを測定する。いくつかの実施形態において、IL-23誘導性STAT3リン酸化を阻害する能力と同じ能力を有するアプタマーは、配列番号306~308および310~314からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、そのアプタマーは、ヒトIL-23と結合する。

20

【0059】

いくつかの実施形態において、本発明のこの局面のアプタマーは、少なくとも1つの化学改変を含むようにさらに改変される。いくつかの実施形態において、化学改変は、核酸の糖の位置における化学的置換；核酸のリン酸の位置における化学的置換；および核酸の塩基の位置における化学的置換からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、改変は、改変ヌクレオチドの組み込み、3'キャッピング、高分子量で非免疫原性の化合物との結合体化、親油性化合物との結合体化からなる群から選択される。特定の実施形態において、非免疫原性で高分子量の化合物は、ポリアルキレングリコール、好ましくはポリエチレングリコールである。

30

【0060】

特定の実施形態において、本発明によって提供されるアプタマーは、IL-23に結合し、配列番号309に記載の主要配列と少なくとも95%同一であるアプタマー核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明によって提供されるアプタマーは、IL-23に結合し、化学改変を含む配列番号309の配列と少なくとも95%同一であるアプタマー核酸配列を含み、ここで、相同性パーセントは、目視検査によって判定され、同一性パーセントは、アラインメントを助けるために10ヌクレオチドの長さの中に1つのギャップが導入され得るときに、比較される配列中の同一のヌクレオチド残基（化学改変を含む）でアラインメントする2つの配列のうち小さいほうの配列に見られるヌクレオチドのパーセンテージとして算出される。特定の実施形態において、配列番号309に示される核酸配列を含むアプタマーが提供される。

40

【0061】

特定の実施形態において、配列番号309に示される核酸配列を含むアプタマーが提供される。本発明のこの局面の別の実施形態において、配列番号306~308および配列番号310~314からなる群から選択される核酸配列を含むアプタマーが提供される。いくつかの実施形態において、この局面のアプタマーは、PEG、特に、20および40

50

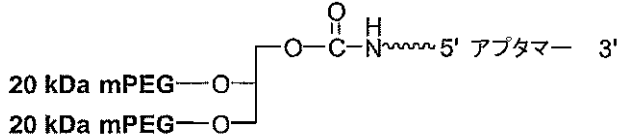
k D A からなる群から選択される分子量を含む P E G をさらに含む。

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態において、以下に示される構造：

【 0 0 6 3 】

【 化 1 8 】



10

(ここで：

【 0 0 6 4 】

【 化 1 9 】

~~~~~

は、リンカーを示し、このアプタマーは、配列番号 3 0 6 ~ 3 1 1 および配列番号 3 1 4 からなる群から選択される)

を有するアプタマーが提供される。この局面の特定の実施形態において、

【 0 0 6 5 】

【 化 2 0 】

20

アプタマー= dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T (配列番号309)

(ここで、「d」は、2'デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2'-Omeヌクレオチドを示し、sは、非架橋リン酸位のホスホロチオエート置換を示し、そして3Tは、逆位デオキシチミジンを示している)。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態において、リンカーは、アルキルリンカー、特に、2~18個連続したCH₂基を含むアルキルリンカーであり、より具体的には、アルキルリンカーは、2~12個連続したCH₂基を含み、より具体的には3~6個連続したCH₂基を含むアルキルリンカーである。

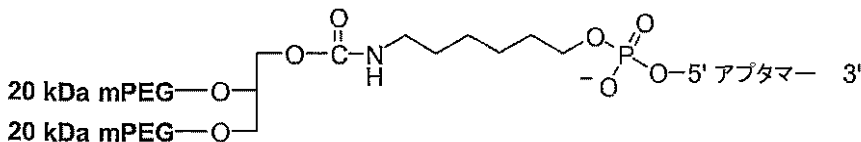
30

【 0 0 6 7 】

1つの実施形態において、以下に示される構造：

【 0 0 6 8 】

【 化 2 1 - 1 】



40

(ここで、このアプタマーは、配列番号 3 0 6 ~ 3 1 1 および配列番号 3 1 4 からなる群から選択される)

を有するアプタマーが提供される。この局面の特定の実施形態において、

【 0 0 6 9 】

【 化 2 1 - 2 】

アプタマー=

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T (配列番号309)

(ここで、「d」は、2'デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2'-Omeヌクレ

50

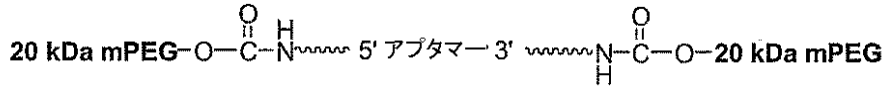
オチドを示し、s は、非架橋リン酸位のスホロチオエート置換を示し、そして3 Tは、逆位デオキシチミジンを示している)。

【0070】

別の実施形態において、以下の構造：

【0071】

【化22】



(ここで、

【0072】

【化23】

~~~~~

は、リンカーを示し、そしてこのアプタマーは、そのアプタマーが、3' 3 Tを有しないこと以外は、配列番号306~311および配列番号314からなる群から選択される)を含むアプタマーが提供される。この局面の実施形態において、

【0073】

【化24】

アプタマー =

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-

dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU

(ここで、「d」は、2' デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2' - Omeヌクレオチドを示し、s は、非架橋リン酸位のスホロチオエート置換を示している)。

【0074】

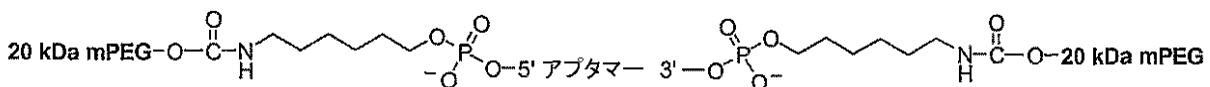
いくつかの実施形態において、リンカーは、アルキルリンカー、特に、2~18個連続したCH<sub>2</sub>基を含むアルキルリンカーであり、より具体的には、アルキルリンカーは、2~12個連続したCH<sub>2</sub>基を含み、より具体的には、3~6個連続したCH<sub>2</sub>基を含むアルキルリンカーである。

【0075】

特定の実施形態において、以下の構造：

【0076】

【化25】



(ここで、このアプタマーは、そのアプタマーが3' 3 Tを有しないこと以外は、配列番号306~311および配列番号314からなる群から選択される)を含むアプタマーが提供される。この局面の特定の実施形態において、

【0077】

【化26】

アプタマー = dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-

dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU

(ここで、「d」は、2' デオキシヌクレオチドを示し、「m」は、2' - Omeヌクレオチドを示し、s は、非架橋リン酸位のスホロチオエート置換を示している)。

【0078】

別の局面において、本発明は、本発明のアプタマーまたはその塩の治療有効量および薬

10

20

30

40

50

学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤を含む組成物を提供する。別の局面において、本発明は、IL-23によって媒介される疾患を処置、予防または改善する方法を提供し、その方法は、本発明のアプタマーを投与する必要がある患者に投与する工程を含む。本発明のさらに別の局面において、本発明のアプタマーを試験組成物と接触させる工程およびIL-23の有無を検出する工程を含む診断方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0079】

(発明の詳細な説明)

本発明の1つ以上の実施形態の詳細を以下に添付する説明に示す。本明細書中に記載するものと類似または等価である任意の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料をここに記載する。本発明の他の特性、目的および利点は、この説明により明らかになるであろう。明細書において、単数形は、文脈が明らかに他のものを規定していない限り、複数形も含む。他に定義されない限り、本明細書中で使用される技術用語および科学用語のすべては、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されているものと同じ意味を有する。矛盾する場合は、本明細書が、支配するものである。

【0080】

(SELEX<sup>TM</sup>法)

アプタマーの作製に適した方法は、図2に大まかに示す「指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)(「SELEX<sup>TM</sup>」)」という名称が与えられたプロセスを用いるものである。SELEX<sup>TM</sup>プロセスは、標的分子に対して高度に特異的に結合する核酸分子をインビトロで進化させるための方法であり、例えば、1990年1月11日に出願され、現在は放棄されている米国特許出願番号07/536,428、「Nucleic Acid Ligands」と題された米国特許第5,475,096号および「Nucleic Acid Ligands」と題された米国特許第5,270,163号(WO91/19813もまた参照のこと)に記載されている。SELEX<sup>TM</sup>で同定された核酸リガンドの各々、すなわち、各アプタマーは、所与の標的化合物または標的分子に特異的なリガンドである。SELEX<sup>TM</sup>プロセスは、核酸が、種々の2次元構造および3次元構造を形成するために十分な容量を有し、かつ単量体であっても多量体であってもよい実質的に任意の化合物とともにリガンドとして作用する(すなわち、特定の結合対を形成する)それらのモノマー内で利用可能な十分な化学的万能性を有するという独特の見識に基づくものである。任意のサイズの分子または組成物が、標的として働き得る。

【0081】

SELEX<sup>TM</sup>は、出発点として、ランダム化された配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチドの大きなライブラリーまたはプールに依存している。それらのオリゴヌクレオチドは、改変されているか、または改変されていないDNA、RNAまたはDNA/RNAハイブリッドであり得る。いくつかの実施例において、そのプールは、100%ランダムか、または部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の実施例において、そのプールは、ランダム化配列の内部に組み込まれた少なくとも1つの固定配列および/または保存配列を含む、ランダムか、または部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。他の実施例において、そのプールは、オリゴヌクレオチドプールのすべての分子によって共有されている配列を含み得る、5'および/または3'末端に少なくとも1つの固定配列および/または保存配列を含むランダムか、または部分的にランダムなオリゴヌクレオチドを含む。固定配列は、予め選択された目的に対して組み込まれている、プール内のオリゴヌクレオチドに共有の配列(例えば、以下でさらに記載されるCpGモチーフ、PCRプライマーのハイブリダイゼーション部位、RNAポリメラーゼ(例えば、T3、T4、T7およびSP6)のプロモーター配列、制限酵素認識部位またはホモポリマー配列(例えば、ポリAまたはポリT域)、触媒コア、アフィニティーカラムに対して選択的に結合する

ための部位ならびに目的のオリゴヌクレオチドのクローニングおよび/または配列決定を容易にする他の配列)である。保存配列は、同じ標的に結合する多くのアダプターによって共有される配列で、先に記載された固定配列以外の配列である。

#### 【0082】

プールのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、ランダム化配列部分ならびに効率的な増幅に必要な固定配列を含む。代表的には、出発プールのオリゴヌクレオチドは、30~50個のランダムヌクレオチドの内部領域に隣接した、固定された5'および3'末端配列を含む。そのランダム化ヌクレオチドは、多くの方法において生成され得、その方法としては、化学合成およびランダムに切断された細胞内の核酸からのサイズ選別が挙げられる。試験核酸中の配列バリエーションはまた、選別/増幅を繰り返す前またはその最中に突然変異誘発によって導入または増加され得る。

10

#### 【0083】

オリゴヌクレオチドのランダム配列部分は、任意の長さであり得、リボヌクレオチドおよび/またはデオキシリボヌクレオチドを含み得、そして、改変されているか、または非天然のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含み得る。例えば、米国特許第5,958,691号;米国特許第5,660,985号;米国特許第5,958,691号;米国特許第5,698,687号;米国特許第5,817,635号;米国特許第5,672,695号およびPCT公開WO92/07065を参照のこと。ランダムオリゴヌクレオチドは、当該分野で周知の固相オリゴヌクレオチド合成技術を用いて、ホスホジエステル結合したヌクレオチドから合成され得る。例えば、Froehlerら、Nucl. Acid Res. 14:5399-5467(1986)およびFroehlerら、Tet. Lett. 27:5575-5578(1986)を参照のこと。ランダムオリゴヌクレオチドはまた、トリエステル合成法などの液相法を用いても合成され得る。例えば、Soodら、Nucl. Acid Res. 4:2557(1977)およびHiroseら、Tet. Lett., 28:2449(1978)を参照のこと。自動DNA合成装置において行われる代表的な合成により、 $10^{14}$ ~ $10^{16}$ 個の個別分子が得られ、その数は、ほとんどのSELEX<sup>TM</sup>実験に十分な数である。配列設計物中のランダム配列が十分に大きな領域であることにより、合成分子の各々が、固有配列を示し得る確率が高まる。

20

#### 【0084】

オリゴヌクレオチドの出発ライブラリーは、DNA合成装置において、自動化された化学合成によって作製され得る。ランダム化配列を合成するために、合成プロセス内の各ヌクレオチド添加工程において4種すべてのヌクレオチド混合物が加えられることにより、ヌクレオチドのランダムな取り込みが可能となる。上で述べたように、1つの実施形態において、ランダムオリゴヌクレオチドは、完全にランダムな配列を含む;しかしながら、他の実施形態では、ランダムオリゴヌクレオチドは、ランダムでないか、または部分的にランダムな一続きの配列を含み得る。部分的にランダムな配列は、各添加工程において異なったモル比で4種のヌクレオチドを加えることにより作製され得る。

30

#### 【0085】

オリゴヌクレオチドの出発ライブラリーは、RNAであってもDNAであってもよい。RNAライブラリーが出発ライブラリーとして使用される場合、RNAライブラリーは、代表的には、T7RNAポリメラーゼまたは改変T7RNAポリメラーゼを用いてDNAライブラリーをインビトロにおいて転写することによって生成され、そして精製される。次いで、そのRNAまたはDNAライブラリーは、結合に好ましい条件下で標的と混合され、そして、結合親和性および選択性の実質的に任意の所望の基準を達成する同じ一般的セレクションスキームを用いて、結合、分別および増幅の段階的な反復に供される。より詳細には、核酸の出発プールを含む混合物から出発するとき、SELEX<sup>TM</sup>法は、以下の工程:(a)結合に好ましい条件下で、混合物を標的と接触させる工程;(b)標的分子に対して特異的に結合した核酸から未結合核酸を分別する工程;(c)核酸-標的複合体を解離させる工程;(d)核酸-標的複合体から解離された核酸を増幅して、リガンド

40

50

- 核酸濃縮混合物を得る工程；および ( e ) 標的分子に対して高度に特異的で、高親和性の核酸リガンドを得るのに望まれる回数サイクルを通じて、結合、分別、解離および増幅の工程を反復する工程を含む。RNA アプタマーが選択される場合、S E L E X <sup>T M</sup> 法は、以下の工程：( i ) 工程 ( d ) の増幅の前に核酸 - 標的複合体から解離された核酸を逆転写する工程；および ( i i ) プロセスを再開する前に、工程 ( d ) から増幅された核酸を転写する工程をさらに含む。

【 0 0 8 6 】

可能性のある大量の配列および構造を含む核酸混合物の中には、所与の標的に対して、多岐にわたる結合親和性が存在する。例えば、20ヌクレオチドのランダム化セグメントを含んでいる核酸混合物は、 $4^{20}$  個の候補の可能性があり得る。標的に対してより高い親和定数を有するものが、標的に結合する可能性が最も高い。分別、解離および増幅の後、より結合親和性が高い候補について濃縮された第2の核酸混合物が作製される。生じる核酸混合物がただ1つの配列または数個の配列から主に構成されるまで、セレクションをさらに繰り返すことにより、徐々に最良のリガンドに絞っていく。次いで、これらをクローニングし、配列決定し、そして純粋なリガンドまたはアプタマーとして個別に結合親和性について試験することができる。

10

【 0 0 8 7 】

所望の目標が達成されるまで、セレクションおよび増幅のサイクルを繰り返す。最も一般的な場合では、サイクルを反復しても結合強度が有意に向上しなくなるまでセレクション/増幅を続ける。代表的には、約  $10^{14}$  個の異なる核酸種を標本抽出するためにこの方法を用いるが、約  $10^{18}$  個程度の異なる核酸種が標本抽出するために使用することができる。一般に、核酸アプタマー分子は、5 ~ 20 サイクルの手順により選別される。1つの実施形態において、初期のセレクション段階においてのみ不均一性が導入され、複製プロセスを通してでは不均一性は生じない。

20

【 0 0 8 8 】

S E L E X <sup>T M</sup> の1つの実施形態において、セレクションプロセスは、選ばれた標的に対して最も強く結合する核酸リガンドを単離する際に非常に有効であるので、たった1サイクルのセレクションおよび増幅が必要となるだけである。このように有効なセレクションは、例えば、クロマトグラフィのタイプのプロセスにおいて生じ得、ここで、カラムに結合している標的に核酸が会合する能力は、そのカラムが、最も親和性の高い核酸リガンドの分離および単離を十分に可能にし得るような様式において機能する。

30

【 0 0 8 9 】

多くの場合において、単一の核酸リガンドが特定されるまで必ずしも S E L E X <sup>T M</sup> の反復工程を行うことが望ましいわけではない。標的特異的な核酸リガンド溶液は、多くの保存配列および、標的に対する核酸リガンドの親和性に著しく影響することなく置換または付加され得る多くの配列を有する核酸構造またはモチーフのファミリーを含み得る。完了する前に S E L E X <sup>T M</sup> プロセスを終結することにより、核酸リガンド溶液ファミリーの多数のメンバーの配列を決定することができる。

【 0 0 9 0 】

種々の核酸の1次、2次および3次構造が存在することは公知である。非 Watson - Crick タイプの相互作用に關与すると最もよく示されている構造またはモチーフは、ヘアピンループ、対称パルジおよび非対称パルジ、シュードノットおよびそれらの無数の組み合わせと呼ばれる。そのようなモチーフの公知の事例のほとんどすべてが、30ヌクレオチド以下の核酸配列において形成され得ることを示唆している。この理由により、隣接するランダム化セグメントを用いる S E L E X <sup>T M</sup> 手順が、約20 ~ 約50ヌクレオチド、およびいくつかの実施形態において、約30 ~ 約40ヌクレオチドのランダム化セグメントを含む核酸配列で開始されることが好ましい場合が多い。1つの実施例において、5' - 固定 : ランダム : 3' - 固定配列は、約30 ~ 約50ヌクレオチドのランダム配列を含む。

40

【 0 0 9 1 】

50

中心となる S E L E X<sup>T M</sup> 法は、多くの特定の目的を達成するために改変されてきた。例えば、米国特許第 5, 707, 796 号では、ベント DNA などの特定の構造的特性を有する核酸分子を選別するために S E L E X をゲル電気泳動と組み合わせて使用することが記載されている。米国特許第 5, 763, 177 号では、標的分子に結合および/または光架橋および/または光不活化することができる光応答基を含む核酸リガンドを選別するための S E L E X<sup>T M</sup> ベースの方法が記載されている。米国特許第 5, 567, 588 号および米国特許第 5, 861, 254 号では、標的分子に対する親和性が高いオリゴヌクレオチドと低いオリゴヌクレオチドとの分別が高度に効果的に達成される S E L E X<sup>T M</sup> ベースの方法が記載されている。米国特許第 5, 496, 938 号では、S E L E X<sup>T M</sup> プロセスが行われた後に改善された核酸リガンドを得るための方法が記載されている。米国特許第 5, 705, 337 号では、リガンドをその標的に共有結合するための方法が記載されている。

10

#### 【0092】

S E L E X<sup>T M</sup> を使用して、標的分子上の 2 つ以上の部位に結合する核酸リガンドおよび標的上の特定の部位に結合する非核酸種を含む核酸リガンドを得ることもできる。S E L E X<sup>T M</sup> により、大型および小型の生体分子（例えば、核酸 - 結合タンパク質およびその生物学的機能の一部として核酸と結合することが知られていないタンパク質ならびに補助因子および他の小分子）を含む任意の想定可能な ( e n v i s i o n a b l e ) 標的に結合する核酸リガンドを単離し、同定するための手段がもたらされる。例えば、米国特許第 5, 580, 737 号では、カフェインおよび密接に関連するアナログであるテオフィリンに高親和性で結合することができる、S E L E X<sup>T M</sup> を通じて同定された核酸配列が開示されている。

20

#### 【0093】

C o u n t e r - S E L E X<sup>T M</sup> は、1 つ以上の非標的分子に対して交差反応性を有する核酸リガンド配列を排除することによって標的分子に対する核酸リガンドの特異性を改善するための方法である。C o u n t e r - S E L E X<sup>T M</sup> は、以下の工程：( a ) 候補核酸混合物を調製する工程；( b ) その候補混合物と標的とを接触させる工程（ここで、標的に対する親和性が候補混合物と比べて高い核酸は、候補混合物の残りから分別される）；( c ) 候補混合物の残りから親和性の高い核酸を分別する工程；( d ) 親和性の高い核酸を標的から解離する工程；( e ) 親和性の高い核酸と、1 つ以上の非標的分子とを接触させる工程（非標的分子に対して特定の親和性を有する核酸リガンドは除去される）；および ( f ) 標的分子に対してのみ特定の親和性を有する核酸を増幅することにより、標的分子への結合に対して比較的高い親和性および特異性を有する核酸配列について濃縮された核酸の混合物を得る工程から構成される。S E L E X<sup>T M</sup> について上で記載したように、所望の目標が達成されるまで、必要に応じてセレクションおよび増幅のサイクルを繰り返す。

30

#### 【0094】

治療薬およびワクチンとして核酸を使用する際に遭遇する 1 つの潜在的な問題は、ホスホジエステル型でのオリゴヌクレオチドが、所望の効果を発揮する前に、細胞内および細胞外の酵素（例えば、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ）によって体液中で急速に分解され得ることである。ゆえに、S E L E X<sup>T M</sup> 法は、リガンドに特性の改善（例えば、インピボ安定性の改善または送達特性の改善）をもたらす改変ヌクレオチドを含む高親和性の核酸リガンドの同定を包含する。そのような改変の例としては、リボースおよび/またはリン酸および/または塩基の位置における化学的置換が挙げられる。S E L E X<sup>T M</sup> で同定される改変ヌクレオチド含有核酸リガンドは、例えば、リボースの 2' 位、ピリミジンの 5 位およびプリン の 8 位において化学改変されたヌクレオチド誘導体を含むオリゴヌクレオチドについて記載している米国特許第 5, 660, 985 号、様々な 2' - 改変ピリミジンを含むオリゴヌクレオチドについて記載している米国特許第 5, 756, 703 号、ならびに 2' - アミノ ( 2' - N H<sub>2</sub> )、2' - フルオロ ( 2' - F ) および/または 2' - O - メチル ( 2' - O M e ) 置換基で改変された 1 つ以上のヌクレオ

40

50

チドを含む非常に特異的な核酸リガンドについて記載している米国特許第5,580,737号に記載されている。

【0095】

本発明において企図される核酸リガンドの改変としては、核酸リガンド塩基または核酸リガンド全体にさらなる電荷、分極率、疎水性、水素結合、静電的相互作用および流動性を組み込む他の化学基をもたらす改変が挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレアーゼに抵抗性のオリゴヌクレオチド集団を作製するための改変としては、1つ以上の別のヌクレオチド間結合、糖の変更、塩基の変更またはそれらの組み合わせも挙げられ得る。そのような改変としては、2'位の糖の改変、5位のピリミジンの改変、8位のプリン  
10  
の改変、環外のアミンにおける改変、4-チオウリジンの置換、5-プロモ-ウラシルまたは5-ヨード-ウラシルの置換；骨格の改変、ホスホロチオエートまたはアルキルホスフェートの改変、メチル化および通常でない塩基対の組み合わせ（例えば、イソ塩基のイソシチジンおよびイソグアノシン）が挙げられるが、これらに限定されない。改変はまた、キャッピングなどの3'および5'改変も含み得る。

【0096】

1つの実施形態において、P(O)O基が、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、P(O)NR<sub>2</sub>（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH<sub>2</sub>（「ホルムアセタール」）または3'-アミン（-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-）（ここで、RまたはR'の各々は、独立してHまたは置換もしくは非置換アルキルである）によって置換されているオリゴヌクレオチドが提供される。結合基は、  
20  
-O-、-N-または-S-結合を介して隣接ヌクレオチドに結合され得る。オリゴヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。本明細書中で使用されるとき、用語ホスホロチオエートとは、ホスホジエステル結合において、1つ以上の硫黄原子によって置換された1つ以上の非架橋酸素原子を含む。

【0097】

さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、改変糖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上がハロゲン、脂肪族基で置換されているか、またはエーテルまたはアミンとして官能性付与されている。1つの実施形態において、フラノース残基の2'位が、  
30  
O-メチル、O-アルキル、O-アリル、S-アルキル、S-アリルまたはハロ基のいずれかによって置換されている。2'改変糖の合成方法は、例えば、Sproatら、Nucleic Acid Res. 19:733-738(1991)；Cottenら、Nucleic Acid Res. 19:2629-2635(1991)；およびHobbsら、Biochemistry 12:5138-5145(1973)に記載されている。他の改変が、当業者に公知である。そのような改変は、PRESELEX<sup>TM</sup>プロセス改変であっても、POSTSELEX<sup>TM</sup>プロセス改変（先に同定された非改変リガンドの改変）であってもよく、またはPRESELEX<sup>TM</sup>プロセスに組み込むことによって行ってもよい。

【0098】

PRESELEX<sup>TM</sup>プロセス改変またはSELEX<sup>TM</sup>プロセスに組み込むことによ  
40  
って行われる改変により、SELEX<sup>TM</sup>標的に対する特異性と改善された安定性、例えば、インピボ安定性の両方を備えた核酸リガンドが得られる。核酸リガンドになされるPOSTSELEX<sup>TM</sup>プロセス改変により、核酸リガンドの結合能力に悪影響を及ぼさず、安定性、例えば、インピボ安定性の改善をもたらされ得る。

【0099】

SELEX<sup>TM</sup>法は、米国特許第5,637,459号および米国特許第5,683,867号に記載されたように、選択されたオリゴヌクレオチドを他の選択されたオリゴヌクレオチドおよび非オリゴヌクレオチド機能単位と混合する工程を包含する。SELEX<sup>TM</sup>法は、例えば、米国特許第6,011,020号、米国特許第6,051,698号  
50  
およびPCT公開番号WO98/18480に記載されているように、選択された核酸リガンドを診断的複合体または治療的複合体中の親油性または非免疫原性の高分子量化合物

と混合する工程をさらに包含する。これらの特許および出願は、広範なアレイの形状および他の特性と、オリゴヌクレオチドの効率的な増幅および複製の特性ならびに他の分子の望ましい特性との組み合わせを教示している。

【0100】

低分子で可撓性のペプチドに対する核酸リガンドの S E L E X<sup>T M</sup> 法を介した同定もまた、探索されてきた。低分子ペプチドは、可撓性構造を有し、通常は、複数の配座異性体が平衡状態である溶液中に存在するので、その結合親和性は、可撓性ペプチドと結合する際に失われる配座エントロピーによって制限され得ると最初は考えられていた。しかしながら、溶液中の低分子ペプチドに対して核酸リガンドを同定できる可能性が、米国特許第 5,648,214 号において証明された。この特許において、11 アミノ酸ペプチドである物質 P に対する高親和性 RNA 核酸リガンドが同定された。

10

【0101】

本発明の標的に対する特異性および結合親和性を有するアプタマーは、代表的には、本明細書中に記載するような S E L E X<sup>T M</sup> プロセスによって選択される。S E L E X<sup>T M</sup> プロセスの一部として、標的に結合するために選択された配列を、必要に応じて最小化することにより、所望の結合親和性を有する最小配列が決定する。選択された配列および/または最小化された配列は、結合親和性を高めるために配列のランダム突然変異誘発または定方向突然変異誘発を行うことによって、あるいは、配列中のどの位置が、結合活性にとって必須であるかを判定することによって、必要に応じて最適化される。さらに、インビボでの分解に対してアプタマー分子を安定化するために改変ヌクレオチドを組み込んだ配列を用いてセレクションを行うことができる。

20

【0102】

(2' 改変 S E L E X<sup>T M</sup>)

アプタマーが治療薬としての使用に適するために、アプタマーは、好ましくは、合成が安価で、安全で、そしてインビボにおいて安定である。野生型 RNA および DNA のアプタマーは、ヌクレアーゼによる分解を受けやすいので、代表的にはインビボにおいて安定でない。ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性は、改変基を 2' 位に組み込むことにより大きく増大させることができる。

【0103】

フルオロ基およびアミノ基は、後にアプタマーが選択されるオリゴヌクレオチドプールにうまく組み込まれてきた。しかしながら、これらの改変により、得られるアプタマーの合成コストが非常に高くなり、また、いくつかの場合において、改変ヌクレオチドは、改変オリゴヌクレオチドの分解および DNA 合成用の基質として後にヌクレオチドを使用することによって、宿主 DNA 中に再循環され得る可能性があるために、安全性の問題を引き起こし得る。

30

【0104】

2'-O-メチル(「2'-OMe」)ヌクレオチドを含むアプタマーは、本明細書中で提供されるとき、これらの欠点の多くを克服する。2'-OMeヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ抵抗性であり、合成が安価である。2'-OMeヌクレオチドは、生体系において遍在性であるが、天然のポリメラーゼは、生理学的条件下において 2'-OMe NTP を基質として認めないので、宿主 DNA への 2'-OMeヌクレオチドの再循環に対する安全性の問題はない。2'-改変アプタマーを作製するために使用される S E L E X<sup>T M</sup> 法は、例えば、2002 年 12 月 3 日出願の米国仮特許出願番号 60/430,761、2003 年 7 月 15 日出願の米国仮特許出願番号 60/487,474、2003 年 11 月 4 日出願の米国仮特許出願番号 60/517,039、2003 年 12 月 3 日出願の米国特許出願番号 10/729,581 および「Method for in vitro Selection of 2'-O-methyl Substituted Nucleic Acids」と題された 2004 年 6 月 21 日出願の米国特許出願番号 10/873,856 (これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として援用される)に記載されている。

40

50

## 【0105】

本発明は、IL-23および/またはIL-12に結合し、そしてそれらの機能を調節するアプタマーを含み、そのアプタマーは、改変ヌクレオチド（例えば、2'位に改変を有するヌクレオチド）を含むことにより、オリゴヌクレオチドを、非改変オリゴヌクレオチドよりも酵素的分解および化学的分解ならびに熱分解および物理的分解に対して安定にするものである。文献（例えば、Greenら、*Current Biology* 2, 683-695, 1995）に2'-OMe含有アプタマーのいくつかの例が存在するが、これらは、CおよびU残基が、2'-フルオロ（2'-F）置換されており、AおよびG残基が、2'-OHである改変転写産物のライブラリーのインビトロセクションによって作製されたものである。機能的配列が同定されたら、AおよびG残基の各々を、2'-OMe置換に対する許容性について試験し、そして、2'-OMe置換に許容性を示したすべてのAおよびG残基を2'-OMe残基として有するアプタマーを再合成した。この2工程様式において作製されるアプタマーのAおよびG残基のほとんどは、2'-OMe残基による置換が許容されるが、平均して、約20%は許容されない。その結果として、この方法を用いて作製されたアプタマーは、2~4個の2'-OH残基を含む傾向にあり、結果として、安定性および合成コストが悪くなる。SELEX<sup>TM</sup>（および/またはその変法および改良法のいずれか（本明細書中に記載されるものを含む））によってアプタマーが選別され、濃縮されるオリゴヌクレオチドプールにおいて使用される安定化オリゴヌクレオチドを作製する転写反応に改変ヌクレオチドを組み込むことにより、本発明の方法では、選択されたアプタマーオリゴヌクレオチドを安定化する必要がなくなる（例えば、改変ヌクレオチドを用いてアプタマーオリゴヌクレオチドを再合成することによって）。

10

20

## 【0106】

1つの実施形態において、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTPおよびUTPヌクレオチドの2'-OH、2'-F、2'-デオキシおよび2'-OMe改変を組み合わせたアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTPおよびUTPヌクレオチドの2'-OH、2'-F、2'-デオキシ、2'-OMe、2'-NH<sub>2</sub>および2'-メトキシエチル改変を組み合わせたアプタマーを提供する。別の実施形態において、本発明は、ATP、GTP、CTP、TTPおよびUTPヌクレオチドの2'-OH、2'-F、2'-デオキシ、2'-OMe、2'-NH<sub>2</sub>および2'-メトキシエチル改変の5<sup>6</sup>個の組み合わせを含むアプタマーを提供する。

30

## 【0107】

本発明の2'改変アプタマーは、改変ポリメラーゼ、例えば、改変T7ポリメラーゼを使用して作製され、その改変ポリメラーゼは、フラノース2'位にかさ高い置換基を有する改変ヌクレオチドを、野生型ポリメラーゼが取り込む割合よりも高い割合で取り込む。例えば、639位のチロシン残基がフェニルアラニンに変化している単変異T7ポリメラーゼ（Y639F）は、2'デオキシ、2'アミノ-および2'フルオロ-ヌクレオチド三リン酸（NTP）を基質として容易に利用し、種々の用途のための改変RNAを合成するために広く使用されている。しかしながら、この変異T7ポリメラーゼは、報告によれば、かさ高い2'置換基（例えば、2'-OMeまたは2'-アジド（2'-N<sub>3</sub>）置換基）を有するNTPを容易に利用する（すなわち、取り込む）ことができない。かさ高い2'置換基を取り込むために、Y639F変異に加えて、784位のヒスチジンがアラニン残基に変化しているT7ポリメラーゼ二重変異体（Y639F/H784A）が報告されており、限られた状況において、改変ピリミジンNTPを取り込むために使用されている。Padilla, R. and Sousa, R., *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(24): 138を参照のこと。784位のヒスチジンがアラニン残基に変化している単変異T7ポリメラーゼ（H784A）もまた報告されている。Padillaら、*Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 138を参照のこと。Y639F/H784A二重変異体とH784A単変異体のT7ポリメラーゼの両方において、アラニンなどのより小さいアミノ酸残基への変更により、より

40

50

かさ高いヌクレオチド基質、例えば、2'-OMe置換ヌクレオチドの取り込みが可能となる。

【0108】

一般に、本明細書中で開示される条件下において、GTP以外のすべての2'-OMe置換NTPを取り込むためにY693F単変異体を使用することができること、およびGTPを含むすべての2'-OMe置換NTPを取り込むためにY639F/H784A二重変異体を使用することができることを見出されている。H784A単変異体は、本明細書中で開示される条件下で使用されるとき、Y639FおよびY639F/H784A変異体と類似の特性を有すると考えられる。

【0109】

2'-改変オリゴヌクレオチドは、改変ヌクレオチドからか、または改変ヌクレオチドのサブセットから完全に合成され得る。その改変は、同じであっても異なってもよい。すべてのヌクレオチドが改変され得、また、すべてが同じ改変を含み得る。すべてのヌクレオチドが改変され得るが、異なる改変を含む、例えば、同じ塩基を含むすべてのヌクレオチドが1つのタイプの改変を有し得、他の塩基を含むヌクレオチドは、異なるタイプの改変を有し得る。すべてのプリンヌクレオチドが、1つのタイプの改変を有し得（または改変されず）、すべてのピリミジンヌクレオチドが、別の異なるタイプの改変を有する（または改変されない）。このように、任意の組み合わせの改変（例えば、リボヌクレオチド（2'-OH）、デオキシリボヌクレオチド（2'-デオキシ）、2'-Fおよび2'-OMeヌクレオチドを含む）を用いて、転写産物または転写産物のプールが作製される。2'-OMe CおよびUおよび2'-OH AおよびGを含む転写混合物は、「rRmY」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「rRmY」アダプターと呼ばれる。デオキシAおよびGならびに2'-OMe UおよびCを含む転写混合物は、「dRmY」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「dRmY」アダプターと呼ばれる。2'-OMe A、CおよびUならびに2'-OH Gを含む転写混合物は、「rGmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「rGmH」アダプターと呼ばれる。2'-OMe A、C、UおよびGならびに2'-OMe A、UおよびCならびに2'-F Gを交互に含む転写混合物は、「交互(alternating)混合物」と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「交互混合物」アダプターと呼ばれる。2'-OMe A、U、CおよびGを含む転写混合物は、そのGの10%以下がリボヌクレオチドである場合、「r/mGmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「r/mGmH」アダプターと呼ばれる。2'-OMe A、UおよびCならびに2'-F Gを含む転写混合物は、「fGmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「fGmH」アダプターと呼ばれる。2'-OMe A、UおよびCならびにデオキシGを含む転写混合物は、「dGmH」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「dGmH」アダプターと呼ばれる。デオキシAならびに2'-OMe C、GおよびUを含む転写混合物は、「dAmB」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「dAmB」アダプターと呼ばれる。そしてすべての2'-OHヌクレオチドを含む転写混合物は、「rN」混合物と呼ばれ、そこから選択されたアダプターは、「rN」または「rRrY」アダプターと呼ばれる。「mRmY」アダプターは、すべての2'-O-メチルヌクレオチドを含むアダプターであり、可能であれば、任意の2'-OH Gを2'-OMe Gで置換するときのポストSELEX<sup>TM</sup>置換によってr/mGmHオリゴヌクレオチドから通常誘導される。

【0110】

好ましい実施形態は、2'-OH、2'-デオキシおよび2'-OMeヌクレオチドの任意の組み合わせを含む。より好ましい実施形態は、2'-デオキシと2'-OMeヌクレオチドとの任意の組み合わせを含む。さらにより好ましい実施形態は、ピリミジンが、2'-OMe（例えば、dRmY、mRmYまたはdGmH）である2'-デオキシおよび2'-OMeヌクレオチドの任意の組み合わせによるものである。

【0111】

10

20

30

40

50

本発明のアプタマーへの改変ヌクレオチドの組み込みは、セレクションプロセスの前（プレセレクションプロセス）（例えば、プレSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変）に達成される。必要に応じて、改変ヌクレオチドがプレSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変によって組み込まれた本発明のアプタマーは、ポストSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変によってさらに改変され得る（すなわち、プレSELEX<sup>T M</sup>改変の後にポストSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変）。プレSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変により、SELEX<sup>T M</sup>標的に対する特異性を有する改変核酸リガンドおよびインピボでの安定性の改善がもたらされる。ポストSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変、すなわち、改変（例えば、プレSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変によって組み込まれるヌクレオチドを有する先に同定されたりリガンドの切断、欠失、置換または付加によるヌクレオチド改変）により、プレSELEX<sup>T M</sup>プロセス改変によって組み込まれたヌクレオチドを有する核酸リガンドの結合能力に悪影響を及ぼすことなく、インピボでの安定性のさらなる改善がもたらされ得る。

10

## 【0112】

ポリメラーゼが2'-改変NTPを許容する条件において2'-改変（例えば、2'-OMe）RNA転写産物のプールを作製するために好ましいポリメラーゼは、Y693F/H784A二重変異体またはY693F単変異体である。他のポリメラーゼ、具体的には、かさ高い2'-置換基に対して高い許容性を示すポリメラーゼもまた、本発明において使用することができる。そのようなポリメラーゼは、本明細書中で開示される転写条件下で改変ヌクレオチドを組み込む能力をアッセイすることによって、この能力についてスクリーニングされ得る。

20

## 【0113】

本明細書中で開示される方法において有用な転写条件について重要である多くの因子が決定されてきた。例えば、得られる転写産物の少なくとも最初の約6残基が、すべてプリンとなるように、DNA転写鋳型の5'末端における固定配列の5'末端にリーダー配列が組み込まれているときに改変転写産物の収率の上昇が観察される。

## 【0114】

改変ヌクレオチドを組み込んでいる転写産物を得る際に重要な別の因子は、2'-OH GTPの存在または濃度である。転写は、2つの相に分割され得る：第1相は、開始であり、この間に、NTPが、GTP（または別の置換グアノシン）の3'-ヒドロキシル末端に付加されてジヌクレオチドが得られ、次いでそのジヌクレオチドが、約10~12ヌクレオチド伸長される；第2相は、伸長であり、この間に、転写は最初の約10~12ヌクレオチドの付加を超えて進む。過剰量の2'-OMe GTPを含む転写混合物に加えらる少量の2'-OH GTPは、ポリメラーゼが、2'-OH GTPを用いて転写を開始することが可能となるのに十分であるが、一旦転写が伸長相に入ると、2'-OMeと2'-OH GTPとの識別性が低下すること、および2'-OH GTPに対して2'-OMeが過剰となることにより、主に2'-OMe GTPの取り込みが可能となることを見出されている。

30

## 【0115】

転写産物への2'-OMe置換ヌクレオチドの組み込みにおける別の重要な因子は、転写混合物において二価のマグネシウムとマンガンの両方を使用することである。塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの濃度の様々な組み合わせが、2'-O-メチル化転写産物の収率に影響を及ぼすことを見出されており、塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの最適濃度は、二価金属イオンを錯化するNTPの転写反応混合物中の濃度に左右される。最大限に2'置換されたO-メチル化転写産物（すなわち、A、CおよびUのすべてならびにGヌクレオチドの約90%）の最高の収率を得るためには、各NTPが、0.5 mMの濃度で存在するとき、約5 mM塩化マグネシウムおよび1.5 mM塩化マンガンの濃度が、好ましい。各NTPの濃度が1.0 mMであるとき、約6.5 mM塩化マグネシウムおよび2.0 mM塩化マンガンの濃度が好ましい。各NTPの濃度が2.0 mMであるとき、約9.6 mM塩化マグネシウムおよび2.9 mM塩化マンガンの濃度が、好ましい。いずれの場合においても、これらの濃度からの2倍以下の逸脱であれば、さらにかかりの量

40

50

の改変転写産物がもたらされる。

【0116】

GMPまたはグアノシンで転写を開始することもまた重要である。この作用は、開始ヌクレオチドに対するポリメラーゼの特異性から生じるものである。結果として、この様式において生成される任意の転写産物の5'-末端のヌクレオチドは、2'-OH Gである可能性がある。GMP（またはグアノシン）の好ましい濃度は、0.5 mMであり、さらにより好ましくは1 mMである。転写反応においてPEG、好ましくはPEG-8000を含むことが、改変ヌクレオチドの取り込みを最大にするために有用であることも見出されている。

【0117】

転写産物への2'-OMe ATP (100%)、UTP (100%)、CTP (100%) およびGTP (約90%) (「r/mGmH」) の取り込みを最大限にするためには、以下の条件が好ましい：200 mMのHEPES緩衝液、40 mMのDTT、2 mMのスペルミジン、10% (w/v) のPEG-8000、0.01% (w/v) のTriton X-100、5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が1.0 mMである場合は6.5 mM) のMgCl<sub>2</sub>、1.5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が1.0 mMである場合は2.0 mM) のMnCl<sub>2</sub>、500 μM (より好ましくは、1.0 mM) の2'-OMe NTP (各々)、30 μMの2'-OH GTP、500 μM, pH 7.5の2'-OH GMP、15単位/mLのY639F/H784A T7RNAポリメラーゼ、5単位/mLの無機ピロホスファターゼおよび少なくとも8ヌクレオチド長のすべてプリンのリーダー配列。本明細書中で使用されるとき、Y639F/H784A変異T7RNAポリメラーゼ (または本明細書中で特定される他の任意の変異T7RNAポリメラーゼ) の1単位は、r/mGmH条件下で1ナノモルの2'-OMe NTPを転写産物に組み込むために必要な酵素の量と定義される。本明細書中で使用されるとき、無機ピロホスファターゼの1単位は、pH 7.2および25において、1分あたりに1.0モルの無機オルトホスフェートを遊離する酵素の量と定義される。

【0118】

転写産物への2'-OMe ATP、UTPおよびCTP (「rGmH」) の組み込みを最大限 (100%) にするためには、以下の条件が好ましい：200 mMのHEPES緩衝液、40 mMのDTT、2 mMのスペルミジン、10% (w/v) のPEG-8000、0.01% (w/v) のTriton X-100、5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が2.0 mMである場合は9.6 mM) のMgCl<sub>2</sub>、1.5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が2.0 mMである場合は2.9 mM) のMnCl<sub>2</sub>、500 μM (より好ましくは、2.0 mM), pH 7.5の2'-OMe NTP (各々)、15単位/mLのY639F T7RNAポリメラーゼ、5単位/mLの無機ピロホスファターゼおよび少なくとも8ヌクレオチド長のすべてプリンのリーダー配列。

【0119】

転写産物への2'-OMe UTPおよびCTP (「rRmY」) の組み込みを最大限 (100%) にするためには、以下の条件が好ましい：200 mMのHEPES緩衝液、40 mMのDTT、2 mMのスペルミジン、10% (w/v) のPEG-8000、0.01% (w/v) のTriton X-100、5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が2.0 mMである場合は9.6 mM) のMgCl<sub>2</sub>、1.5 mM (各2'-OMe NTPの濃度が2.0 mMである場合は2.9 mM) のMnCl<sub>2</sub>、500 μM (より好ましくは、2.0 mM), pH 7.5の2'-OMe NTP (各々)、15単位/mLのY639F/H784A T7RNAポリメラーゼ、5単位/mLの無機ピロホスファターゼおよび少なくとも8ヌクレオチド長のすべてプリンのリーダー配列。

【0120】

転写産物へのデオキシATPおよびGTPならびに2'-OMe UTPおよびCTP (「dRmY」) の組み込みを最大限 (100%) にするためには、以下の条件が好ましい：200 mMのHEPES緩衝液、40 mMのDTT、2 mMのスペルミン、2 mMの

10

20

30

40

50



ヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-OHシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-OHウリジンである配列を含む。rN転写のより好ましい実施形態において、本発明の得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHウリジンである配列を含む。rN転写の最も好ましい実施形態において、本発明の改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-OHアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-OHシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-OHウリジンである配列を含む。

10

20

30

40

50

**【0125】**

本発明のrRmY転写条件下において、転写反応混合物は、2'-OHアデノシン三リン酸、2'-OHグアノシン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸および2'-O-メチルウリジン三リン酸を含む。本発明のrRmY転写混合物を用いて生成される改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-OHアデノシン、2'-OHグアノシン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-O-メチルウリジンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-OHアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-OHアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。

**【0126】**

本発明のdRmY転写条件下において、転写反応混合物は、2'-デオキシアデノシン三リン酸、2'-デオキシグアノシン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸および2'-O-メチルウリジン三リン酸を含む。本発明のdRmY転写条件を用いて生成される改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-O-メチルウリジンを含む。好ましい実施形態において、本発明の得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-デオキシグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、本発明の得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-デオキシグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、本発明の得られる改変オリゴ

ヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-デオキシグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。

【0127】

本発明のrGmH転写条件下において、転写反応混合物は、2'-OHグアノシン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸、2'-O-メチルウリジン三リン酸および2'-O-メチルアデノシン三リン酸を含む。本発明のrGmH転写混合物を用いて生成される改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-OHグアノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルウリジンおよび2'-O-メチルアデノシンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルアデノシンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルアデノシンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-OHグアノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルアデノシンである配列を含む。

10

20

【0128】

本発明のr/mGmH転写条件下において、転写反応混合物は、2'-O-メチルアデノシン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸、2'-O-メチルグアノシン三リン酸、2'-O-メチルウリジン三リン酸および2'-OHグアノシン三リン酸を含む。本発明のr/mGmH転写混合物を用いて生成される、得られる改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルグアノシンおよび2'-O-メチルウリジンを含み、ここで、グアノシンヌクレオチドの集団は、最高約10%の2'-OHグアノシンである。好ましい実施形態において、本発明の得られるr/mGmH改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンであり、そしてすべてのグアノシンヌクレオチドの約10%以下が、2'-OHグアノシンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの約10%以下が、2'-OHグアノシンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの90%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジ

30

40

50

ンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの約10%以下が、2'-OHグアノシンである配列を含む。

【0129】

本発明のfGmH転写条件下において、転写反応混合物は、2'-O-メチルアデノシン三リン酸、2'-O-メチルウリジン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸および2'-Fグアノシン三リン酸を含む。本発明のfGmH転写条件を用いて生成される改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルウリジン、2'-O-メチルシチジンおよび2'-Fグアノシンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-Fグアノシンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-Fグアノシンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルアデノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-Fグアノシンである配列を含む。

10

20

【0130】

本発明のdAmB転写条件下において、転写反応混合物は、2'-デオキシアデノシン三リン酸、2'-O-メチルシチジン三リン酸、2'-O-メチルグアノシン三リン酸および2'-O-メチルウリジン三リン酸を含む。本発明のdAmB転写混合物を用いて生成される改変オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての2'-デオキシアデノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルグアノシンおよび2'-O-メチルウリジンを含む。好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも80%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態において、得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの少なくとも90%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態において、本発明の得られる改変オリゴヌクレオチドは、すべてのアデノシンヌクレオチドの100%が、2'-デオキシアデノシンであり、すべてのシチジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルシチジンであり、すべてのグアノシンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチドの100%が、2'-O-メチルウリジンである配列を含む。

30

40

【0131】

各々の場合において、次いで、その転写産物をSELEX<sup>TM</sup>プロセスにおいてライブラリーとして用いて、アプタマーを同定し得、そして/または所与の標的に対する結合特異性を有する配列の保存モチーフを決定し得る。得られる配列は、すでに部分的に安定化されているので、最適化アプタマー配列に到達するプロセスからこの工程が排除される。

50

結果として、より高度に安定化されたアプタマーが得られる。2'-OMe SELEX<sup>TM</sup>プロセスの別の利点は、得られる配列が、配列中に必要な2'-OHヌクレオチドをほとんど、おそらくは全く有しない可能性があるという点である。2'-OHヌクレオチドが残存する範囲内で、ポストSELEX<sup>TM</sup>改変を行うことによって2'-OHヌクレオチドを除去することができる。

【0132】

以下に記載するように、2'置換ヌクレオチドを完全に組み込んでいる転写産物を、上で記載した最適化された条件以外の条件下において、収率が低いながらも有用である収率で得ることができる。上記の転写条件に対する変更点としては、例えば以下が挙げられる：

HEPES緩衝液濃度は、0～1Mの範囲であり得る。本発明はまた、5～10のpKaを有する他の緩衝剤（例えばTris-ヒドロキシメチル-アミノメタンが挙げられる）の使用も企図する。

【0133】

DTT濃度は、0～400mMの範囲であり得る。本発明の方法はまた、他の還元剤（例えばメルカプトエタノールが挙げられる）の使用も提供する。

【0134】

スペルミジンおよび/またはスペルミンの濃度は、0～20mMの範囲であり得る。

【0135】

PEG-8000濃度は、0～50%（w/v）の範囲であり得る。本発明の方法はまた、他の親水性ポリマー（例えば、他の分子量のPEGまたは他のポリアルキレングリコールが挙げられる）の使用も提供する。

【0136】

Triton X-100濃度は、0～0.1%（w/v）の範囲であり得る。本発明の方法はまた、他の非イオン性界面活性剤（例えば、他のTriton-X界面活性剤を含む他の界面活性剤が挙げられる）の使用も提供する。

【0137】

MgCl<sub>2</sub>濃度は、0.5mM～50mMの範囲であり得る。MnCl<sub>2</sub>濃度は、0.15mM～15mMの範囲であり得る。MgCl<sub>2</sub>とMnCl<sub>2</sub>の両方が、記載した範囲内で存在しなければならず、そして好ましい実施形態においては、MgCl<sub>2</sub>：MnCl<sub>2</sub>の比が約10～約3であり、好ましくは、その比は、約3～5：1であり、より好ましくは、その比は、約3～4：1である。

【0138】

2'-OMe NTP濃度（各NTP）は、5μM～5mMの範囲であり得る。

【0139】

2'-OH GTP濃度は、0μM～300μMの範囲であり得る。

【0140】

2'-OH GMP濃度は、0～5mMの範囲であり得る。

【0141】

pHは、pH6～pH9の範囲であり得る。本発明の方法は、改変ヌクレオチドを組み込むほとんどのポリメラーゼの活性のpH範囲内で実施され得る。さらに、本発明の方法は、転写反応条件におけるキレート剤（例えば、EDTA、EGTAおよびDTTが挙げられる）の任意の使用を提供する。

【0142】

（IL-23および/またはIL-12アプタマーセレクションストラテジー）

本発明は、ヒトIL-23および/またはIL-12に結合し、いくつかの実施形態において、それらのレセプターへの結合を阻害し、そして/またはそれらの機能を他の方法で調節するアプタマーを提供する。ヒトIL-23およびIL-12の両方もが、ヘテロダイマーであり、その1つのサブユニットが共通で、もう1つが固有である。共通のサブユニットは、以下のアミノ酸配列（アクセッション#AF180563）（配列番号4

10

20

30

40

50

) を含む p 4 0 サブユニットである :

【 0 1 4 3 】

【 化 2 8 - 1 】

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVVELDWYPDAPGE

【 0 1 4 4 】

【 化 2 8 - 2 】

MVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHS  
LL

10

LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSS  
R

GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV  
HKL

KYENYTSSFFIRDIHKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWTWSTPHSYFSLTFCVQ

VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS.

p 1 9 サブユニットは、 I L - 2 3 に固有であり、以下のアミノ酸配列 ( アクセシ  
ン # B C 0 6 7 5 1 1 ) ( 配列番号 5 ) を含む :

20

【 0 1 4 5 】

【 化 2 9 】

MLGSRAVMLLLLLPWTAQGRAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLA

WSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGDQPGLRDNSQFCLQRIHQGLIFY  
EK

LLGSDIFTGEPSSLPDSPVGQLHASLLGLSOLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLL

30

LRFKILRSLQAFVAVAAARVFAHGAATLSP.

p 3 5 サブユニットは、 I L - 1 2 に固有であり、以下のアミノ酸配列 ( アクセシ  
ン # A F 1 8 0 5 6 2 ) ( 配列番号 6 ) を含む :

【 0 1 4 6 】

【 化 3 0 】

MWPPGSASQPPSPAAATGLHPAARPVSLQCRLSMCPARSLLV

ATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC  
EE

40

IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS

IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS  
SLE

EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS.

本発明はまた、マウス I L - 2 3 および / または I L - 1 2 に結合し、いくつかの実施  
形態において、それらのレセプターへの結合を阻害し、そして / またはそれらの機能を他  
の方法で調節するアプタマーを提供する。ヒトと同様に、マウス I L - 2 3 と I L - 1 2

50

の両方ともが、ヘテロダイマーであり、マウス p 4 0 サブユニットを共有するのに対し、マウス p 1 9 サブユニットがマウス IL - 2 3 に特異的であり、そしてマウス p 3 5 サブユニットが、マウス IL - 1 2 に固有である。マウス p 4 0 サブユニットは、以下のアミノ酸配列（アクセッション # P 4 3 4 3 2 ）（配列番号 3 2 1 ）を含む：

【 0 1 4 7 】

【 化 3 1 】

MCPQKLTISWFAIVLLVSPMLMAMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEE  
 DDITWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGGETLSHSHLLLHKKENG  
 WSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTC  
 GMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYST  
 SFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEK  
 MKETEEGCNQGAFLEKSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVR  
 S

10

マウス p 1 9 サブユニットは、以下のアミノ酸配列（アクセッション # N P 1 1 2 5 4  
 2 ）（配列番号 3 2 2 ）を含む：

20

【 0 1 4 8 】

【 化 3 2 】

MLDCRAVIMLWLLPWVTQGLAVPRSSSPDWAQCQQLSRNLCMLAWNAHAP  
 AGHMNLLREEEDEETKNNVPRIQCEDGCDPQGLKDNSQFCLQRIRQGLAF  
 YKHLLEDSDIF KGEPALLPDSPMEQLHTSLLGLSOLLQPEDHPRETQQMPS  
 LSSSQWQRPLLRSKILRSLQAFLAIAARVFAHGAATLTE PLVPTA

30

マウス p 3 5 サブユニットは、以下のアミノ酸配列（アクセッション # P 4 3 4 3 1 ）  
 （配列番号 3 2 3 ）を含む：

【 0 1 4 9 】

【 化 3 3 】

MCQSRYLFLATLALLNHLSLARVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLG  
 HYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTS  
 L  
 MMTLCL

40

GSIIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQK  
 PPVGEADPYRVKMKLCLLHAFST RVVTINRVMG YLSSA

いくつかの S E L E X <sup>T M</sup> ストラテジーを用いて、IL - 2 3 および IL - 1 2 に対する種々の特異性を有したアプタマーを作製することができる。1つのスキームにおいて、ネガティブセレクション工程に IL - 1 2 を含めることによって IL - 1 2 よりも IL - 2 3 に対して特異的なアプタマーがもたらされる。これにより、共通のサブユニットである p 4 0 （配列番号 4 ）を認識する配列が排除され、図 3 に示されるように、IL - 2 3 、すなわち p 1 9 サブユニット（配列番号 5 ）に特異的なアプタマーについて選別される

50

。1つのスキームにおいて、ネガティブセレクション工程にIL-23を含めることによってIL-23よりもIL-12に特異的なアプタマーがもたらされる。これにより、共通のサブユニットであるp40（配列番号4）を認識する配列が排除され、IL-12、すなわちp35サブユニット（配列番号6）に特異的なアプタマーについて選別される。IL-23とIL-12とを1つおきの回で交互に用いる別個のセレクションにより、共通のサブユニットであるp40（配列番号4）を認識するために、両方のタンパク質を認識するアプタマーが排除される。一旦、所望の結合特異性を有する配列が見出されると、それらの配列の最小化に着手し、結合特性を改善しながら同時に配列の大きさを体系的に減じ得る。

**【0150】**

下記の実施例に記載されるような生物学的アッセイによって証明されるとき、最も高い親和性および特異的結合性を有する選別されたアプタマーは、IL-23および/またはIL-12が病因に関与する状態を処置するために適した治療薬である。

**【0151】**

（IL-23 / IL-12 特異的結合アプタマー）

本発明の材料は、ヒトIL-12サイトカインファミリーのサイトカインに特異的に結合する約25～90ヌクレオチド長の一連の核酸アプタマーを含み、そのサイトカインファミリーは、IL-12、IL-23およびIL-27；p19、p35およびp40サブユニットモノマー；ならびにp40サブユニットダイマーを含み；そしてインビボおよび/または細胞ベースアッセイにおいてIL-23および/またはIL-12の活性を機能的に調節する、例えば、阻止する。

**【0152】**

IL-23および/またはIL-12に結合し、調節することが特異的にできるアプタマーを本明細書中に示す。これらのアプタマーは、低毒性、安全性を提供し、ならびに自己免疫性および炎症性に関連する疾患または障害の処置および/または予防の有効な様式を提供する。1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、炎症性疾患および自己免疫疾患を処置および/または予防するために使用され、その炎症性疾患および自己免疫疾患としては、多発性硬化症、関節リウマチ、尋常性乾癬および過敏性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されず、これらの疾患の各々は、IL-23および/またはIL-12サイトカインによって引き起こされるか、または他の方法でそれらに関連することが知られている。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、IL-23および/またはIL-12サイトカインによって引き起こされるか、または他の方法でそれらに関連することが知られているI型糖尿病を処置および/または予防するために使用される。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、サイトカインレセプター結合の活性化が望ましい他の徴候を処置および/または予防するために使用され、その徴候としては、例えば、全身性エリテマトーデス、結腸癌、肺癌および骨粗鬆症における骨吸収が挙げられる。

**【0153】**

治療薬および/または診断薬として使用するためのIL-23および/またはIL-12特異的結合アプタマーの例としては、下記に列挙される以下の配列が挙げられる。

**【0154】**

他に述べられない限り、

**【0155】**

10

20

30

40

【化 3 4】

ARC489 ( 配列番号 91), ARC491 ( 配列番号 94),  
 ARC621 ( 配列番号 108), ARC627 ( 配列番号 110), ARC527 ( 配列番号 159),  
 ARC792 ( 配列番号 162), ARC794 ( 配列番号 164), ARC795 ( 配列番号 165),  
 ARC979 ( 配列番号 177), ARC1386 ( 配列番号 224), および ARC1623-ARC1625 ( 配列番号 309-311)

は、プリン ( A および G ) がデオキシであり、ピリミジン ( C および U ) が 2' - OMe 10  
 であるという S E L E X<sup>T M</sup> 条件下で選別された、I L - 2 3 および / または I L - 1 2  
 に結合するアダマーの配列のことを表す。

【 0 1 5 6 】

A R C 4 8 9 ( 配列番号 9 1 ) および A R C 4 9 1 ( 配列番号 9 4 ) の固有配列領域は、配列

【 0 1 5 7 】

【化 3 5】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC

( 配列番号 6 9 ) の直後のヌクレオチド 2 3 から始まり、3' 固定核酸配列 20

【 0 1 5 8 】

【化 3 6】

GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

( 配列番号 9 0 ) に遭遇するまで続く。

【 0 1 5 9 】

A R C 6 2 1 ( 配列番号 1 0 8 ) および A R C 6 2 7 ( 配列番号 1 1 0 ) の固有配列領域は、配列

【 0 1 6 0 】

【化 3 7】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC

( 配列番号 1 0 1 ) の直後のヌクレオチド 2 3 から始まり、3' 固定核酸配列

【 0 1 6 1 】

【化 3 8】

GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

( 配列番号 1 0 2 ) に遭遇するまで続く。

【 0 1 6 2 】

30

## 【化 3 9 - 1】

配列番号 91 (ARC489)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 94 (ARC491)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCCGGUGGGUGGGCAUAGGGUGGAUGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 108 (ARC621)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGCGCGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

配列番号 110 (ARC627)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGUGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

配列番号 159 (ARC527)

ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

配列番号 162 (ARC792)

GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG

【 0 1 6 3 】

## 【化 3 9 - 2】

配列番号 164 (ARC794)

GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGCCCGG

配列番号 165 (ARC795)

CGAUAAUAGGCGGUACGGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG

配列番号 177 (ARC979)

ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU

ARC 1 6 2 3 (配列番号 3 0 9)、ARC 1 6 2 4 (配列番号 3 1 0) および ARC 1 6 2 5 (配列番号 3 1 1) は、ARC 9 7 9 (配列番号 1 7 7) に基づいて最適化された配列を表しており、ここで、「d」は、デオキシを表し、「m」は、2'-O-メチルを表し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合を示し、そして「3T」は、3'-逆位デオキシチミジンを表している。

【 0 1 6 4 】

## 【化 4 0】

配列番号 309 (ARC1623)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmUdGmU-3T

配列番号 310 (ARC1624)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmUdGmU-3T

配列番号 311 (ARC1625)

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmU-s-dGmU-3T

配列番号 1 3 9 ~ 1 4 0、配列番号 1 4 4 ~ 1 4 5、配列番号 1 4 7 および配列番号 1 5 1 ~ 1 5 2 は、プリン (A および G) が 2'-OH (リボ) であり、ピリミジン (C および U) が 2'-フルオロであるという SELEX<sup>TM</sup> 条件下で選別された IL-23 および / または IL-12 に結合する アプタマー の配列を表している。

【 0 1 6 5 】

10

20

30

40

## 【化 4 1 - 1】

配列番号 139 (A10.min5)

GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGGAUAUGCUCC

配列番号 140 (A10.min6)

GGAGUACGCCGAAAGGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGGAUACUCC

配列番号 144 (B10.min4)

GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUUUGCUCC

配列番号 145 (B10.min5)

GGAGUACACAAGAAGUGCUUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC

配列番号 147 (F11.min2)

GGACAUACACAAGAUGGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC

配列番号 151

## 【 0 1 6 6 】

## 【化 4 1 - 2】

GGGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCGUAAGGGGAUACCC

配列番号 152

GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCGUAAGGGGAUACUCC

IL - 23 および / または IL - 12 と結合する他のアプタマーは、下記の実施例 1 ~ 3 に記載されている。

## 【 0 1 6 7 】

これらのアプタマーは、本明細書中に記載されるような改変を含み得、その改変としては、例えば、親油性または高分子量の化合物（例えば、PEG）との結合体化、CpGモチーフの組み込み、キャッピング部分の組み込み、改変ヌクレオチドの組み込みおよびリン酸骨格中のホスホロチオエートの組み込みが挙げられる。

## 【 0 1 6 8 】

1つの実施形態において、IL - 23 および / または IL - 12 に結合する、単離された天然に存在しないアプタマーが提供される。いくつかの実施形態において、単離された天然に存在しないアプタマーのIL - 23 および / または IL - 12 に対する解離定数（「 $K_D$ 」）は、100  $\mu$ M未満、1  $\mu$ M未満、500 nM未満、100 nM未満、50 nM未満、1 nM未満、500 pM未満、100 pM未満および50 pM未満である。本発明のいくつかの実施形態において、解離定数は、下記の実施例 1 に記載されるようなドットプロット力価測定によって測定される。

## 【 0 1 6 9 】

別の実施形態において、本発明のアプタマーは、IL - 23 および / または IL - 12 の機能を調節する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、IL - 23 および / または IL - 12 の機能を阻害するが、別の実施形態では、本アプタマーは、標的の機能を刺激する。本発明の別の実施形態において、本アプタマーは、IL - 23 または IL - 12 改変体に結合し、そして / またはそれらの機能を調節する。IL - 23 または IL - 12 改変体は、本明細書中で使用されるとき、IL - 23 または IL - 12 の機能と本質的に同じ機能を示す改変体を包含し、好ましくは実質的に同じ構造を含み、そしていくつかの実施形態では、IL - 23 または IL - 12 のアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも80%の配列同一性、より好ましくは少なくとも90%の配列同一性、そしてより好ましくは少なくとも95%の配列同一性を含む。本発明のい

10

20

30

40

50

くつかの実施形態において、標的改変体の配列同一性は、下記に記載するようにBLASTを用いて決定される。

【0170】

2つ以上の核酸またはタンパク質配列の文脈における用語「配列同一性」とは、同じであるか、または以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いるか、もしくは目視検査によって測定する際に、比較されて一致が最大となるようにアラインメントされたときに同じである特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドを有する2つ以上の配列または部分配列のことをいう。配列比較のために、代表的には、1つの配列は、試験配列が比較される参照配列として働く。配列比較アルゴリズムを用いるとき、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要であれば、部分配列座標を設定し、そして配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較して試験配列のパーセント配列同一性を計算する。例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)または目視検査(一般に、Ausubelら、前出を参照のこと)によって、比較のための最適な配列のアラインメントを行うことができる。

10

20

30

【0171】

パーセント配列同一性の決定に適したアルゴリズムの1つの例は、ベーシックローカルアラインメントサーチツール(basic local alignment search tool)(本明細書中以後、「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、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)およびAltschulら、Nucleic Acids Res., 15: 3389-3402 (1997)を参照のこと。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)(本明細書中以後「NCBI」)を介して公的に利用可能である。NCBIから利用可能なソフトウェアを用いて配列同一性を決定する際に使用されるデフォルトのパラメータ、例えば、BLASTN(ヌクレオチド配列用)およびBLASTP(アミノ酸配列用)は、McGinnisら、Nucleic Acids Res., 32: W20-W25 (2004)に記載されている。

【0172】

本発明の1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0173】

【化42】

配列番号 13-66,

配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-134,

配列番号 135-159, 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178,

配列番号 181-196, および 配列番号 199-314

40

のいずれか1つを含むアプタマーがIL-23に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。本発明の別の実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0174】

【化43】

配列番号 13-66, 配列番号 71-88, 配列番号 91-96, 配列番号 103-118, 配列番号 124-134, 配列番号 135-159, 配列番号 162, および 配列番号 164-172, 配列番号 176-178, 配列番号 181-196, および 配列番号 199-314.

のいずれか1つを含むアプタマーの構造と実質的に同じ構造およびそのアプタマーが IL-23 に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

【0175】

本発明の1つの実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0176】

【化44】

配列番号

14, 配列番号 17-19, 配列番号 21, 配列番号 27-32, 配列番号 34-40, 配列番号 42, 配列番号 49, 配列番号 60-61, 配列番号 91-92, 配列番号 94, および 配列番号 103-118

のいずれか1つを含むアプタマーが IL-23 および / または IL-12 に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。本発明の別の実施形態において、本発明のアプタマーは、

【0177】

【化45】

配列番号 14, 配列番号 17-19, 配列番号 21, 配列番号 27-32, 配列番号 34-40, 配列番号 42, 配列番号 49, 配列番号 60-61, 配列番号 91-92, 配列番号 94, および 配列番号 103-118.

のいずれか1つを含むアプタマーと実質的に同じ構造およびそのアプタマーが IL-23 および / または IL-12 に結合する能力と実質的に同じ能力を有する。

【0178】

別の実施形態において、本発明のアプタマーは、薬学的組成物中の活性成分として使用される。別の実施形態において、本発明のアプタマーまたは本発明のアプタマーを含む組成物は、炎症性疾患および自己免疫疾患（多発性硬化症、関節リウマチ、尋常性乾癬、全身性エリテマトーデスおよび過敏性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない）、I型糖尿病、結腸癌、肺癌および骨粗鬆症における骨吸収を処置するために使用される。

【0179】

いくつかの実施形態において、本発明のアプタマー治療薬は、それらの標的に対する親和性および特異性が高く、たとえアプタマー治療薬が患者または被験体の体内で分解したとしても、天然に存在しないヌクレオチド置換に由来する有害な副作用が低い。いくつかの実施形態において、本発明のアプタマー治療薬を含む治療的組成物は、フッ化ヌクレオチドを含んでいないか、または少量のフッ化ヌクレオチドを含んでいる。

【0180】

本発明のアプタマーは、当該分野で公知の任意のオリゴヌクレオチド合成技術を用いて合成され得、その技術としては、固相オリゴヌクレオチド合成技術（例えば、Froehlerら、Nucl. Acid Res. 14: 5399-5467 (1986) および Froehlerら、Tet. Lett. 27: 5575-5578 (1986) を参照のこと）および当該分野で周知の液相法（例えば、トリエステル合成法（例えば、Soodら、Nucl. Acid Res. 4: 2557 (1977) および Hiroseら、Tet. Lett., 28: 2449 (1978) を参照のこと）が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0181】

(免疫賦活性モチーフを有するアプタマー)

本発明は、IL-23および/またはIL-12に結合し、そしてそれらの生物学的機能を調節するアプタマーを提供する。より詳細には、本発明は、IL-23および/またはIL-12のレセプターへのIL-23および/またはIL-12の結合を増大させることによって、IL-23および/またはIL-12の生物学的機能を向上するアプタマーを提供する。そのようなアプタマーのアゴニスト作用は、IL-23および/またはIL-12に結合し、かつ、免疫賦活性モチーフを含むアプタマーを選別することによってか、または、免疫賦活性配列に結合することが知られている標的に対するアプタマーと組み合わせ、IL-23および/もしくはIL-12に結合するアプタマーで処置することによってさらに増強され得る。

10

## 【0182】

脊椎動物免疫系による細菌DNAの認識は、特定の配列コンテキスト(「CpGモチーフ」)中の非メチル化CGジヌクレオチドの認識に基づくものである。そのようなモチーフを認識する1つのレセプターは、異なる微生物の成分を認識することによって先天的な免疫応答に關与するToll様レセプターのファミリー(約10メンバー)のメンバーであるToll様レセプター9(「TLR9」)である。TLR9は、配列特異的様式で非メチル化オリゴデオキシヌクレオチド(「ODN」)CpG配列に結合する。CpGモチーフを認識することにより、生得的免疫応答および最終的に獲得される免疫応答をもたらす防御機構が引き起こされる。例えば、マウスにおけるTLR9の活性化は、抗原提示細胞の活性化、MHCクラスIおよびII分子のアップレギュレーション、ならびに重要な共刺激分子およびサイトカイン(IL-12およびIL-23を含む)の発現を誘導する。直接的と間接的との両方によるこの活性化は、TH1サイトカインIFN-γの強いアップレギュレーションをはじめとしたB細胞およびT細胞の応答を促進する。まとめると、CpG配列に対する応答は、感染症に対する保護、ワクチンに対する免疫応答の改善、喘息に対する効果的な応答および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害の改善をもたらす。従って、CpG ODNは、感染症に対する保護、免疫増強剤または癌治療薬(単剤療法またはmAbもしくは他の治療法との併用)としての機能をもたらし得、また、喘息およびアレルギー性応答を低減し得る。

20

## 【0183】

1つ以上のCpGまたは他の免疫賦活性配列を含む本発明のアプタマーは、種々のストラテジーによって、例えば本明細書中に記載のSELEX<sup>TM</sup>プロセスを用いて同定され得るか、または作製され得る。組み込まれる免疫賦活性配列は、DNA、RNAおよび/またはDNA/RNAの組み合わせであり得る。概して、ストラテジーは、2つの群に分類され得る。群1において、そのストラテジーは、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列と標的に対する結合部位との両方を含むアプタマーの同定または作製に關し、ここで、その標的(本明細書中以後「非CpG標的」)は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列を認識することが知られている標的以外およびCpGモチーフに結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的以外の標的である。本発明のいくつかの実施形態において、非CpG標的は、IL-23および/またはIL-12標的である。この群の第1ストラテジーは、抑制された免疫応答が疾患の発症に関わっている場合に、オリゴヌクレオチドプールを用いて特定の非CpG標的、好ましくはある標的、例えば、IL-23および/またはIL-12に対するアプタマーを得るためにSELEX<sup>TM</sup>を行うこと(ここで、CpGモチーフは、固定領域または固定領域の一部としてそのプールの各メンバーに組み込まれており、例えば、いくつかの実施形態において、プールメンバーのランダム化領域は、その中に組み込まれたCpGモチーフを有する固定領域を含む)およびCpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第2ストラテジーは、抑制された免疫応答が疾患の発症に関わっている場合に、特定の非CpG標的、好ましくはある標的、例えば、IL-23および/またはIL-12に対するアプタマーを得るためにSELEX<sup>TM</sup>を行うこと、ならびにセレクション後にその5'および/または3'

30

40

50

末端に CpGモチーフを付加すること、またはアプタマーのある領域、好ましくは、非必須領域に CpGモチーフが入るように操作することを含む。この群の第3戦略は、抑制された免疫応答が疾患の発症に関わっている場合に、特定の非 CpG 標的、好ましくはある標的、例えば、IL-23 および / または IL-12 に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うこと（ここで、プールの各メンバーのランダム化領域に CpGモチーフが豊富となるように1つ以上のヌクレオチド添加工程においてプールの合成中の様々なヌクレオチドのモル比を偏らせる）および CpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第4戦略は、抑制された免疫応答が疾患の発症に関わっている場合に、特定の非 CpG 標的、好ましくはある標的、例えば、IL-23 および / または IL-12 に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うこと、および CpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第5戦略は、抑制された免疫応答が疾患の発症に関わっている場合に、特定の非 CpG 標的、好ましくはある標的、例えば、IL-23 および / または IL-12 に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うこと、および結合した際に免疫応答を刺激するが、CpGモチーフを含まないアプタマーを同定することを含む。

10

#### 【0184】

群2において、その戦略は、CpGモチーフおよび / または CpGモチーフに対するレセプター（例えば、TLR9 または他の toll 様レセプター）によって結合しており、そして結合した際に免疫応答を刺激する他の配列を含むアプタマーを同定することまたは作製することに関する。この群の第1戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、そして結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るためにオリゴヌクレオチドプールを用いて SELEX<sup>TM</sup> を行うこと（ここで、CpGモチーフは、固定領域または固定領域の一部としてプールの各メンバーに組み込まれており、例えば、いくつかの実施形態において、プールメンバーのランダム化領域は、そこに組み込まれた CpGモチーフを有する固定領域を含む）および CpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第2戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、そして結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うこと、および次いで CpGモチーフを 5' および / もしくは 3' 末端に付加すること、または CpGモチーフがアプタマーの一領域、好ましくは非必須領域に入るように操作することを含む。この群の第3戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、そして結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うこと（ここで、プールの各メンバーのランダム化領域に CpGモチーフが豊富となるように1つ以上のヌクレオチド添加工程においてプールの合成中の様々なヌクレオチドのモル比を偏らせる）および CpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第4戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合し、そして結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うことおよび CpGモチーフを含むアプタマーを同定することを含む。この群の第5戦略は、CpGモチーフまたは他の免疫賦活性配列に結合することが知られている標的に対するアプタマーを得るために SELEX<sup>TM</sup> を行うことおよび結合した際に免疫応答を刺激するが、CpGモチーフを含まないアプタマーを同定することを含む。

20

30

40

#### 【0185】

種々の異なるクラスの CpGモチーフが同定されており、その各々は、事象の異なるカスケードにおける認識、サイトカインおよび他の分子の放出ならびにある特定の細胞タイプの活性化をもたらす。例えば、CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects, Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 709 - 760（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。さらなる免疫賦活性モチーフは、以下の米国特許：米国特許第 6, 207, 646号；米国特許第 6, 239, 116号；米国特許第 6, 429, 199号；米国特許

50

第 6, 214, 806 号; 米国特許第 6, 653, 292 号; 米国特許第 6, 426, 434 号; 米国特許第 6, 514, 948 号および米国特許第 6, 498, 148 号に開示されており、これらの各々は、本明細書中で参考として援用される。これらの CpG または他の免疫賦活性モチーフのいずれかが、アプタマーに組み込まれ得る。アプタマーの選択は、処置される疾患または障害に依存する。好ましい免疫賦活性モチーフは、以下のとおりであり（左から右に 5' から 3' を示す）、ここで、「r」は、プリンを示し、「y」は、ピリミジンを示し、そして「X」は、任意のヌクレオチドを示す：

【0186】

【化46】

AACGTTTCGAG ( 配列番号 7); AACGTT; ACGT, rCGy; rrCGyy, XCGX, XXCGXX,  
および  $X_1X_2CGY_1Y_2$

10

（ここで、 $X_1$  は G または A であり、 $X_2$  は C ではなく、 $Y_1$  は、G ではなく、そして  $Y_2$  は好ましくは T である）。

【0187】

CpG モチーフに結合し、そして結合した際に免疫応答を刺激することが知られている標的以外の特定の標的（「非 CpG 標的」）に結合するアプタマーに CpG モチーフが組み込まれている場合に、CpG は、好ましくはアプタマーの非必須領域に位置する。アプタマーの非必須領域は、部位特異的突然変異誘発、欠失解析および/または置換解析によって同定され得る。しかしながら、アプタマーが非 CpG 標的に結合する能力を有意に干渉しない任意の位置が、使用することができる。CpG モチーフは、アプタマー配列に取り囲まれることに加えて、5' および 3' 末端のいずれかまたはその両方に付加され得るか、または他の方法でアプタマーに結合され得る。アプタマーが非 CpG 標的に結合する能力が著しく干渉されない限り、いかなる結合の位置または手段を使用してもよい。

20

【0188】

本明細書中で使用されるとき、「免疫応答の刺激」とは、（1）特定の応答の誘発（例えば、Th1 応答の誘発）もしくはある特定分子の生成の誘発、あるいは（2）特定の応答の阻害もしくは抑制（例えば、Th2 応答の阻害または抑制）または特定分子の阻害もしくは抑制のいずれかを意味し得る。

30

【0189】

（薬学的組成物）

本発明はまた、IL-23 および/または IL-12 に結合するアプタマー分子を含む薬学的組成物を含む。いくつかの実施形態において、その組成物は、内服に適しており、また、本発明の薬理的に活性な有効量の化合物を単独または 1 つ以上の薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせる。その化合物は、毒性がある場合であっても、その毒性は非常に低いという点で特に有用である。

【0190】

本発明の組成物は、病状（例えば、疾患または障害）を処置または予防するためか、または患者におけるそのような疾患または障害の症状を改善するために使用することができる。例えば、本発明の組成物は、IL-23 および/または IL-12 サイトカインに関連する病状（炎症性および自己免疫に関連する疾患、I 型糖尿病、骨粗鬆症における骨吸収および癌を含む）を処置または予防するために使用することができる。

40

【0191】

本発明の組成物は、本発明のアプタマーが特異的に結合する標的に関連する疾患もしくは障害またはその標的由来の疾患もしくは障害に罹患しているか、または罹患しやすくなっている被験体に投与するために有用である。本発明の組成物は、ある病状を有する患者または被験体を処置するための方法において使用することができる。その方法は、アプタマーまたは上記病状に関連する IL-23 および/もしくは IL-12 に結合するアプタマーを含む組成物を患者または被験体に投与する工程を含み、IL-23 および/または

50

IL - 12 へのアプタマーの結合により、その標的の生物学的機能が変化し、それによってその病状が処置される。

【0192】

ある病状を有する患者または被験体、すなわち、本発明の方法によって処置される患者または被験体は、脊椎動物、より具体的には哺乳動物、またはより具体的にはヒトであり得る。

【0193】

実際には、アプタマーまたはその薬学的に許容可能な塩は、その所望の生物学的活性を発揮する（例えば、IL - 23 および / または IL - 12 がそのレセプターに結合するのを阻害する）のに十分な量で投与される。

【0194】

本発明の1つの局面は、炎症性疾患および自己免疫疾患、癌ならびに他の関連障害に対する他の処置と組み合わせた本発明のアプタマー組成物を含む。本発明のアプタマー組成物は、例えば、2つ以上のアプタマーを含み得る。いくつかの実施例において、1つ以上の本発明の化合物を含む本発明のアプタマー組成物は、別の有用な組成物（例えば、炎症剤、免疫抑制剤、抗ウイルス剤など）と組み合わせて投与される。さらに、本発明の化合物は、上記のような細胞傷害性薬剤、細胞分裂抑制剤または化学療法剤（例えば、アルキル化剤、抗代謝産物、有糸分裂阻害剤または細胞傷害性抗生物質）と組み合わせて投与され得る。一般に、そのような組み合わせで使用するための公知の治療薬の現在利用可能な剤形が適当である。

【0195】

「併用療法」（または「同時療法」）は、本発明のアプタマー組成物、および特定の処置レジメンの一部としてこれらの治療薬の相互作用から有益な効果を提供するように意図された少なくとも第2の薬剤の投与を含む。この併用の有益な効果としては、治療薬の併用によってもたらされる薬物動態学的または薬力学的な相互作用が挙げられるがこれらに限定されない。併用療法におけるこれらの治療薬の投与は、代表的には、規定された時間（通常、選択される併用療法に依存して、分、時間、日または週）に亘って行われる。

【0196】

「併用療法」は、本発明の併用療法において偶発的かつ任意にもたらされる別個の単剤療法レジメンの一部としてこれらの治療薬の2つ以上の投与を包含すると意図され得るが、通常は、意図されない。「併用療法」は、連続した様式（すなわち、各治療薬は異なる時点で投与される）でこれらの治療薬を投与すること、ならびに実質的に同時の様式でこれらの治療薬または治療薬の少なくとも2つを投与することを包含すると意図される。実質的に同時の投与は、例えば、固定された比の各治療薬を有する単一のカプセルまたは治療薬の各々について単一のカプセルの複数を被験体に投与することによって達成され得る。

【0197】

各治療薬の連続した投与または実質的に同時の投与は、任意の適切な経路によって実施され得、その経路としては、局所的経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路および粘膜組織を介した直接的な吸収が挙げられるがこれらに限定されない。治療薬は、同じ経路または異なる経路によって投与することができる。例えば、選択された組み合わせの第1の治療薬が、注射によって投与され得るのに対し、その組み合わせにおける他方の治療薬は、局所的に投与され得る。

【0198】

あるいは、例えば、すべての治療薬が、局所的に投与され得るか、またはすべての治療薬が、注射によって投与され得る。治療薬が投与される順序は、他に述べられない限り、厳密には重要ではない。「併用療法」はまた、他の生物学的に活性な成分とさらに組み合わせることで上記のように治療薬を投与することを包含し得る。併用療法が非薬物処置をさらに含む場合、治療薬と非薬物処置との組み合わせの相互作用から有益な効果が達成される限り、非薬物処置は、適当などの時点でも行ってよい。例えば、適切な場合において、その

10

20

30

40

50

有益な効果は、非薬物処置が、治療薬の投与から時間的に離れている場合でさえ（おそらく数日または数週間でさえ）も達成される。

【0199】

本発明の治療的組成物または薬理的組成物は、一般に、薬学的に許容可能な媒質に溶解または分散されるとき、その治療薬の有効量の活性成分を含む。薬学的に許容可能な媒質またはキャリアとしては、任意およびすべての溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質に対してそのような媒質および薬剤を使用することは、当該分野で周知である。補充性活性成分もまた、本発明の治療的組成物に組み込まれ得る。

【0200】

薬学的組成物または薬理的組成物の調製は、本開示に鑑みて当業者に公知である。代表的には、そのような組成物は、注射可能な液体溶液または懸濁液；注射の前の液体中の溶液または懸濁液に適した固体の形態；経口投与用の錠剤または他の固体；徐放性カプセル；または現在使用されている他の任意の形態（点眼剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏剤、吸入剤などを含む）として調製され得る。外科医、医師または手術現場において特定の領域の処置を行う医療従事者によって滅菌された処方物（例えば、食塩水ベースの洗浄液）が使用されることもまた、特に有用であり得る。組成物はまた、マイクロデバイス、微小粒子またはスポンジを介しても送達され得る。

【0201】

処方物において、治療薬は、投薬処方物に適合した様式および薬理的に有効である量で投与される。処方物は、種々の剤形（例えば、上記の注射可能な溶液のタイプ）で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなどもまた使用することができる。

【0202】

この文脈において、投与される活性成分の量および組成物の容積は、処置される宿主動物に依存する。投与に必要な活性化合物の正確な量は、主治医の判断に依存し、各個体に特有のものである。

【0203】

活性化合物を分散するのに必要な組成物の最小量が、代表的には使用される。投与に適したレジメンもまた可変的であるが、まず化合物を投与し、そしてその結果をモニターすることによって類型化し、次いで、さらなる間隔でさらに制御された用量を与えてもよい。

【0204】

例えば、錠剤またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態での経口投与に対して、活性な薬物成分は、経口的で、無毒性で、薬学的に許容可能な不活性なキャリア（例えば、エタノール、グリセロール、水など）と組み合わせることができる。さらに、所望されるか、または必要とされるとき、適当な結合剤、潤滑剤、崩壊剤および着色剤もまた、混合物に組み込むことができる。適当な結合剤としては、デンプン、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、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、天然の糖（例えば、グルコースまたは - ラクトース、トウモロコシ甘味料）、天然ゴムおよび合成ゴム（例えば、アラビアゴム、トラガカントゴム）またはアルギン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ろうなどが挙げられる。これらの剤形において使用される潤滑剤としては、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、そのマグネシウム塩もしくはカルシウム塩および/またはポリエチレングリコールなどが挙げられる。崩壊剤としては、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガム、デンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩または発泡性混合物などが挙げられるがこれらに限定されない。希釈剤としては、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/またはグリシンが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0205】

本発明の化合物はまた、経口剤形（例えば、徐放性および持続性の錠剤またはカプセル、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁液、シロップ剤およびエマルジョン）で投与され得る。坐剤は、脂肪性のエマルジョンまたは懸濁液から有利に調製される。

## 【0206】

薬学的組成物は、滅菌され得、そして/または補助剤（例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を制御するための塩および/または緩衝液）を含み得る。さらに、薬学的組成物はまた、他の治療的に価値のある物質も含み得る。この組成物は、従来の混合、顆粒化またはコーティングの方法に従って調製され、そして代表的には活性成分の約0.1%~75%、好ましくは約1%~50%を含む。

10

## 【0207】

液体、特に注射可能な組成物は、例えば、溶解、分散などによって調製され得る。活性化合物は、薬学的に純粋な溶媒（例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなど）に溶解されるか、またはそれらと混合され、それによって、注射可能な溶液または懸濁液を形成する。さらに、注射の前に液体に溶解されるのに適した固体の形態が、処方され得る。

## 【0208】

本発明の化合物は、静脈内（ボラスと点滴の両方）、腹腔内、皮下または筋肉内の形態で投与され得、すべての使用形態が薬学分野の当業者に周知である。注射可能物は、液体溶液または懸濁液のいずれかの従来の形態で調製され得る。

20

## 【0209】

非経口で注射可能な投与は、一般に、皮下、筋肉内または静脈内の注射および点滴で使用される。さらに、非経口投与のための1つのアプローチは、米国特許第3,710,795号（本明細書中に参考として援用される）に従って一定レベルの用量が維持されることが保証されている持続放出系または徐放系の埋め込みを用いる。

## 【0210】

さらに、本発明のための好ましい化合物は、適当な鼻腔内ビヒクル、吸入剤の局所的使用を介してか、またはこの分野の当業者に周知の経皮的皮膚パッチを用いた経皮的経路を介して鼻腔内形態で投与され得る。経皮的送達系の形態で投与するために、当然のことながら、用量投与は、全投与レジメンに亘って断続的ではなく連続的である。他の好ましい局所調製物としては、クリーム剤、軟膏、ローション剤、エアロゾルスプレーおよびゲルが挙げられ、ここで、活性成分の濃度は、代表的には、0.01%~15%、w/wまたはw/vの範囲であり得る。

30

## 【0211】

固体組成物のための賦形剤としては、薬学的等級のマニトール、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、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。上で定義した活性化合物はまた、例えば、キャリア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用いて坐剤として処方され得る。いくつかの実施形態において、坐剤は、脂肪性のエマルジョンまたは懸濁液から有利に調製される。

40

## 【0212】

本発明の化合物はまた、リポソーム送達系（例えば、小型単層ベシクル、大型単層ベシクルおよび多重膜ベシクル）の形態で投与され得る。リポソームは、種々のリン脂質（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む）から形成され得る。いくつかの実施形態において、薄膜の脂質成分は、米国特許第5,262,564号に記載されているように、薬物の水溶液で水和され、薬物を封入する脂質層を形成する。例えば、本明細書中に記載のアプタマー分子は、当該分野で公知の方法を用いて構築された親油性化合物または非免疫原性で高分子量の化合物との複合体として提供され得る。核酸会合複合体の例は、米国特許第6,011,020号に提供されている。

50

## 【0213】

本発明の化合物はまた、標的化可能薬物キャリアとして可溶性ポリマーと結合され得る。そのようなポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ピラン共重合体、ポリヒドロキシプロピル-メタクリルアミド-フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパンアミドフェノールまたはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリシンが挙げられ得る。さらに、本発明の化合物は、薬物の放出制御を達成する際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ブロック共重合体または両親媒性ブロック共重合体）に結合され得る。

10

## 【0214】

所望であれば、投与される薬学的組成物はまた、少量の無毒性補助剤物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤および他の物質（例えば、酢酸ナトリウムおよびオレイン酸トリエタノールアミン））を含み得る。

## 【0215】

アプタマーを利用する投与レジメンは、種々の因子（患者のタイプ、人種、年齢、体重、性別および病状；処置される状態の重症度；投与経路；患者の腎臓および肝臓の機能；ならびに使用する特定のアプタマーまたはその塩）に従って選択される。通常の熟練した医師または獣医師は、その状態の進行を予防、阻止または停止するのに必要な薬物の有効量を容易に決定および処方することができる。

20

## 【0216】

示された効果のために使用されるときの本発明の経口用量は、経口的に約0.05~7500mg/日の範囲である。本発明の組成物は、好ましくは、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100.0、250.0、500.0および1000.0mgの活性成分を含む、溝がつけられた錠剤の形態で提供される。注入用量、鼻腔内用量および経皮的用量は、0.05~7500mg/日の範囲である。皮下、静脈内および腹腔内の用量は、0.05~3800mg/日の範囲である。

## 【0217】

本発明の化合物の有効な血漿レベルは、0.002mg/mL~50mg/mLの範囲である。

30

## 【0218】

本発明の化合物を1日あたり1回の用量で投与してもよいし、1日あたりの総用量を1日あたり2回、3回または4回の分割量で投与してもよい。

## 【0219】

（アプタマー治療薬の薬物動態および体内分布の調節）

アプタマーを含むすべてのオリゴヌクレオチドベース治療薬についての薬物動態学的な目的を、所望の薬学的用途と一致するように調整することが重要である。細胞外の標的に特異的なアプタマーは、細胞内送達に関連する問題に悩まされないが（アンチセンスおよびRNAiベースの治療薬と同様に）、そのようなアプタマーはさらに、標的器官および組織に分布することができなければならず、また、所望の投薬レジメンに一致した時間に亘って体内に（改変されずに）残存しなければならない。

40

## 【0220】

従って、本発明は、アプタマー組成物の薬物動態および特にアプタマー薬物動態を調整する能力に影響を及ぼす材料および方法を提供する。アプタマー薬物動態の調整能力（すなわち、調節する能力）は、アプタマーへの改変部分（例えば、PEGポリマー）の結合体化および/または核酸の化学組成を変化させる改変ヌクレオチド（例えば、2'-フルオロまたは2'-O-メチル）の組み込みを介して達成される。アプタマー薬物動態を調整する能力は、既存の治療用途の改善、あるいは新規の治療用途の開発に使用される。例えば、いくつかの治療用途において、例えば、抗新生物薬または急速な薬物クリアランスまたは機能停止が所望され得る急性病治療設定において、血液循環中のアプタマーの滞留

50

時間を短縮することが望ましい。あるいは、他の治療用途において、例えば、治療薬の体循環が所望される維持療法において、血液循環中のアプタマーの滞留時間の延長が望ましいことがある。

#### 【0221】

さらに、アプタマー薬物動態の調整能力は、被験体におけるアプタマー治療薬の体内分布を改変するために用いられる。例えば、いくつかの治療用途では、特定タイプの組織または特定器官（または一連の器官）を標的にする目的でアプタマー治療薬の体内分布を変更することが望ましいことがある。これらの用途において、アプタマー治療薬は、特定の組織または器官に優先的に蓄積する。他の治療用途においては、アプタマー治療薬が優先的に罹患組織に蓄積するように、所与の疾患、細胞損傷または他の異常な病状に関連する細胞マーカーまたは症状を示す組織を標的にすることが望ましいことがある。例えば、「Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics」と題され、2004年3月5日に出願された同時係属中の米国仮特許出願番号60/550790および「Controlled Modulation of the Pharmacokinetics and Biodistribution of Aptamer Therapeutics」と題された、2005年3月7日に出願された仮出願でない米国特許出願番号10/ - - - , - - - に記載されているように、アプタマー治療薬のPEG化（例えば、20kDaのPEGポリマーによるPEG化）を用いて炎症組織を標的にすることにより、PEG化アプタマー治療薬が優先的に炎症組織に蓄積する。

10

20

#### 【0222】

アプタマー治療薬（例えば、アプタマー結合体または改変ヌクレオチドなどの変異性化学を有するアプタマー）の薬物動態学的プロファイルおよび体内分布プロファイルを測定するために、種々のパラメータがモニターされる。そのようなパラメータとしては、例えば、半減期（ $t_{1/2}$ ）、血漿クリアランス（CL）、分布容積（V<sub>ss</sub>）、濃度時間曲線下面積（AUC）、観察された最大血清濃度または最大血漿濃度（C<sub>max</sub>）およびアプタマー組成物の平均滞留時間（MRT）が挙げられる。本明細書中で使用されるとき、用語「AUC」とは、アプタマー投与後の時間に対するアプタマー治療薬の血漿濃度のプロット下の面積のことをいう。AUC値は、所与のアプタマー治療薬のバイオアベイラビリティ（すなわち、アプタマー投与後の投与されたアプタマー治療薬の血液循環中のパーセンテージ）および/または総クリアランス（CL）（すなわち、アプタマー治療薬が血液循環から除去される速度）を推定するために使用される。分布容積は、アプタマー治療薬の血漿濃度を体内のアプタマーの量に関連付けるものである。V<sub>ss</sub>が大きいほど、血漿外に認められるアプタマーが多い（すなわち、血管外遊出が多い）。

30

#### 【0223】

本発明は、調節部分（例えば、小分子、ペプチドまたはポリマー末端基）にアプタマーを結合体化することによってか、または改変ヌクレオチドをアプタマーに組み込むことによって、インビボ安定化アプタマー組成物の薬物動態および体内分布を制御された様式において調節する材料および方法を提供する。本明細書中に記載されるように、改変部分および/または変異ヌクレオチドの化学組成物の結合体化によって、血液循環中のアプタマー滞留時間および組織への分布の基本的局面が変化する。

40

#### 【0224】

オリゴヌクレオチド治療薬は、ヌクレアーゼによるクリアランスに加えて、腎臓濾過を介した排出に供される。同様に、静脈内に投与されたヌクレアーゼ抵抗性オリゴヌクレオチドは、濾過が阻止され得ない限り、代表的には10分未満のインビボ半減期を示す。これは、血流外から組織への急速な分布を促進することによってか、またはオリゴヌクレオチドの見かけの分子量を系球体に対する有効なサイズカットオフ値を超えて増加させることによって達成され得る。以下に記載するPEGポリマーへの小型の治療薬の結合体化（PEG化）によって、アプタマーの血液循環中の滞留時間を劇的に延長することができ、

50

それによって投薬頻度を低下し、そして血管標的に対する有効性が増大する。

【0225】

アプタマーは、種々の改変部分（例えば、高分子量ポリマー、例えば、PEG；ペプチド、例えば、Tat (HIV Tat タンパク質の13アミノ酸フラグメント (Vivesら (1997), J. Biol. Chem. 272 (25) : 16010 - 7) )、Ant (Drosophila antennapedia ホメオティックタンパク質の第3ヘリックス由来の16アミノ酸配列 (Pieterszら (2001), Vaccine 19 (11 - 12) : 1397 - 405) ) および Arg<sub>7</sub> (ポリアルギニンから構成される、正に帯電した短い細胞透過性ペプチド (Arg<sub>7</sub>) (Rothbardら (2000), Nat. Med. 6 (11) : 1253 - 7; Rothbard, J.ら (2002), J. Med. Chem. 45 (17) : 3612 - 8) ) ; および小分子、例えば、コレステロールなどの親油性化合物に結合体化され得る。本明細書中に記載の様々な結合体のうち、アプタマーのインビボ特性は、PEG基との複合体形成によって最も大きく変更される。例えば、2' - Fと2' - OMeとが混合された改変アプタマー治療薬と20 kDaのPEGポリマーとの複合体形成により、腎臓濾過が妨げられ、健常組織と炎症組織の両方へのアプタマー分布が促進する。さらに、20 kDaのPEGポリマー - アプタマー結合体は、アプタマーの腎臓濾過を妨げる際に、40 kDaのPEGポリマーと同程度の有効性をもたらすことが判明している。PEG化の1つの効果は、アプタマークリアランスに対するものであり、20 kDa部分の存在によってもたらされる全身曝露の延長によって、組織、特に高度に灌流される器官の組織および炎症部位の組織へのアプタマーの分布が促進される。アプタマー - 20 kDa PEGポリマー結合体は、PEG化アプタマーが優先的に炎症組織に蓄積するようにアプタマー分布を炎症部位に向かわせる。いくつかの場合において、20 kDa PEG化アプタマー結合体は、細胞（例えば、腎臓細胞）の内部に到達することができる。

10

20

【0226】

改変ヌクレオチドは、アプタマーの血漿クリアランスを調節するためにも使用することができる。例えば、インビトロおよびインビボにおいて高度のヌクレアーゼ安定性を示すことから現在のアプタマー作製の代表である、2' - Fと2' - OMeの両方の安定化化学を組み込まれた非結合体化アプタマーは、非改変アプタマーと比較するとき、血漿からの急速な喪失（すなわち、急速な血漿クリアランス）および組織（主に腎臓）への急速な分布を示す。

30

【0227】

（PEG誘導体化核酸）

上に記載したように、高分子量で非免疫原性のポリマーによる核酸の誘導体化は、核酸の薬物動態学的特性および薬力学的特性を変更する能力を有し、その核酸をより有効な治療薬にする。活性の好ましい変更は、ヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性の増大、腎臓を通過する濾過の減少、免疫系への曝露の減少および体内を通過する治療薬の分布の変更が挙げられ得る。

【0228】

本発明のアプタマー組成物は、ポリアルキレングリコール（「PAG」）部分で誘導体化され得る。PAG誘導体化核酸の例は、2003年11月21日出願の米国特許出願番号10/718, 833（この全体が本明細書中で参考として援用される）に見出される。本発明において使用される代表的なポリマーとしては、ポリエチレンオキシド（「PEO」）としても知られるポリエチレングリコール（「PEG」）およびポリプロピレングリコール（ポリイソプロピレングリコールを含む）が挙げられる。さらに、様々なアルキレンオキシド（例えば、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシド）のランダム共重合体またはブロック共重合体が、多くの用途において使用することができる。その最も一般的な形態において、PEGなどのポリアルキレングリコールは、各末端がヒドロキシル基で終結している線状ポリマー： $\text{HO} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{OH}$ である。このポリマー、すなわち、アルファ - 、オメガ - ジヒドロキシルポリ

40

50

エチレングリコールは、PEG - という記号が、以下の構造単位： $-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$ （ここで、 $n$ は、代表的には約4～約10,000の範囲である）を示すと理解されている場合に、 $HO-PEG-OH$ としても示され得る。

#### 【0229】

示されるように、PEG分子は、二官能性であり、時折、「PEGジオール」と呼ばれる。PEG分子の末端部分は、化合物上の反応部位で他の化合物にPEGが結合するために活性化され得るかまたは機能性部分に変換され得る、比較的反応性でないヒドロキシル部分、すなわちOH基である。そのような活性化されたPEGジオールは、本明細書中で二活性化PEGと呼ばれる。例えば、PEGジオールの末端部分は、比較的活性でないヒドロキシル部分である-OHを、N-ヒドロキシスクシンイミド由来のスクシンイミジル活性エステル部分で置換することによって、アミノ部分との選択的反応のための活性な炭酸エステルとして官能性付与されている。

10

#### 【0230】

多くの用途において、PEG分子が一官能性（または一活性化）となるように、一方の末端におけるPEG分子を本質的に非活性な部分でキャップすることが望ましい。活性化PEG用の複数の反応部位を一般に示すタンパク質治療薬の場合において、二官能性活性化PEGは、大規模な架橋をもたらし、それにより、機能的な凝集が低下する。一活性化PEGを作製するために、代表的には、PEGジオール分子の末端上の1つのヒドロキシル部分を、非反応性メトキシ末端部分である $-OCH_3$ で置換する。他方、PEG分子の非キャップ末端は、代表的には、表面上またはタンパク質などの分子上の反応部位での結合のために活性化され得る反応性末端部分に変換される。

20

#### 【0231】

PAGは、代表的には、水および多くの有機溶媒に対する可溶性、無毒性ならびに非免疫原性という特性を有するポリマーである。PAGの1つの用途は、そのポリマーを不溶性分子に共有結合して、得られるPAG-分子「結合体」を可溶性にすることである。例えば、水不溶性薬物であるパクリタキセルは、PEGに結合されると水溶性になることが示されている。Greenwaldら、J. Org. Chem., 60:331-336 (1995)。PAG結合体は、溶解性および安定性を向上するためだけでなく、分子の血液循環半減期を延長させるためにも使用されることが多い。

30

#### 【0232】

本発明のポリアルキル化化合物は、代表的には5～80kDaのサイズであるが、しながら、任意のサイズを使用することができ、その選択は、アダプターおよび用途に依存する。本発明の他のPAG化合物は、10～80kDaのサイズである。本発明のさらに他のPAG化合物は、10～60kDaのサイズである。例えば、PAGポリマーは、少なくとも10、20、30、40、50、60または80kDaのサイズであり得る。そのようなポリマーは、線状であっても、分枝状であってもよい。いくつかの実施形態において、そのポリマーは、PEGである。いくつかの実施形態において、そのポリマーは、分枝状のPEGである。さらに他の実施形態において、そのポリマーは、図4に示されるような40kDaの分枝状のPEGである。いくつかの実施形態において、その40kDaの分枝状のPEGは、図5に示されるようにアダプターの5'末端に結合している。

40

#### 【0233】

生物学的に発現されたタンパク質治療薬とは対照的に、核酸治療薬は、代表的には、活性化モノヌクレオチドから化学合成される。PEG-核酸結合体は、同じモノマー合成を繰り返してPEGを組み込むことによって調製され得る。例えば、ホスホルアミダイト型への変換によって活性化されるPEGは、固相オリゴヌクレオチド合成に組み込まれ得る。あるいは、オリゴヌクレオチド合成は、反応性PEGの結合部位の部位特異的な組み込みで終結され得る。これは、最も一般には、5'末端に遊離第1級アミンを付加する（固相合成の最後のカップリング工程において改変物質であるホスホルアミダイトを用いて組み込む）ことによって達成された。このアプローチを用いて、反応性PEG（例えば

50

、活性化されて、アミンと反応してアミンとの結合を形成するもの)を、精製オリゴヌクレオチドと混合し、カップリング反応を溶液中で起こす。

【0234】

PEG結合体化が治療薬の体内分布を変化させる能力は、多くの因子(結合体の見かけのサイズ(例えば、流体力学的半径に関して測定されるとき)を含む)に関連する。大きい結合体(10kDa超)は、腎臓による濾過をより効果的に阻止し、その結果として、小型の高分子(例えば、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド)の血清半減期を増大させることが知られている。PEG結合体が濾過を阻止する能力は、最大約50kDaのPEGのサイズに伴って増大することが示されている(その能力のさらなる増大は、半減期が腎臓による排出ではなくマクロファージ媒介性代謝によって定義されるようになる

10

【0235】

高分子量PEG(10kDa超)の作製は、困難、非効率的、かつ高価であり得る。以前の研究では、高分子量PEG-核酸結合体の合成経路として、より高分子量の活性化PEGの作製に焦点が当てられていた。そのような分子を作製するための1つの方法は、2つ以上のPEGが活性化基を有する中心コアに結合している分枝状の活性化PEGの形成を含む。これらのより高分子量のPEG分子の末端部分、すなわち、比較的非反応性のヒドロキシル(-OH)部分は、活性化され得るか、または化合物上の反応部位において他の化合物にPEGの1つ以上を結合するための官能性部分に変換され得る。分枝状の活性化PEGは、3つ以上の末端を有し、2つ以上の末端が活性化されている場合は、そのよう

20

【0236】

本発明は、高分子量PEG-核酸(好ましくは、アプタマー)結合体(多様にPEG化された核酸を含む)を合成するための別の対費用効果の高い経路を提供する。本発明はまた、PEG結合型多量体オリゴヌクレオチド、例えば、ダイマー化アプタマーも包含する。本発明はまた、PEG安定化部分が、アプタマーの様々な部分を分離するリンカーである、例えば、PEGが、単一のアプタマー配列内で結合体化されて、高分子量アプタマー組成物の線状の配置が、例えば、核酸-PEG-核酸(-PEG-核酸)<sub>n</sub>(ここで、nは1以上である)となる高分子量組成物にも関する。

30

【0237】

本発明の高分子量組成物は、少なくとも10kDaの分子量を有するものを含む。組成物は、代表的には10~80kDaのサイズの分子量を有する。本発明の高分子量組成物は、少なくとも10、20、30、40、50、60または80kDaのサイズである。

40

【0238】

安定化部分は、本発明の高分子量アプタマー組成物の薬物動態学的特性および薬力学的特性を改善する分子または分子の部分である。いくつかの場合において、安定化部分は、2つ以上のアプタマーまたはアプタマードメインを近接して配置するか、または本発明の高分子量アプタマー組成物の回転性自由全体を低下させる分子またはその分子の部分である。安定化部分は、線状または分枝状の、ホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得る、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコールであり得る。他の安定化部分は、ペプチド核酸(PNA)などのポリマーを含む。オリゴヌクレオチドもまた、安定化部分であり得る;そのようなオリゴヌクレオチドは、改変ヌクレオチドおよび/またはホスホロチオエートなどの改変結合を含み得る。安定化部分は、アプタマー組成物の不可

50

欠な部分であり得、すなわち、安定化部分は、アプタマーに共通結合している。

【0239】

本発明の組成物は、2つ以上の核酸部分が、少なくとも1つのポリアルキレングリコール部分に共有結合的に結合体化している高分子量アプタマー組成物を含む。そのポリアルキレングリコール部分は、安定化部分として働く。ポリアルキレングリコール部分がアプタマーのいずれかの末端に共有結合し、ポリアルキレングリコールが、1つの分子中の核酸部分と結合している組成物において、そのポリアルキレングリコールは、結合部分といわれる。そのような組成物において、共有結合性分子の1次構造は、核酸 - P A G - 核酸という線状配置を含む。1つの例は、核酸 - P E G - 核酸という1次構造を有する組成物である。別の例は、核酸 - P E G - 核酸 - P E G - 核酸という線状配置である。

10

【0240】

核酸 - P E G - 核酸結合体を作製するために、最初に、単一の反応性部位を有するように核酸を合成する(例えば、それは一活性化である)。好ましい実施形態において、この反応性部位は、オリゴヌクレオチドの固相合成法における最後の工程として改変物質ホスホルアミダイトを付加することによって5'末端に導入されたアミノ基である。改変オリゴヌクレオチドの脱保護および精製の後、活性化P E Gの自発的な加水分解を最小限にする溶液中で高濃度に再構成される。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドの濃度は、1 mMであり、再構成された溶液は、200 mMのNaHCO<sub>3</sub>緩衝液、pH 8.3を含む。結合体の合成は、高度に精製された二官能性P E Gをゆっくりと段階的に加えることによって開始される。好ましい実施形態において、P E Gジオールは、プロピオン酸スクシンイミジルを用いた誘導体化によって両端において活性化される(二活性化)。反応後、P E G - 核酸結合体を、ゲル電気泳動または液体クロマトグラフィによって精製することにより、完全に結合体化された種と部分的に結合体化された種と結合体化されていない種に分離される。複数の鎖状P A G分子(例えば、ランダム共重合体またはブロック共重合体として)またはより短いP A G鎖が連結されて、様々な長さ(または分子量)が達成され得る。非P A Gリンカーは、様々な長さのP A G鎖の間において使用することができる。

20

【0241】

2'-O-メチルヌクレオチド、2'-フルオロヌクレオチドおよび他の改変ヌクレオチドによる改変は、ヌクレアーゼに対してアプタマーを安定化し、そしてそのインビボにおける半減期を延長する。3'-3'-dTキャップもまた、エキソヌクレアーゼ抵抗性を増大させ得る。例えば、米国特許第5,674,685号;同第5,668,264号;同第6,207,816号;および同第6,229,002号(これらの各々の全体が、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

30

【0242】

(反応性核酸のP A G誘導体化)

高分子量P A G - 核酸 - P A G結合体は、2つ以上の反応性部位を含む核酸との単官能性活性化P E Gの反応によって調製され得る。1つの実施形態において、その核酸は、二反応性または二活性化であり、そして従来のホスホルアミダイト合成、例えば:図6に示されるような3'-5'-ジ-P E G化を介してオリゴヌクレオチドに導入される2つの反応性部位:5'-アミノ基および3'-アミノ基を含む。別の実施形態において、反応性部位は、例えば、第1級アミンの結合用の部位としてピリミジンの5位、プリン8位またはリボースの2'位を用いて内部の位置に導入され得る。このような実施形態において、核酸は、いくつかの活性化部位または反応性部位を有し得、そして、その核酸は、多様に活性化されているといわれる。合成および精製の後、改変オリゴヌクレオチドは、自発的な加水分解を最小限にしながら、オリゴヌクレオチド反応性部位との選択的反応を促進する条件下で一活性化P E Gと結合される。好ましい実施形態において、モノメトキシ-P E Gは、プロピオン酸スクシンイミジルによって活性化され、そしてその結合化反応は、pH 8.3で行われる。二置換P E Gの合成を駆動するために、オリゴヌクレオチドに対して化学量論的に過剰なP E Gを提供する。反応後、P E G - 核酸結合体を、ゲル電

40

50

気泳動または液体クロマトグラフィによって精製することにより、完全に結合体化された種と部分的に結合体化された種と結合体化されていない種とに分離される。

【0243】

連結ドメインはまた、それに結合される1つ以上のポリアルキレングリコール部分を有し得る。そのようなPAGは、様々な長さであり得、適切な組み合わせにおいて使用されることにより、組成物の所望の分子量が達成され得る。

【0244】

特定のリンカーの効果は、その化学組成と長さの両方によって影響され得る。長すぎるか、短すぎるか、またはIL-23および/もしくはIL-12と望ましくない立体的相互作用および/もしくはイオン性相互作用を形成するリンカーは、アダプターとIL-23および/またはIL-12との間に複合体が形成されるのを妨害する。核酸間にまたがる必要とされる長さよりも長いリンカーは、リガンドの有効濃度を低下させることによって結合安定性を低減させ得る。従って、標的へのアダプターの親和性を最大にするために、しばしば、リンカーの組成および長さを最適化する必要がある。

10

【0245】

本明細書中に引用されるすべての出版物および特許文献は、その出版物または文献の各々が、本明細書中で参考として援用されると明確かつ個々に示されているかのように、本明細書中で参考として援用される。出版物および特許文献の引用は、いずれも関連する先行技術であるという容認と解釈されず、また、それらの内容および日付に関する容認とするようには解釈されない。本発明は、記述された書面を介して説明されるが、本発明が種々の実施形態において実施され得ること、および前述の記載および下記の実施例が添付の特許請求の範囲を説明する目的であり、特許請求の範囲を限定する目的でないことを当業者は理解するだろう。

20

【実施例】

【0246】

(実施例1：アダプターのセレクションおよび配列)

(IL-23アダプターのセレクション)

IL-23およびIL-12に対して種々の特異性を有するリガンドを作製するために、いくつかのSELEX<sup>TM</sup>戦略を用いた。IL-12よりもIL-23に特異的なアダプターを生成するように設定された1つのスキームは、ネガティブセレクション工程にIL-12を含めて共通のサブユニットを認識するアダプターを排除し、IL-23に特異的なアダプターについて選別するものであった。IL-23とIL-12とを1回おきに代わる代わる用いる別個のSELEX<sup>TM</sup>スキームにより、共通のサブユニットを認識するために両方ともタンパク質を認識するアダプターを排除した。実施例1Aおよび1Eでは、2'-OHプリンおよび2'-Fピリミジン(rRfY)を含んでいるプールを用いてセレクションを行った。細胞ベースアッセイにおいてIL-23活性を阻止した際の結合親和性および効率に基づいて、これらのセレクション由来のクローンを最適化した。さらに、2'-OMeヌクレオチド含有プール、すなわち、rRmY(2'-OH AおよびGならびに2'-OMe CおよびU)、rGmH(2'-OH Gおよび2'-OMe C、U、A)およびdRmY(デオキシAおよびGならびに2'-OMe CおよびU)によるセレクションを以下の実施例1B、1Cおよび1Dに記載する。

30

40

【0247】

(実施例1A：2'-フルオロピリミジン含有プール(rRfY)を用いたヒトIL-23に対するセレクション)

2'-OHプリン(リボプリン(ribo-purine))および2'-Fピリミジンヌクレオチドからなるプールを用いて(rRfY条件)ヒト(h)-IL-23に対するアダプターを同定するために、3つのセレクションを行った。第1のセレクション(h-IL-23)は、p19およびp40ドメインを含むh-IL-23に対する直接的なセレクションであった。第2のセレクション(X-IL-23)は、h-IL-23とh-IL-12とを交互に利用して、2つのタンパク質に共通のサブユニットp40に

50

対するアプタマーのセレクションを推進するものであった。第3のセレクション (PN-IL-23) では、ネガティブセレクション工程に h-IL-12 を含めて、h-IL-23 に固有のサブドメイン p19 に結合するアプタマーの濃縮を推進した。下に記載されるように、この第3のセレクション、すなわち、PN-IL-23 セレクションのための出発物質は、h-IL-23 セレクション由来のプールの一部、すなわち、h-IL-23 タンパク質に対するセレクションを2回行った後の h-IL-23 プールの残りの部分から分離されたものであった。3つすべてのセレクションストラテジーによって、h-IL-23 に対するアプタマーが得られた。いくつかのアプタマーが、h-IL-23 に対して高度に特異的であり、いくつかのアプタマーが、h-IL-23 と h-IL-12 との間で交差反応性を示し、そして1つのアプタマーが、h-IL-23 よりも h-IL-12 に対して特異的である。

10

【0248】

第1回の h-IL-23 および PN-IL-23 セレクションは、100  $\mu$ L の最終容積中に 100 pmol の IL-23 タンパク質 (R&D, Minneapolis, MN) とともに  $^{32}$ P ATP 本体が標識されたプールのスパイク (spike) を含んでいる、 $2 \times 10^{14}$  分子の 2' F ピリミジン改変 ARC212 プール (配列番号 8)

【0249】

【化47】

(5'gggaaaagcgaaucauacacaaga-N40-gcuccgccagagaccaaccgagaa3')

20

の室温で1時間のインキュベーションから開始した。鑄型 (配列番号 8) 中の N の連なりは、任意のヌクレオチドの組み合わせであり得、得られるアプタマーに固有の配列領域をもたらす。

【0250】

第2回の後、プールを2つに等しく分割し、一方の部分を、h-IL-23 セレクションのその後の回 (すなわち、第3~12回) に使用し、他方の部分を、PN-IL-23 セレクションのその後の回 (すなわち、第3~11回) に使用した。プール RNA を 50 pmol の h-IL-23 および 50 pmol の h-IL-12 とともにインキュベートしたこと以外は同様に、X-IL-23 セレクションの第1回を行った。

【0251】

すべてのセレクションを、 $1 \times$  SHMCK 緩衝液, pH 7.4 (20 mM Hepes pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) 中に行った。Schleicher & Schuell (Keene, NH) 製の 0.45  $\mu$ m ニトロセルローススピンカラムを用いて、RNA : h-IL-23 複合体と遊離 RNA 分子とを分離した。そのカラムは、1 mL の  $1 \times$  SHMCK で予め洗浄しておき、次いで、RNA : タンパク質含有溶液をそのカラムに加え、1500 g で2分間遠心した。緩衝液による洗浄を行うことにより、非特異的結合物をフィルターから除去し (第1回は、 $2 \times 500 \mu$ L の  $1 \times$  SHMCK ; その後の回は、回数および容積を増やして、よりストリンジェントな洗浄を行うことにより、特異的な結合物を濃縮した)、次いで、フィルターに付着している RNA : タンパク質複合体を、溶出緩衝液 (95 に

30

40

【0252】

【化48】

5'ttctcggttggtctctctggcggagc 3'

(配列番号 10) を使用して、Thermoscript<sup>TM</sup> RT-PCR システム (Invitrogen, Carlsbad, CA) を製造者の指示書に従って用いて逆転写

50

した後、PCR (20 mM Tris pH 8.4、50 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 μMの5'プライマー

【0253】

【化49】

5'taatagcactataggaaaagcgaatcatcacacaaga 3'

(配列番号9)、0.5 μMの3'プライマー(配列番号10)、0.5 mM 各dNTP、0.05単位/μLのTaqポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA))により増幅した。PCR反応は、以下のサイクル条件下で行った：a) 94 30秒；b) 55 30秒；c) 72 30秒。サイクルは、十分なPCR産物が生成されるまで繰り返した。十分なPCR産物を生成するのに必要なサイクルの最小数を以下の表1~3に「PCR閾値」として報告する。

10

【0254】

PCR鑄型を、QIAquick PCR精製キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。<sup>32</sup>P ATP本体標識(body labeling)(4% PEG-8000、40 mM Tris pH 8.0、12 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM スペルミジン、0.002% Triton X-100、3 mM 2' OHプリン、3 mM 2' Fピロリジン、25 mM DTT、0.0025単位/μLの無機ピロホスファターゼ、2 μg/mLのT7 Y639F単変異RNAポリメラーゼ、5 μCiの<sup>32</sup>P ATP)を用いて、37 で一晩、鑄型を転写した。この反応物を、Bio Spinカラム(Bio-Rad, Hercules, CA)を製造者の指示書に従って用いて脱塩した。

20

【0255】

表1~3に示す変更点以外は第1回と同じ方法を用いて3つすべてのセレクションのその後の回を繰り返した。タンパク質標的とのインキュベーションの前に、プールRNAを0.45ミクロンのニトロセルロースフィルターカラムに通すことにより、フィルターに結合する配列を除去し、次いで、その濾液を用いて、ポジティブセレクション工程を続けた。交互回において、プールRNAをゲル精製した。転写反応を50 mM EDTAでクエンチし、エタノール沈殿して、1.5 mm変性ポリアクリルアミドゲル(8 M尿素、10% アクリルアミド；19:1のアクリルアミド：ビスアクリルアミド)上で精製した。1×TBE(90 mM Tris、90 mM ホウ酸、0.2 mM EDTA)中で225 Vにて1時間、Elutrap(登録商標)装置(Schleicher and Schuell, Keene, NH)における電気溶出によって、プールRNAをゲルから取り出した。溶出した材料を300 mM酢酸ナトリウムおよび2.5容積のエタノールを加えることによって沈殿させた。

30

【0256】

そのRNAは、全セレクションにわたって過剰量のタンパク質中に残存していた(約1~2 μMのRNA)。そのタンパク質濃度は、最初の2回は1 μMであり、その後、特定のセレクションに基づいて様々な低い濃度に低下させた。競合tRNAを0.1 mg/mLで結合反応物に加えたが、この手順は、セレクションに依存して第3回または第4回で開始した。選ばれた回で結合アッセイを行いながら、合計11~12回を完了した。以下の表1~3は、h-IL-23、X-IL-23およびPN-IL-23セレクションストラテジーを用いたrRfYセレクションに使用したセレクションの詳細(各回に使用したプールRNA濃度、タンパク質濃度およびtRNA濃度を含む)を含んでいる。ドットプロット結合アッセイとともに溶出値(タンパク質結合RNAのCPM値 対 フィルターカラムを通過して流出した全RNAのCPM値の比)を使用して、セレクションの進行をモニターした。

40

表1. h-IL-23セレクションに使用した条件

【0257】

【表 1】

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | タンパク<br>質タイプ | タンパク質<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | tRNA<br>濃度<br>(mg/mL) | neg | %溶出  | PCR<br>閾値 |
|--------|---------------------------------------|--------------|----------------------------------|-----------------------|-----|------|-----------|
| 1      | 3.3                                   | IL-23        | 1                                | 0                     | なし  | 4.38 | 10        |
| 2      | ~1                                    | IL-23        | 1                                | 0                     | NC  | 0.85 | 10        |
| 3      | 0.8                                   | IL-23        | 0.75                             | 0                     | NC  | 10.9 | 8         |
| 4      | ~1                                    | IL-23        | 0.5                              | 0.1                   | NC  | 0.53 | 8         |
| 5      | 1                                     | IL-23        | 0.1                              | 0.1                   | NC  | 1.72 | 11        |
| 6      | ~1                                    | IL-23        | 0.1                              | 0.1                   | NC  | 0.11 | 12        |
| 7      | 1                                     | IL-23        | 0.1                              | 0.1                   | NC  | 1.15 | 8         |
| 8      | ~0.5                                  | IL-23        | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 0.12 | 11        |
| 9      | 0.5                                   | IL-23        | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 3.54 | 8         |
| 10     | ~0.5                                  | IL-23        | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 0.18 | 12        |
| 11     | 0.5                                   | IL-23        | 0.025                            | 0.1                   | NC  | 1.09 | 12        |
| 12     | ~0.5                                  | IL-23        | 0.025                            | 0.1                   | NC  | 0.07 | 12        |

10

20

表 2 . X - I L - 2 3 セレクションに使用した条件

【 0 2 5 8 】

【表 2】

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | タンパク質<br>タイプ    | タンパク<br>質濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | tRNA<br>濃度<br>(mg/mL) | neg | %溶出  | PCR<br>閾値 |
|--------|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------|-----|------|-----------|
| 1      | 3.3                                   | IL-23/<br>IL-12 | 各々0.5                            | 0                     | なし  | 3.15 | 10        |
| 2      | ~1                                    | IL-23/<br>IL-12 | 各々0.5                            | 0                     | NC  | 0.56 | 10        |
| 3      | 0.8                                   | IL-12           | 0.75                             | 0                     | NC  | 0.58 | 13        |
| 4      | ~1                                    | IL-23           | 0.75                             | 0.1                   | NC  | 0.37 | 8         |
| 5      | 1                                     | IL-12           | 0.5                              | 0.1                   | NC  | 0.38 | 11        |
| 6      | ~1                                    | IL-23           | 0.1                              | 0.1                   | NC  | 0.08 | 12        |
| 7      | 1                                     | IL-12           | 0.1                              | 0.1                   | NC  | 0.50 | 9         |
| 8      | ~0.5                                  | IL-23           | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 0.10 | 11        |
| 9      | 0.5                                   | IL-12           | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 0.83 | 11        |
| 10     | ~0.5                                  | IL-23           | 0.05                             | 0.1                   | NC  | 0.17 | 8         |
| 11     | 0.5                                   | IL-12           | 0.025                            | 0.1                   | NC  | 0.91 | 12        |
| 12     | ~0.5                                  | IL-23           | 0.025                            | 0.1                   | NC  | 0.05 | 12        |

30

40

表 3 . P N - I L - 2 3 に使用した条件

50

【 0 2 5 9 】

【 表 3 - 1 】

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | タンパク<br>質タイプ | タンパク質<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | tRNA<br>濃度<br>(mg/<br>mL) | neg      | neg<br>IL-<br>12<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | %溶出  | PCR<br>閾値 |
|--------|---------------------------------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|----------|---------------------------------------------|------|-----------|
| 1      | 3.3                                   | IL-23        | 1                                | 0                         | なし       | 0                                           | 4.38 | 10        |
| 2      | ~1                                    | IL-23        | 1                                | 0                         | NC       | 0                                           | 0.85 | 10        |
| 3      | 0.8                                   | IL-23        | 0.75                             | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.75                                        | 1.15 | 10        |
| 4      | ~1                                    | IL-23        | 0.75                             | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.75                                        | 0.59 | 10        |
| 5      | 0.7                                   | IL-23        | 0.5                              | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.5                                         | 4.19 | 10        |
| 6      | ~1                                    | IL-23        | 0.1                              | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.5                                         | 0.05 | 14        |
| 7      | 1                                     | IL-23        | 0.1                              | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.5                                         | 0.38 | 10        |
| 8      | ~1                                    | IL-23        | 0.1                              | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.3                                         | 0.18 | 15        |
| 9      | 1                                     | IL-23        | 0.1                              | 0.1                       | NC/IL-12 | 0.5                                         | 2.81 | 8         |

10

20

【 0 2 6 0 】

【 表 3 - 2 】

|    |    |       |      |     |          |     |      |    |
|----|----|-------|------|-----|----------|-----|------|----|
| 10 | ~1 | IL-23 | 0.05 | 0.1 | NC/IL-12 | 0.5 | 0.21 | 10 |
| 11 | ~1 | IL-23 | 0.05 | 0.1 | NC/IL-12 | 0.5 | 1.35 | 12 |

r R f Yセレクションの進行のモニタリング。全セレクションにわたってドットプロット結合アッセイを行い、プールのタンパク質結合親和性をモニターした。微量<sup>32</sup>P標識RNAをh-IL-23の希釈系列と混合し、そして1×SHMCK(20mM Hepes、120mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub>、pH7.4)+0.1mg/mLのtRNA中、最終容積20 $\mu$ Lで室温にて30分間インキュベートした。結合反応を、Minifold Iドットプロット、96ウェル真空濾過マニフォールド(Schleicher & Schuell, Keene, NH)を用いたニトロセルロース濾過によって解析した。(上から下に)Protranニトロセルロース(Schleicher & Schuell)、Hybond-Pナイロン(Amersham Biosciences)およびGB002ゲルプロットペーパー(Schleicher & Schuell)からなる3層の濾過媒体を用いた。タンパク質に結合したRNAは、ニトロセルロースフィルター上に捕捉されるのに対し、非タンパク質結合RNAは、ナイロンフィルター上に捕捉される。ゲルプロットペーパーは、単に他のフィルターに対する支持媒体として含まれた。濾過後、そのフィルター層を分離し、乾燥し、蛍光体スクリーン(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)上で露光し、そしてStorm 860 Phosphor imager(登録商標)プロットイメージングシステム(Amersham Biosciences)を用いて定量化した。

30

40

【 0 2 6 1 】

h-IL-23非存在下のRNAの結合性に対するh-IL-23存在下のRNAの結合性の比が、著しい正の比であるとき、そのプールを、TOPO TAクローニングキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を製造者の指示書に従って用いてクローニングした。h-IL-23およびX-IL-23のセレクションでは、第8回の

50

プール鑄型をクローニングし、そして各セクション由来の32個の個別のクローンを1点ドットプロットスクリーニング(+/- 75 nM h-IL-23、ならびに +/- 75 nM h-IL-12で別個のスクリーニング)でアッセイした。PN-IL-23セクションでは、第10回のプールをクローニングして配列決定し、そして8個の固有クローンを、1点ドットプロットスクリーニング(+/- 200 nM h-IL-23および +/- 200 nM h-IL-12での別個のスクリーニング)においてタンパク質結合性についてアッセイした。続いて、第10回のPN-IL-23プールを、R12 PN-IL-23プールと同様にさらなる配列決定に向けて再クローニングし、そしてそのクローンを、1点ドットプロット(dot blot)スクリーニング(+/- 100 nM h-IL-23または +/- 200 nM h-IL-12)においてタンパク質結合性についてアッセイした。K<sub>D</sub>を決定するために、クローン転写産物を<sup>32</sup>P-ATPで5'末端標識した。K<sub>D</sub>値は、最初のスクリーニングにおいて良好な+/- h-IL-23結合比を有したすべての固有配列に対するドットプロットアッセイにおけるh-IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN)の希釈系列を用いて、かつ、得られたデータを1:1のRNA:タンパク質複合体を示す方程式(結合した画分/アプタマー = 振幅 \* ([IL-23] / (K<sub>D</sub> + [IL-23])) (Kaleida Graph v.3.51, Synergy Software)に当てはめることによって決定した。タンパク質結合性の特徴付けの結果を表4に作表した。h-IL-23に対して高親和性を有するクローンを調製し、以下の実施例3に記載する細胞ベースアッセイにおいて機能性についてスクリーニングした。

表4. rRfYクローン結合活性(すべての測定を0.1 mg/mLのtRNA存在下で行った)

【0262】

10

20

【表 4 - 1】

| 第8回 h-IL-23 |          |                              |                              | 1点スクリーニングデータ                                 |                   |                   |
|-------------|----------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 配列番号        | クローン名    | K <sub>D</sub> IL-23<br>(nM) | K <sub>D</sub> IL-12<br>(nM) | K <sub>D</sub> IL-12/K <sub>D</sub><br>IL-23 | +/-IL-23<br>75 nM | +/-IL-12<br>75 nM |
| 15          | AMX86-B5 | 195.5                        | N.B.                         |                                              | 5.79              | 1.01              |
| 27          | AMX86-C5 | 80.3                         | 399.8                        | 4.98                                         | 6.23              | 2.65              |
| 13          | AMX86-D5 | 27.4                         | N.B.                         |                                              | 7.17              | 1.52              |
| 16          | AMX86-D6 | 25                           | N.B.                         |                                              | 9.82              | 1.43              |
| 24          | AMX86-E6 | 51.3                         | N.B.                         |                                              | 9.02              | 1.13              |
| 22          | AMX86-F6 | 69.1                         | N.B.                         |                                              | 10.17             | 1.36              |
| 18          | AMX86-A7 | 57.7                         | 667.9                        | 11.58                                        | 3.99              | 1.59              |
| 14          | AMX86-B7 | 111                          | 934.1                        | 8.42                                         | 7.81              | 1.46              |
| 20          | AMX86-C7 | 140.3                        | N.B.                         |                                              | 4.65              | 0.77              |
| 19          | AMX86-E7 | 210.2                        | 267.5                        | 1.27                                         | 6.79              | 1.23              |
| 21          | AMX86-F7 | 147                          | 106.4                        | 0.72                                         | 13.07             | 2.49              |
| 25          | AMX86-H7 | 89.8                         | N.B.                         |                                              | 10.85             | 1.26              |
| 26          | AMX86-C8 | 107.1                        | N.B.                         |                                              | 5.28              | 1.17              |
| 23          | AMX86-D8 | 294.2                        | N.B.                         |                                              | 6.87              | 1.08              |
| 17          | AMX86-G8 | 133.7                        | 2493.1                       | 18.65                                        | 7.26              | 2.05              |

| 第8回 X-IL-23 |          |                                 |                              | 1点スクリーニングデータ                                      |                   |                   |
|-------------|----------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 配列番号        | クローン名    | IL-23<br>K <sub>D</sub><br>(nM) | IL-12 K <sub>D</sub><br>(nM) | K <sub>D</sub> IL-<br>12/K <sub>D</sub> IL-<br>23 | +/-IL-23<br>75 nM | +/-IL-12<br>75 nM |
| 41          | AMX86-A9 | 190.5                           | N.B.                         |                                                   | 3.55              | 0.68              |
| 35          | AMX86-B9 | 23.7                            | 847.6                        | 35.76                                             | 12.88             | 1.96              |
| 32          | AMX86-C9 | 97.9                            | 672.8                        | 6.87                                              | 6.07              | 1.86              |
| 33          | AMX86-G9 | 109.4                           | N.B.                         |                                                   | 10.03             | 1.04              |

【 0 2 6 3 】

【表 4 - 2】

|    |           |        |        |       |       |      |
|----|-----------|--------|--------|-------|-------|------|
| 39 | AMX86-H9  | 104.6  | 331.5  | 3.17  | 10.35 | 3.66 |
| 34 | AMX86-A10 | 460.9  | 289.4  | 0.63  | 6.64  | 1.40 |
| 28 | AMX86-B10 | 77.8   | 1038.3 | 13.35 | 4.73  | 2.12 |
| 42 | AMX86-E10 | 218.1  | 904.6  | 4.15  | 2.44  | 1.37 |
| 36 | AMX86-G10 | 73.7   | 356.1  | 4.83  | 9.88  | 2.41 |
| 37 | AMX86-A11 | 157.2  | 182.4  | 1.16  | 7.05  | 3.23 |
| 29 | AMX86-B11 | 179.9  | 5950   | 33.07 | 9.23  | 1.69 |
| 30 | AMX86-D11 | 198.9  | 113.9  | 0.57  | 10.26 | 2.59 |
| 38 | AMX86-F11 | 255.64 | 540.6  | 2.11  | 7.33  | 2.87 |
| 40 | AMX86-H11 | 366.9  | 214.9  | 0.59  | 7.56  | 3.02 |
| 31 | AMX86-F12 | 423.7  | 2910.3 | 6.87  | 11.88 | 2.51 |

| PN-IL-23クローン |                 |           |                           |                           | 1点スクリーニングデータ    |                 |                 |
|--------------|-----------------|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 配列番号         | クローン名           | PN-IL-23回 | IL-23 K <sub>D</sub> (nM) | IL-12 K <sub>D</sub> (nM) | +/-IL-23 200 nM | +/-IL-23 100 nM | +/-IL-12 200 nM |
| 43           | AMX 84-A10      | R10       | 22.3                      | N.B.                      | 39.6            |                 | 2.9             |
| 44           | AMX 84-B10      | R10       | 21.8                      | N.B.                      | 22.7            |                 | 1.3             |
| 45           | AMX 84-A11      | R10       | 17.8                      | N.B.                      | 32.7            |                 | 1.8             |
| 46           | AMX 84-F11      | R10       | 16.6                      | N.B.                      | 22.5            |                 | 0.8             |
| 47           | AMX 84-E12      | R10       | 27.8                      | N.B.                      | 15.8            |                 | 0.8             |
| 48           | AMX 84-C10      | R10       | 94.3                      | N.B.                      | 17.7            |                 | 2.2             |
| 49           | AMX 84-C11      | R10       | 15.5                      | 286.1                     | 23.4            |                 | 2.7             |
| 50           | AMX 84-G11      | R10       | 290.7                     | N.B.                      | 22.3            |                 | 1.7             |
| 51           | ARX33-プレート1-H01 | R12       | 77.8                      | N.B.                      |                 | 20.3            | 1.7             |
| 52           | AMX 91-F11      | R10       | 201.7                     | N.B.                      |                 | 11.4            | 2.2             |
| 53           | AMX 91-G1       | R10       | 82.3                      | N.B.                      |                 | 52.2            | 1.7             |
| 54           | AMX 91-E3       | R10       | 205.3                     | N.B.                      |                 | 34.4            | 2.9             |
| 55           | AMX 91-H3       | R10       | 265.7                     | N.B.                      |                 | 18.5            | 2.3             |
| 56           | AMX 91-B5       | R10       | 148.5                     | N.B.                      |                 | 11.2            | 0.9             |
| 57           | AMX 91-A6       | R10       | 60.3                      | N.B.                      |                 | 6.3             | 1.1             |
| 58           | AMX 91-G7       | R12       | 63.6                      | N.B.                      |                 | 38.1            | 1.9             |
| 59           | AMX 91-H7       | R12       | 71.0                      | N.B.                      |                 | 44.7            | 1.4             |

【 0 2 6 4 】

【表 4 - 3】

|    |            |     |       |       |  |      |     |
|----|------------|-----|-------|-------|--|------|-----|
| 60 | AMX 91-B8  | R12 | 17.6  | 409.1 |  | 34.0 | 7.9 |
| 61 | AMX 91-H8  | R12 | 16.6  | 243.2 |  | 25.2 | 4.1 |
| 62 | AMX 91-G9  | R12 | 33.0  | N.B.  |  | 31.7 | 1.1 |
| 63 | AMX 91-D9  | R12 | 44.6  | N.B.  |  | 25.1 | 2.1 |
| 64 | AMX 91-G11 | R12 | 104.4 | N.B.  |  | 12.5 | 1.7 |
| 65 | AMX 91-C12 | R12 | 30.7  | N.B.  |  | 22.9 | 1.9 |
| 66 | AMX 91-H12 | R12 | 60.8  | N.B.  |  | 48.6 | 1.2 |

10

N . B . = 顕著な結合が観察されなかった

表 5 において特徴付けられた r R f Y アプタマーの核酸配列を以下に示す。下記の各アプタマーに固有の配列は、配列 G G G A A A G C G A A U C A U A C A C A A G A ( 配列番号 1 1 ) の直後のヌクレオチド 2 5 から開始し、3' 固定核酸配列 G C U C C G C C A G A G A C C A A C C G A G A A ( 配列番号 1 2 ) に遭遇するまで続く。

【 0 2 6 5 】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5' から 3' の方向で示されており、r R f Y S E L E X <sup>T M</sup> 条件下で選別された、I L - 2 3 および / または I L - 1 2 に結合する配列を示し、ここで、プリン ( A および G ) は 2' - O H であり、ピリミジン ( U および C ) は 2' - フルオロである。表 5 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング ( 例えば、3' - 逆位 d T ) を含んでいても含んでいなくてもよい。

20

表 5 . h - I L - 2 3 セレクション ( 第 8 回 ) 、 X - I L - 2 3 セレクション ( 第 8 回 ) 、 P N - I L - 2 3 セレクション ( 第 1 0 / 1 2 回 ) 由来の r R f Y クローン配列

【 0 2 6 6 】

【表 5 - 1】

h-I L-23 セレクション ( 第 8 回 )

30

配列番号 13 (AMX(86)-D5)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCGGAGCAACUCGUGUCAGCGGUCAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 14 (AMX(86)-B7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGAAUUCGUCACGGCGCCCGAUGAUGUCAGUUUUCGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 15 (AMX(86)-B5)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUUGCGUGUGUUUGAAAGGCUCAUAAUGUCAGUAUCGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

40

配列番号 16 (AMX(86)-D6)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUUGCGUCGUGACAUAACUGGUCCACGAGCAUGUCAGUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

【 0 2 6 7 】

## 【表 5 - 2】

## 配列番号 17 (AMX(86)-G8)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGGAAGGCGAUCGUAGCAGUAAACCCAAUGAUUGGGACCUAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 18 (AMX(86)-A7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCUCUUUGGCCGACGCAACAAUGCUCUUUCCGACCUUGCGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 19 (AMX(86)-E7)

GGGAAAAGCGAAUCCUACCCAAGAUGUUGGUUGGCGUUGAUCGUAUGAUUNAUGGAGNGUGUCNGUCUCGCCAGAG  
ACCAACCGAGAA

10

## 配列番号 20 (AMX(86)-C7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGCUCUAUGUUUGGCUGGGAAUUGUAGCAUUGCUCUAGUGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 21 (AMX(86)-F7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUUGAACCCUCUUGUGCGUCCCGAUGUUUNGCAAUGUGGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 22 (AMX(86)-F6)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGUAUACAAUGCCCUAUCGUCAGUUAGGCAUGUGUGGAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

20

## 配列番号 23 (AMX(86)-D8)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGAGGCAAUGAGAGCCUGGCGAUGUCAGUCGCAUCUUGCUCGCCAGAGA  
CCAACCGAGAA

## 配列番号 24 (AMX(86)-E6)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCCGAAAAGGAGUUUGUCUCUGCUCUCGGAGUGUGUCAGUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 25 (AMX(86)-H7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGACUACACGCCAGUGUGCGCUUUUUGCGGAGUUAGCGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

30

## 配列番号 26 (AMX(86)-C8)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCGUGAUGAUUUGGGUUAUGUCAGUUCUCCUGUAUGGUUUCGCUCGCCAGAGA  
CCAACCGAGAA

## 配列番号 27 (AMX(86)-C5)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUUUUUUGUGGGUCCCGAUGAUUAACUUUAUUGGCGCAUUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## X-IL-23セクション(第8回)

## 配列番号 28 (AMX(86)-B10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAACGAGUAUAUUUGCGCUGGCGGAGAAGUCUCUCGAAGGGAGCUCGCCAGAG  
ACCAACCGAGAA

40

## 配列番号 29 (AMX(86)-B11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAUCAUUCGGCUGGUGGGAGAAAUCUCUGUAGAUUAAGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

【 0 2 6 8 】

## 【表 5 - 3】

## 配列番号 30 (AMX(86)-D11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUAGCGUCUAUGAUUGGCGGAGAAGCAAGUGUAGCAUAAACAGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 31 (AMX(86)-F12)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUUGAAUGAGCGCUGGUGGACAGAUUUUGGUUACAGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 32 (AMX(86)-C9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUCAUGGAUAUGGCCUAGCAGCCUGGAAGCGGUCAUUCUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

10

## 配列番号 33 (AMX(86)-G9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUCACGCGGUACGUGAGUCUGUAAAAGGCCACCUGAAUGUCGUCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 34 (AMX(86)-A10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUAAUGUGGGUCCCGAUGAUUCGCGUGCGGGUUGUAGCUCGCCAGAGACC  
AACCGAGAA

## 配列番号 35 (AMX(86)-B9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGGUUGAGUACGACGGAGUCNUGGCUAACACGGAAACUAGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

20

## 配列番号 36 (AMX(86)-G10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUCAUGGCUUACAAUUGAAACAAGAGCUCGCGUGACACAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 37 (AMX(86)-A11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGGCUAGGCAUCAUUGGCCAGCAAAAAUAGUCGUGUAAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 38 (AMX(86)-F11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACCAUCGGACGAGGGGUCACCUUUUACGCUUUCGAGCUGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

30

## 配列番号 39 (AMX(86)-H9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGGUUCCACGUGAAAUGGGCUAGCGAGUACCCACUUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCAAGGG

## 配列番号 40 (AMX(86)-H11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGCGCUUAGCGGUUAUAGCACUUUUAUCUAAUGAANCCGUAGCUCGCCAGAG  
ACCAACCGAGAA

## 配列番号 41 (AMX(86)-A9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUCAGAUUGUUCAGGUUUUUUGUACUCAACUAAAGGGCGAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

40

## 配列番号 42 (AMX(86)-E10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGUCUCGGAUUGGUCACUCCCAUUUUUGUUCGCUUAAACGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

【 0 2 6 9 】

## 【表 5 - 4】

## PN-IL-23 セレクション(第10/12回)

配列番号 43 (AMX(84)-A10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUGUGUCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCGCCAGAGA  
CAACCGAGAA

配列番号 44 (AMX(84)-B10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUCUUAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 45 (AMX(84)-A11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAGGUAUGUGGUUUUGCGGAGCAACUCGUGUCAGCGGUCAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

10

配列番号 46 (AMX(84)-F11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 47 (AMX(84)-E12)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAGUUUUUGUGUCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 48 (AMX(84)-C10)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGAUGUAUUCAGGCGGUCCGAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

20

配列番号 49 (AMX(84)-C11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUGGUCGGAUUCUCUGGCCACCGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 50 (AMX(84)-G11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGCUUCGUAUGUUGAAUACGACGUUCGCAGGACGAAUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 51 (ARX33-plate1-H01)

AGGGAAAAGGAAUCAUACACAAGAUGUAUCAUCCGGUCGUACAAAAGCGCCACGGAACCAUUCGCUCGCCAGANACC  
AACCGAGAA

30

配列番号 52 (AMX(91)-F11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGCGUCAGGUCCACGCUGAAAUUUAUUUCGGCAGUGUAAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 53 (AMX(91)-G1)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGUGCCUGGGAUGGACGACAUCCCCUGUCUAAGGAUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

配列番号 54 (AMX(91)-E3)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUACUCCGUUAGUGUCAGUUGACGGAGGGAGCGUACUUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

40

配列番号 55 (AMX(91)-H3)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUUGUCUUUAUCACGUGGGTUGUAACGACGAAAGUUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

【 0 2 7 0 】

## 【表 5 - 5】

## 配列番号 56 (AMX(91)-B5)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAGUGUAUGAGGAAGAUUACUCCAUUCCUGAGCGGUUUUCGCUCGCCAGAGA  
CCAACCGAGAA

## 配列番号 57 (AMX(91)-A6)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAUUGGCAAUGUGACC'UUCAACCCUUUCCCCGAUGAACAGUGGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 58 (AMX(91)-G7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACAUGACUGCAUGCUUCGGGAGUAUCUCGGUCCCGACGUUCGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

10

## 配列番号 59 (AMX(91)-H7)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAUCGCCUCAAGGGGGUAAUAAAACCCAGCGUGUGCAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 60 (AMX(91)-B8)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUCCUGGCUUCGCAUAGUGUAUGGGUAGUACGACAGCGGUGCUCGCCAGAGA  
CCAACCGAGAA

## 配列番号 61 (AMX(91)-H8)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAACGCAUAGUCGGAUUUACCGAUCAUUCUGUGCCUUCGUGACGCUCGCCAGAGA  
CCAACCGAGAA

20

## 配列番号 62 (AMX(91)-G9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAAUUGUGCUUACAACUUUCGUUGUACCGACGUGUCAGUUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 63 (AMX(91)-D9)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGAGUGUAUUACCCCAACCCAGGGGGACCAUUCGCGUAACAAGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 64 (AMX(91)-G11)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACUUAACAGUGCGGGGCGCAGUGUAUAGAUCCGCAAUGUGUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

30

## 配列番号 65 (AMX(91)-C12)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGAUAGUAUGACCUUUUGAAAAGGCUUCCCGAGCGGUGUUCGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

## 配列番号 66 (AMX(91)-H12)

GGGAAAAGCGAAUCAUACACAAGACGUGUGCUUUAUGUAAACCAUAACGUCCAUAAGGAUAUGCUCGCCAGAGAC  
CAACCGAGAA

上記のドットプロット結合アッセイによって測定されたときに I L - 2 3 標的タンパク質に対する結合活性を有し、かつ、細胞ベースアッセイ（下記の実施例 3 に記載する）において機能的であった配列を最小化した（下記の実施例 2 に記載する）。

40

## 【 0 2 7 1 】

（実施例 1 B : リボ / 2 ' O - M e ヌクレオチド含有プールを用いたヒト I L - 2 3 に対する I L - 2 3 セレクション）

リボ / 2 ' O - メチルヌクレオチドを含むアプタマーを同定するために 2 つのセレクションを行った。一方のセレクションは、2 ' O - メチル A、C および U ならびに 2 ' O H G ( r G m H ) を使い、他方のセレクションは、2 ' - O M e C、U および 2 ' - O H G、A ( r R m Y ) を用いた。両方とものセレクションが、疎水性プレート上に固定された h - I L - 2 3 に対する直接的なセレクションであった。p 1 9 または p 4 0 サブドメインに特異的なアプタマーのセレクションを偏らせる工程は行わなかった。両方のセレクションから、未処理で選別されていないプールよりも h - I L - 2 3 結合性について著しく濃縮されたプールを得た。個別のクローン配列を本明細書中において報告し、選別

50

された個別のクローンに対する h - I L - 2 3 結合データを提供する。

【 0 2 7 2 】

プールの調製。配列

【 0 2 7 3 】

【 化 5 0 】

5'-

GGGAGAGGAGAGAACGTTCTACN<sub>30</sub>CGCTGTCGATCGATCGATCGATG-3'

(ARC256)

10

(配列番号 3) を有する DNA 鋳型を、ABI EXPEDITE<sup>TM</sup> DNA 合成装置を用いて合成し、そして標準的な方法によって脱保護した。DNA 鋳型 (配列番号 3) 中の N の連なりは、ヌクレオチドの任意の組み合わせであり得、得られるアプタマーに固有の配列領域をもたらす。

【 0 2 7 4 】

その鋳型を 5' プライマー

【 0 2 7 5 】

【 化 5 1 】

5'-

20

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3'

(配列番号 67) および 3' プライマー

【 0 2 7 6 】

【 化 5 2 - 1 】

5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3'

(配列番号 68) を用いて増幅し、次いで、Y639F 単変異 T7 RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写に鋳型として使用した。転写は、200 mM Hepes、40 mM DTT、2 mM スペルミジン、.01% Triton X-100、10% PEG-8000、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 mM MnCl<sub>2</sub>、500 μM NTP、500 μM GMP、0.01 単位/μL の無機ピロホスファターゼおよび 2 μg/mL の Y639F 単変異 T7 ポリメラーゼを用いて、37 °C で一晩行った。2 つの異なる組成物 rGmH および rRmY を転写した。

30

【 0 2 7 7 】

セレクション。各回のセレクションは、室温で 2 時間、100 μL の 1 × Dulbecco's PBS (DPBS (+ Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>)) 中で Nunc Maxisorp 疎水性プレートの表面に 20 pmol の h - I L - 2 3 を固定することによって開始した。次いで、上清を除去し、ウェルを 120 μL の洗浄緩衝液 (1 × DPBS、0.2% BSA および 0.05% Tween-20) で 4 回洗浄した。プール RNA を 3 分間 90 °C に加熱し、10 分間室温に冷却してリフォールディングした。第 1 回では、ポジティブセレクション工程を行った。簡潔には、1 × 10<sup>14</sup> 分子 (0.2 nmol) のプール RNA を、タンパク質標的が固定されたウェル内の 100 μL の結合緩衝液 (1 × DPBS および 0.05% Tween-20) 中で 1 時間インキュベートした。次いで、上清を除去し、ウェルを 120 μL の洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。その後の回では、ネガティブセレクション工程を含めた。ポジティブセレクション工程の前に、プール RNA を空のウェル中で室温にて 30 分間インキュベートして、任意のプラスチック結合配列をプールから除去した。ストリンジェンシーを高めるために、第 4 回の後、洗浄回数を増加した。すべての場合において、RT ミックス (3' プライマー (配列番号 68) および Thermo script<sup>TM</sup> RT (Invitrogen, Carlsbad, CA) を加えた後、65 °C で 1 時間インキュベートすることによって、固定された h - I L - 2 3 に結合して

40

50

いるプールRNAをセレクションプレート中で直接、逆転写した。

【0278】

得られたcDNAを、Taqポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)を用いるPCRの鑄型として使用した。60 のアニーリング温度と組み合わせた「ホットスタート」PCR条件を用いて、プライマーダイマー形成を最小にした。増幅されたプール鑄型DNAを、Centrisepカラム(Princeton Separations, Adelphia, NJ)を用いて製造者が推奨する条件に従って脱塩し、そしてそれを用いて、次の回のセレクション用のプールRNAを転写した。転写されたプールを、毎回、10%ポリアクリルアミドゲル上でゲル精製した。セレクション1回あたりに使用したRNA濃度を表6に示す。

表6. セレクション1回あたりのRNAプール濃度。

【0279】

【表6】

| 回  | rRmY<br>(使用したプールのpmol) | rGmH<br>(使用したプールのpmol) |
|----|------------------------|------------------------|
| 1  | 200                    | 200                    |
| 2  | 110                    | 40                     |
| 3  | 65                     | 100                    |
| 4  | 50                     | 170                    |
| 5  | 80                     | 100                    |
| 6  | 100                    | 110                    |
| 7  | 50                     | 70                     |
| 8  | 120                    | 60                     |
| 9  | 120                    | 80                     |
| 10 | 130                    |                        |
| 11 | 110                    |                        |

セレクションの進行は、実施例1Aに記載したようにドットプロットサンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニターした。5' - <sup>32</sup>P標識プールRNAを90 で3分間リフォールディングし、そして10分間室温に冷却した。次に、プールRNA(極低濃度)をh-IL-23 DPBS+0.1mg/mLのtRNAとともに30分間、室温にてインキュベートし、次いで、ドットプロット装置(Schleicher and Schuell)におけるニトロセルロースフィルターとナイロンフィルターとのサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合したプールRNAのパーセンテージを計算し、そしておよそ3回ごとに1点スクリーニング(+/-250nM h-IL-23)を用いてモニターした。プールK<sub>D</sub>測定値を上に記載したようにh-IL-23タンパク質(R&D, Minneapolis, MN)の力価測定およびドットプロット装置を用いて測定した。

【0280】

セレクションを4回行った後に、rRmY h-IL-23セレクションを未処理プールに対してh-IL-23結合性について濃縮した(データ示さず)。セレクションストリンジエンシーを上げて、セレクションを8回超続けた。第9回において、プールK<sub>D</sub>は、約500nM以上であった。第10回において未処理プールの結合性に対してrGmHセレクションを濃縮した。プールK<sub>D</sub>はまた、約500nM以上であった。図7は、h-IL-23に結合するrRmYおよびrGmHプールセレクションの結合曲線である。こ

これらのプールを、TOPO TAクローニングキット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてクローニングし、個別の配列を生成して、結合性について試験した。まず、1:200希釈, +/- 200 nM IL-23 + 0.1 mg/mL 競合 tRNA を用いてすべての粗 rRmYクローン転写物において1点結合スクリーニングを行った。次いで、1点スクリーニングにおいて最良の結合性を示した rRmYクローンのうちの24個について、10点スクリーニングを行った。その10点スクリーニングは、0~480 nMのIL-23を3倍の連続希釈を用いて行った。結合曲線を作成し (KaleidaGraph v.3.51, Synergy Software)、そのデータを方程式: 結合RNAの割合 = 振幅 \* [h - IL-23] / K<sub>D</sub> + [h - IL-23] に当てはめることによって、K<sub>D</sub>を推定した。以下の表7は、h - IL-23に対して結合親和性を示した rRmYの選別されたアプタマーの配列データを示している。作製された rRmYクローンのうち1群の6重複配列および4対の2重複配列が存在した。表8は、そのように試験した rRmYクローンの結合特性を示している。1:200希釈で48個の粗 rGmHクローン転写からのクローンも試験し、0.1 mg/mLのtRNAを競合物として使用した。バックグラウンドの平均結合性は、たったの約14%であったのに対し、同じアッセイにおける rRmYクローンの平均は、約30%であり、10クローンが40%超であった。試験された rGmHクローンの配列および結合特性は、示していない。

10

【0281】

表7において特徴付けられる rRmYアプタマーの核酸配列を以下に示す。表7中の各アプタマーに固有の配列は、配列

20

【0282】

【化52-2】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC

(配列番号69)の直後のヌクレオチド23から始まり、3'固定核酸配列

【0283】

【化53】

GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

30

(配列番号70)に遭遇するまで続く。

【0284】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5'から3'の方向で示され、rRmY SELEX<sup>TM</sup>条件下で選択されたIL-23および/またはIL-12に結合するアプタマーの配列を示し、ここで、プリン(AおよびG)は、2'-OHであり、ピリミジン(UおよびC)は、2'-OMeである。表7に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール(「PAG」)部分で誘導体化され得、そしてキャッピング(例えば、3'-逆位dT)を含んでいても含んでいなくてもよい。

表7 - rRmY (第10回)配列

【0285】

40

【表 7 - 1】

配列番号 71

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAGAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 72

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 73

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 74

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGUAAAGCAGGCUGACUGAAAGGUUGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

10

配列番号 75

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUUAAAGCAGGCUCAGGAAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 76

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 77

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAACAAAGCAGGCUCAUAGUAAUAUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 78

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

20

配列番号 79

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAAAGGCAGGCUCAGGGGAUCACUGGAAGUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 80

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGAUUAUAUUAAGGAUAAGUGCAAAGGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 81

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAAUGAGAGCAGGCCGAAAAGGAGUCGCUCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

30

配列番号 82

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAGAGGCAAGAGAGAGUCGCAUAAAAAAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

【 0 2 8 6 】

【表 7 - 2】

配列番号 83

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGCAGGCUGUCGUAGACAAACGAUGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 84

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGA AAAAGAU AUGAAAGAAAGGAUUAAGAGACGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 85

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGGAAGGNAACAANAGCACUGUUUGUGCAGGCGCUGUCGAUCNAUCNAUCNAUG

配列番号 86

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAAUGCAGGCUCAGUUACUACUGGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 87

AGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGAAGCAGGCUCGAAUACA AUUCGGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

配列番号 88

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAUAAGCAGGCUCCGAUAGUAUUCGGGAAGUCGCGCUGUCGAUCGAUCGAUCGAU

10

表 8 - r R m Y I L - 2 3 クロ ー ン 結 合 デ ー タ 。

20

【 0 2 8 7 】

【表 8 - 1】

| 配列番号 | IL-23 K <sub>D</sub> (nM) |
|------|---------------------------|
| 72   | 211.4                     |
| 83   | 8.2                       |
| 86   | 219.3                     |
| 80   | 3786.3                    |
| 75   | 479.4                     |
| 74   | 257.0                     |
| 81   | 303.2                     |
| 77   | 258.9                     |
| 73   | 101.4                     |
| 88   | 101.2                     |
| 84   | 602.5                     |
| 78   | 123.7                     |
| 76   | 77.2                      |
| 87   | 122.3                     |
| 71   | 124.0                     |
| 85   | 239.9                     |

30

40

【 0 2 8 8 】

【表 8 - 2】

|    |       |
|----|-------|
| 82 | 198.6 |
| 79 | 806.7 |

\* \* アッセイは、 $1 \times \text{DPBS} (+ \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$  中、室温、30分間のインキュベートにおいて行った。

\* \* R & D I L - 23 ( キャリアを含まないタンパク質 )

( 実施例 1 C : デオキシ / 2' - O - メチルヌクレオチド含有プールを用いたヒト I L - 23 に対するセレクション )

h - I L - 23 ストラテジーを用いて、デオキシプリン ( A および G ) および 2' - O - M e ピリミジン ( C および U ) を使用した、I L - 23 に特異的で安定化されたアプタマーを得るために、別のセレクションを行った。

【 0 2 8 9 】

プールの調製。配列

【 0 2 9 0 】

【 化 5 4 】

5'-

GGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC<sub>30</sub>CGCTGTCGATCGATCGATCGATG-3'

( A R C 2 5 6、配列番号 3 ) を有する DNA 鋳型を、A B I E X P E D I T E T<sup>M</sup> D N A 合成装置を用いて合成し、標準的な方法により脱保護した。DNA 鋳型 ( 配列番号 3 ) 中の N の連なりは、ヌクレオチドの任意の組み合わせであり得、得られるアプタマーに固有の配列領域をもたらす。その鋳型を、5' プライマー

【 0 2 9 1 】

【 化 5 5 】

5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3'

( 配列番号 6 7 ) および 3' プライマー

【 0 2 9 2 】

【 化 5 6 】

5'-CATCGATCGATCGATCGACAGC-3'

( 配列番号 8 9 ) を用いて増幅し、次いで、Y 6 3 9 F 単変異 T 7 R N A ポリメラーゼを用いるインビトロ転写の鋳型として使用した。転写を、200mM H e p e s、40mM D T T、2mM スペルミジン、0.01% T r i t o n X - 1 0 0、10% P E G - 8 0 0 0、9.6mM M g C l<sub>2</sub>、2.9mM M n C l<sub>2</sub>、2mM N T P、2mM G M P、2mM スペルミン、0.01 単位 /  $\mu$  L の無機ピロホスファターゼおよび 2  $\mu$  g / m L の Y 6 3 9 F 単変異 T 7 ポリメラーゼを用いて、37 で一晩行った。

【 0 2 9 3 】

セレクション：各回のセレクションは、室温で1時間、100  $\mu$  L の  $1 \times \text{PBS}$  中で N u n c M a x i s o r p 疎水性プレートの表面に 20 p m o l の h - I L - 23 を固定することによって開始した。次いで、上清を除去し、ウェルを 120  $\mu$  L の洗浄緩衝液 (  $1 \times \text{PBS}$ 、0.1 m g / m L の t R N A および 0.1 m g / m L のサケ精子 DNA ( 「 s s D N A 」 ) ) で 5 回洗浄した。第 1 回において、ポジティブセレクション工程を行った：100 p m o l のプール RNA (  $6 \times 10^{13}$  固有分子 ) を、タンパク質標的が結合したウェル内の 100  $\mu$  L の結合緩衝液 (  $1 \times \text{PBS}$ 、0.1 m g / m L の t R N A および 0.1 m g / m L の s s D N A ) 中で 1 時間インキュベートした。次いで、上清を除去し、ウェルを 120  $\mu$  L の洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。その後の回では、ネガティブセレクション工程を含めた。ポジティブセレクション工程の前に、プール RNA を空のウェル

10

20

30

40

50

中で室温にて1時間インキュベートすることにより、任意のプラスチック結合配列をプールから除去した。第3回の開始時に、第2のネガティブセレクション工程を加えた。ポジティブセレクション工程の前に、標的が固定されたウェルを、100 $\mu$ Lのブロッキング緩衝液(1 $\times$ PBS、0.1mg/mLのtRNA、0.1mg/mLのssDNAおよび0.1mg/mLのBSA)中で室温にて1時間ブロッキングした。すべての場合において、RTミックス(3'プライマー(配列番号89)およびThermoscript<sup>TM</sup> RT(Invitrogen, Carlsbad, CA)を加えた後、65 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートすることによって、固定されたh-IL-23に結合しているプールRNAをセレクションプレート中で直接、逆転写した。得られたcDNAを、PCR(Taqポリメラーゼ、New England Biolabs, Beverly, MA)の鑄型として使用した。68 $^{\circ}$ Cのアニーリング温度と組み合わせた「ホットスタート」PCR条件を用いて、プライマーダイマー形成を最小にした。増幅されたプール鑄型DNAを、Micro Bio-Spinカラム(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて製造者が推奨する条件に従って脱塩し、そしてそれを用いて、次の回のセレクション用のプールRNAの転写をプログラムした。転写されたプールを、毎回、10%ポリアクリルアミドゲル上でゲル精製した。

10

## 【0294】

タンパク質結合解析。セレクションの進行は、実施例1Aにおいて先に記載したサンドイッチフィルター結合アッセイを用いてモニターした。5'-<sup>32</sup>P標識プールRNA(極低濃度)を、h-IL-23、1 $\times$ PBS+0.1mg/mLのtRNA、0.1mg/mLのssDNAおよび0.1mg/mLのBSAとともに室温にて30分間インキュベートし、次いで、ドットプロット装置(Schleicher and Schuell, Keene, NH)におけるニトロセルロースフィルターとナイロンフィルターとのサンドイッチに適用した。h-IL-23による7点スクリーニング(0.25nM、0.5nM、1nM、4nM、16nM、64nMおよび128nM)を用いて、第6、7および8回の後にニトロセルロースに結合したプールRNAのパーセンテージを計算した。プールK<sub>D</sub>測定値を先に記載したように計算した。

20

## 【0295】

セレクションを6回行った後に、dRmY h-IL23セレクションを未処理のプールに対してh-IL-23結合性について濃縮した。第8回において、プールK<sub>D</sub>は、約54nM以上であった。第6、7および8回のプールを、TOPO-TAクロニングキット(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いてクロニングし、個別の配列を生成した。表9には、第6、7および8回のプールから生成されたdRmYクロンの配列を列挙している。タンパク質結合解析を各クローンについて行った。1 $\times$ PBS+0.1mg/mLのtRNA、0.1mg/mLのサケ精子DNA、0.1mg/mLのBSA中で、室温にて30分間インキュベートすることにより、結合アッセイを行った。表10には、これらの個別の配列についての結合特性が含まれている。

30

## 【0296】

表9において特徴付けられるdRmYアプタマーの核酸配列を以下に示す。下記の各アプタマーに固有の配列は、配列

40

## 【0297】

## 【化57】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC

(配列番号69)の直後のヌクレオチド23から始まり、3'固定核酸配列

## 【0298】

## 【化58】

GCUGUCGAUCGAUCGAUCGAUG

(配列番号90)に遭遇するまで続く。

50



。 \* \* R & D I L - 2 3 ( キャリアを含まないタンパク質 )

N . B . = 検出可能な結合は無し

( 実施例 1 D : デオキシ / 2 ' O - メチルヌクレオチド含有プールを用いたヒト I L - 2 3 に対するさらなるセクション )

導入 : デオキシ / 2 ' O - メチルヌクレオチドを含んでいるプールを使用し、 h - I L - 2 3 に対するアプタマーを同定するために、 3 つのセクションストラテジーを用いた。これらのセクションでは、 2 ' O - Me C および U ならびにデオキシ A および G を使用した。第 1 のセクションストラテジー ( d R m Y h - I L - 2 3 ) は、 h - I L - 2 3 に対する直接的なセクションであった。第 2 のセクションストラテジー ( d R m Y h - I L - 2 3 / I L - 1 2 n e g ) では、 h - I L - 1 2 をネガティブセクション工程に含めることにより、 h - I L - 2 3 に固有のサブドメインである p 1 9 に結合するアプタマーの濃縮を推進した。第 3 のセクションストラテジー ( d R m Y h - I L - 2 3 - S ) では、ポジティブセクションにおいて長時間の洗浄を含めることによる高ストリンジェンシーを用いることによって、より親和性の高いアプタマーに対して選別するセクションを推進した。3 つすべてのセクションストラテジーにより、 h - I L - 2 3 に対するアプタマーが得られた。いくつかのアプタマーが、 h - I L - 2 3 に特異的であり、そしていくつかが h - I L - 2 3 と h - I L - 1 2 との間の交差反応性を示した。

10

【 0 3 0 3 】

20

d R m Y セクション : d R m Y h - I L - 2 3 セクションの第 1 回は、配列

【 0 3 0 4 】

【 化 5 9 】

5'-GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC-N30-

GGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG-3' (ARC520)

( 配列番号 9 8 ) ( A B I E X P E D I T E <sup>T M</sup> DNA 合成装置を用いて合成し、標準的な方法によって脱塩したもの ) を有する  $3 \times 10^{14}$  分子の 2 ' O - Me C および U ならびにデオキシ A および G で改変された RNA プールを用いて開始した。鑄型 ( 配列番号 9 8 ) 中の N の連なりは、ヌクレオチドの任意の組み合わせであり得、得られるアプタマーに固有の配列領域をもたらす。

30

【 0 3 0 5 】

各回のセクションは、室温で 1 時間、 $100 \mu\text{L}$  の  $1 \times \text{PBS}$  中で N u n c M a x i s o r p 疎水性プレートの表面に  $20 \text{ pmol}$  の h - I L - 2 3 を固定することによって開始した。次いで、上清を除去し、ウェルを  $120 \mu\text{L}$  の洗浄緩衝液 (  $1 \times \text{PBS}$ 、 $0.1 \text{ mg/mL}$  の tRNA および  $0.1 \text{ mg/mL}$  のサケ精子 DNA ( 「 s s DNA 」 ) ) で 5 回洗浄した。第 1 回では、 $500 \text{ pmol}$  のプール RNA (  $3 \times 10^{14}$  分子 ) を、タンパク質標的が固定されたウェル内の  $100 \mu\text{L}$  の結合緩衝液 (  $1 \times \text{PBS}$ 、 $0.1 \text{ mg/mL}$  の tRNA および  $0.1 \text{ mg/mL}$  の s s DNA ) 中で 1 時間インキュベートした。次いで、上清を除去し、ウェルを  $120 \mu\text{L}$  の洗浄緩衝液で 5 回洗浄した。その後の回では、ネガティブセクション工程を含め、その工程では、ポジティブセクション工程の前に、プール RNA を空のウェル中で室温にて 1 時間インキュベートすることにより、任意のプラスチック結合配列をプールから除去した。

40

【 0 3 0 6 】

第 3 回の開始時に、第 2 のネガティブセクション工程を加えた。ポジティブセクション工程の前に、標的が固定されたウェルにおいて、上記プールを  $100 \mu\text{L}$  のブロッキング緩衝液 (  $1 \times \text{PBS}$ 、 $0.1 \text{ mg/mL}$  の tRNA、 $0.1 \text{ mg/mL}$  の s s DNA および  $0.1 \text{ mg/mL}$  の BSA ) を用いて室温にて 1 時間ブロッキングする、1 時間のインキュベートに供した ( 表 1 1 A )。第 3 回において、d R m Y h - I L - 2 3 プールを、 $20 \text{ pmol}$  の h - I L - 1 2 で室温にて 1 時間ブロッキングされ、そして  $120$

50

$\mu$ Lの洗浄緩衝液で5回洗浄されたウェルにおいて室温でさらに1時間ネガティブインキュベーション工程に供すること(ポジティブh-IL-23ポジティブインキュベーションの前に行った)によって、そのプールをdRmY h-IL-23/IL-12negセクションに分割した。ストリンジェンシーを高めるために、そのプールをその後の回においてさらにh-IL-12でブロックされたウェルに分割した(表11Bを参照のこと)。

【0307】

h-IL-23とh-IL-12との結合性の識別を高めるためのさらなる方法は、h-IL-12をプールとともに低濃度でポジティブセクションに加えることであり、ここで、特異的h-IL-23結合物は、固定されたh-IL-23に結合し、そのh-IL-12結合物をインキュベーションの1時間後に洗浄する。ポジティブセクションに「ストリンジェントな洗浄」を加えることにより、dRmY h-IL-23-Sセクションを第6回のdRmY h-IL-23プールから分離し、h-IL-23とのインキュベーションの1時間後に、プールを除去し、次いで、100 $\mu$ Lの1xPBS、0.1mg/mLのtRNAおよび0.1mg/mLのssDNAを加え、30分間インキュベートした(表11C)。親和性の高い分子を選別する意図で、このストリンジェントな洗浄工程を、除いたり繰り返したりした。

10

【0308】

すべての場合において、RTミックス(3'プライマー、

【0309】

20

【化60】

5'-CATCGATGATCGATCGATCGAC-3'

(配列番号100)およびThermoscript<sup>TM</sup> RT(Invitrogen, Carlsbad, CA)を加えた後に65 $^{\circ}$ で1時間インキュベートすることによって、固定されたh-IL-23に結合しているプールRNAをセクションプレート中で直接、逆転写した。得られたcDNAを、PCR(20mM Tris pH8.4、50mM KCl、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 $\mu$ Mの5'プライマー

【0310】

【化61】

30

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGAGAACGTTCTAC-3'

(配列番号99)、0.5 $\mu$ Mの3'プライマー(配列番号100)、0.5mM各dNTP、0.05単位/ $\mu$ LのTaqポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA)の鑄型として使用した。PCR反応を以下のサイクル条件下で行った:a):94 $^{\circ}$  30秒;b)55 $^{\circ}$  30秒;c)72 $^{\circ}$  30秒。サイクルは、十分なPCR産物が生成されるまで繰り返した。十分なPCR産物を生成するのに必要なサイクルの最小数を以下の表11A~11Cに「PCR閾値」として報告する。

【0311】

QIAquick PCR精製キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いてPCR鑄型を精製し、そしてそれを用いて、次の回のセクションのためのプールRNAの転写をプログラムした。200mM Hepes、40mM DTT、2mMスペルミジン、0.01% Triton X-100、10%PEG-8000、9.6mM MgCl<sub>2</sub>、2.9mM MnCl<sub>2</sub>、2mM NTP、2mM GMP、2mMスペルミン、0.01単位/ $\mu$ Lの無機ピロホスファターゼおよび2 $\mu$ g/mLのY639F単変異T7ポリメラーゼを用いて37 $^{\circ}$ で一晩、鑄型を転写した。転写反応を50mM EDTAでクエンチし、エタノール沈殿し、次いで、1.5mm変性ポリアクリルアミドゲル(8M尿素、10%アクリルアミド;19:1のアクリルアミド:ビスアクリルアミド)上で精製した。プールRNAを、37 $^{\circ}$ で300mM NaOAc、20mM EDTA中に受動的溶出(passive elution)することによって、ゲルから取

40

50

り出した後、エタノール沈殿を行った。各回についてのセレクション条件を以下の表に示す。

表 1 1 A : d R m Y h I L - 2 3 セレクション条件

【 0 3 1 2 】

【 表 1 1 - A 】

IL-23

| 回 # | RNA プール濃度 (μM) | IL-23 濃度 (μM) | 未処置ウェルneg | BSAでブロックされたウェルneg | PCR 閾値 |
|-----|----------------|---------------|-----------|-------------------|--------|
| 1   | 5              | 0.2           | なし        | なし                | 18     |
| 2   | 0.6            | 0.2           | 1hr       | なし                | 17     |
| 3   | 0.75           | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 17     |
| 4   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 17     |
| 5   | 0.75           | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 17     |
| 6   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 15     |
| 7   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 15     |
| 8   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 16     |

10

20

表 1 1 B : d R m Y I L - 2 3 / I L - 1 2 n e g セレクション条件

【 0 3 1 3 】

【 表 1 1 - B 】

IL-23/12neg

| 回 # | RNA プール濃度 (μM) | IL-23 濃度 (μM) | 未処置ウェルneg | BSAでブロックされたウェルneg | IL-12 neg 濃度 (μM) | # IL-12 ウェル | IL-12 pos 濃度 (μM) | PCR 閾値 |
|-----|----------------|---------------|-----------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|--------|
| 1   | 5              | 0.2           | なし        | なし                | 0                 | 0           | 0                 | 18     |
| 2   | 0.6            | 0.2           | 1hr       | なし                | 0                 | 0           | 0                 | 17     |
| 3   | 0.75           | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 1           | 0                 | 17     |
| 4   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 1           | 0                 | 17     |
| 5   | 0.75           | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 2           | 0                 | 17     |
| 6   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 2           | 0                 | 15     |
| 7   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 3           | 0.02              | 15     |
| 8   | 1              | 0.2           | 1hr       | 1hr               | 0.2               | 3           | 0.05              | 15     |

30

表 1 1 C : d R m Y h I L - 2 3 - S セレクション条件

【 0 3 1 4 】

40

【表 1 1 - C】

## IL-23S

| 回 # | RNA プール濃度 (μM) | IL-23 濃度 (μM) | 未処置ウェル neg | BSAでブロッッキングされたウェル neg | 30分間のポジティブ洗浄の回数 | PCR 閾値 |
|-----|----------------|---------------|------------|-----------------------|-----------------|--------|
| 1   | 5              | 0.2           | なし         | なし                    | 0               | 18     |
| 2   | 0.6            | 0.2           | 1hr        | なし                    | 0               | 17     |
| 3   | 0.75           | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 0               | 17     |
| 4   | 1              | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 0               | 17     |
| 5   | 0.75           | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 0               | 17     |
| 6   | 1              | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 2               | 15     |
| 7   | 1              | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 2               | 16     |
| 8   | 1              | 0.2           | 1hr        | 1hr                   | 2               | 16     |

10

タンパク質結合解析：実施例 1 A において先に記載したようにプールのタンパク質結合親和性をモニターするために、全セレクションにわたってドットプロットアッセイを行った。h - IL - 23 非存在下の RNA の結合に対する h - IL - 23 存在下の RNA の結合の比が、著しい正の比であるとき、そのプールを、TOPO TA クローニングキット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を製造者の指示書に従って用いてクローニングした。3 つすべてのセレクションにおいて 6 回行ったプールから類似の配列が見出され、そして 3 つのセレクションの間に 45 個の固有クローンをスクリーニング用を選択した。その 45 個のクローンを、ABI EXPEDITE™ DNA 合成装置において合成し、次いで、標準的な方法によって脱塩した。その 45 個の個別のクローンを 10% PAGE ゲル上でゲル精製し、そしてその RNA を 300 mM NaOAc および 20 mM EDTA 中に受動的に溶出した後、エタノール沈殿を行った。

20

## 【0315】

それらのクローンを  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP で 5' 末端標識し、そして 3 点ドットプロットスクリーニング (0 nM、20 nM および 100 nM の h - IL - 23 ; 0 nM、20 nM および 100 nM の h - IL - 12) において IL - 23 と IL - 12 の両方の結合性についてアッセイした (データ示さず)。IL - 23 と IL - 12 の両方について 20 nM および 100 nM のタンパク質条件での有意な結合性を示すクローンを、先に記載したドットプロットアッセイにおいて 0 nM ~ 480 nM (3 倍希釈) のタンパク質力価測定を用いて  $K_D$  決定のためにさらにアッセイした。 $K_D$  値は、1 : 1 の RNA : タンパク質複合体を示す方程式 (結合したアプタマーの割合 = 振幅 \* ([IL - 23] / (K<sub>D</sub> + [IL - 23])) + バックグラウンド結合) (Kaleida Graph v. 3.51, Synergy Software) に得られたデータを当てはめることによって決定した。親和性がより高いクローンのタンパク質結合特性の結果を表 1 3 に作表し、対応するクローン配列を表 1 2 に列挙する。

30

40

## 【0316】

表 1 2 において特徴付けられる d R m Y アプタマーの核酸配列を以下に示す。以下の各アプタマーに固有の配列は、配列

## 【0317】

## 【化 6 2】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUAC

(配列番号 101) の直後のヌクレオチド 23 から始まり、3' 固定核酸配列

## 【0318】

50

## 【化 6 3】

GUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

(配列番号 102) に遭遇するまで続く。

## 【0319】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5' から 3' の方向で示されており、d R m Y S E L E X <sup>T M</sup> 条件下で選別された I L - 23 および / または I L - 12 に結合するアプタマーの配列を示し、ここで、プリン (A および G) はデオキシであり、ピリミジン (C および U) は 2' - O M e である。表 12 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール (「PAG」) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング (例えば、3' - 逆位 d T) を含んでいても含んでいなくてもよい。

10

表 12 : d R m Y クローン配列

## 【0320】

## 【表 12 - 1】

配列番号 103 (ARC611)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGGCAAUUGGGGAGUGUGGGUGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

配列番号 104 (ARC612)

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

20

## 【0321】

【表 1 2 - 2】

- 配列番号 105 (ARC614)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAGGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 106 (ARC616)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACGAUAUAGGCGGUACGGGGGAGUGGGCUGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 107 (ARC620)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGAAAGGCGCUUGCGGGGGUGAGGGAGGGGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 108 (ARC621) 10  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 109 (ARC626)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 110 (ARC627)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGUGUCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 111 (ARC628)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCAAGUAAUUGGGGAGCGUGGGUGGGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 112 (ARC632) 20  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAAUUGCAGGUGGUGCCGGGGGUUGGGGGCGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 113 (ARC635)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCUCAAAAAGAGGGGGGAUGUGGGAGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 114 (ARC642)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCGCAGCCAGCGGGGAGUGAGGGUGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 115 (ARC643)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGCCGAUGAGGGGAGCAGUGGGUGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 116 (ARC644) 30  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACUAGUGAGGCGGUAAACGGGGGUGAGGGUGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 117 (ARC645)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACAGGUAGGCAAGAUUUGGGGAAGCGGGUGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG
- 配列番号 118 (ARC 646)  
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACACAUGGCUCGAAAGAGGGGGGUGAGGGUGGGGGUCCGAUCGAUCGAUCAUCGAUG

表 1 3 : d R m Y クロンの結合性のまとめ

【 0 3 2 2 】

【表 1 3 - 1】

| 配列 | ARC # | セレクション | K <sub>D</sub> hIL- | K <sub>D</sub> hIL- |
|----|-------|--------|---------------------|---------------------|
|----|-------|--------|---------------------|---------------------|

40

【 0 3 2 3 】

【表 1 3 - 2】

| 番号  |        |                 | 23 (nM) | 12 (nM) |
|-----|--------|-----------------|---------|---------|
| 103 | ARC611 | R7 hIL-23/12neg | 21.3    | 123.1   |
| 104 | ARC612 | R7 hIL-23/12neg | 5.8     | 41.7    |
| 105 | ARC614 | R7 hIL-23/12neg | 3.1     | 54.4    |
| 106 | ARC616 | R7 hIL-23/12neg | 13.1    | 52.1    |
| 107 | ARC620 | R7 hIL-23/12neg | 44.8    | 178.7   |
| 108 | ARC621 | R7 hIL-23/12neg | 28.8    | 111.9   |
| 109 | ARC626 | R7 hIL-23S      | 10.1    | 69.8    |
| 110 | ARC627 | R7 hIL-23S      | 7       | 79.5    |
| 111 | ARC628 | R7 hIL-23S      | 57.8    | 146.5   |
| 112 | ARC632 | R7 hIL-23S      | 19.1    | 63.9    |
| 113 | ARC635 | R7 hIL-23S      | 171.5   | 430.9   |
| 114 | ARC642 | R7 hIL-23       | 37.2    | 188.3   |
| 115 | ARC643 | R7 hIL-23S      | 71.6    | 309.4   |
| 116 | ARC644 | R7 hIL-23       | 34.5    | 192.9   |
| 117 | ARC645 | R7 hIL-23       | 33.5    | 137.3   |
| 118 | ARC646 | R7 hIL-23       | 207.9   | 382.6   |

10

20

30

40

50

\* ドットプロットアッセイにおいて  $K_D$  を決定するための室温、30分間のインキュベーション

\*  $1 \times \text{PBS} + 0.1 \text{ mg/mL}$  の tRNA、サケ精子DNA、BSA 反応緩衝液  
(ヒトIL-23 アプタマーセレクションのまとめ)

IL-23 SELEX<sup>TM</sup> に対する様々なセレクションの条件およびストラテジーにより、様々な結合特性を有し、安定化され、そして/または最小化されたいくつかのアプタマーが得られた。rRfYセレクションアプタマーは、およそ15 nMから460 nMの範囲の親和性を有し、任意のSELEX<sup>TM</sup> 後の最適化の前に、およそ50 nMから5  $\mu\text{M}$  の範囲の  $IC_{50}$  の細胞性効力 (cellular potency) を有する。これらは、結合特性の適切な増大によってさらに最小化され得、そして細胞ベースアッセイにおいて高い効力を示すと予想される。これらのアプタマーはまた、最も顕著にIL-23を識別し、IL-12よりもIL-23を100倍超識別する。

#### 【0324】

rRmYセレクション条件下で得られたアプタマーは、約8 nM ~ 3  $\mu\text{M}$  の範囲の親和性を有する。しかしながら、それらの細胞性効力は、rRfYアプタマーの効力よりも低い。rGmH構築物に関しては、1点スクリーニングを行ったが、バックグラウンドに対するそれらの結合の程度が、rRmYクローンほど良好でないもので、いかなるそれ以上のものは行わなかった。48個の粗rGmHクローン転写物を1:200希釈で使用し、また、0.1 mg/mLのtRNAを競合物として使用した。バックグラウンドに対する平均結合性は、たった約14%であったのに対し、同じアッセイにおけるrRmYクロンの平均は、約30%であり、10クローンが、40%超であった。

#### 【0325】

dRmYセレクションアプタマーは、約3 nM ~ 約200 nMの範囲の高親和性を有し、そしてSELEX<sup>TM</sup> 後の任意の最適化の前に、約50 nM ~ 約500 nMの範囲の  $IC_{50}$  という顕著な細胞性効力を示す(下記の実施例3に記載する)。これらのアプタマーのうちいくつかはまた、IL-12よりもIL-23に対して約4倍の識別性を有し、それは、さらなる最適化によって改善され得る。

#### 【0326】

(実施例 1 E : 2' - F ピリミジン含有プール ( r R f Y ) を用いたマウス ( 「 m 」 )  
- I L - 2 3 に対するセレクション)

導入 : 2' - O H プリンおよび 2' - F ピリミジンヌクレオチド ( r R f Y 組成物 ) からなるプールを使用して m I L - 2 3 に対するアプタマーを同定するために、2つのセレクションストラテジーを用いた。第 1 のセレクションストラテジー ( m I L - 2 3 ) は、m I L - 2 3 に対する直接的なセレクションであった。第 2 のセレクションストラテジー ( m I L - 2 3 S ) は、よりストリンジентなセレクションであり、ここで、より親和性の高い結合物に向けたセレクションを推進する目的で、その初期の回での R N A およびタンパク質の濃度はより低いものであった。

両方のセレクションストラテジーにより、m I L - 2 3 に対するアプタマーが得られた。

【 0 3 2 7 】

セレクション : 2つのセレクション ( m I L - 2 3 および m I L - 2 3 S ) は、<sup>3 2</sup> P A T P 5' 末端標識プールのスパイクを含む、配列

【 0 3 2 8 】

【 化 6 4 】

5' GGAGCGCACUCAGCCAC-N40-UUUCGACCUCUCUGCUAGC 3' (ARC275)

(配列番号 1 1 9 ) を含む 2' F ピリミジン改変プールの  $2 \times 10^{14}$  分子とマウス I L - 2 3 ( 研究室で単離されたもの ) とのインキュベーションを開始した。鑄型 ( 配列番号 1 1 9 ) 中の N の連なりは、ヌクレオチドの任意の組み合わせであり得、得られるアプタマーに固有の配列領域をもたらす。

【 0 3 2 9 】

m I L - 2 3 セレクションの第 1 回において、プール R N A を最終容積 1 0 0  $\mu$  L 中の 5 0 p m o l のタンパク質とともに室温で 1 時間インキュベートした。m I L - 2 3 S セレクションの第 1 回では、プール R N A を最終容積 1 3 0 0  $\mu$  L 中の 6 5 p m o l の m I L - 2 3 とともに室温で 1 時間インキュベートした。セレクションは、1 x P B S 緩衝液中で行った。R N A : m I L - 2 3 複合体および遊離 R N A 分子を、S c h l e i c h e r & S c h u e l l ( K e e n e , N H ) 製の 0 . 4 5  $\mu$  m ニトロセルローススピンカラムを用いて分離した。そのカラムを、1 m L の 1 x P B S で予め洗浄し、次いで、R N A : タンパク質含有溶液をそのカラムに加え、2 0 0 0 r p m で 1 分間遠心した。緩衝液での洗浄は、非特異的結合物をフィルターから除去するために行い ( 第 1 回、2 x 5 0 0  $\mu$  L の 1 x P B S ; その後の回では、特異的な結合物を濃縮するために回数と容積を増やして、よりストリンジентな洗浄 )、次いで、溶出緩衝液 ( 7 M 尿素、1 0 0 m M 酢酸ナトリウム、3 m M E D T A、9 0 に予め加熱しておいたもの ) の 2 x 2 0 0  $\mu$  L の洗浄 ( 後の回では 2 x 1 0 0  $\mu$  L の洗浄 ) により、フィルターに付着している R N A : タンパク質複合体を溶出した。その溶出された R N A を沈殿させた ( 4 0  $\mu$  g のグリコーゲン、1 容積のイソプロパノール )。その R N A を、3' プライマー

【 0 3 3 0 】

【 化 6 5 】

5' GCTAGCAGAGAGGTCGAAA 3'

( 配列番号 1 2 1 ) を使用する T h e r m o s c r i p t <sup>T M</sup> R T - P C R システム ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) を用いて製造者の指示書に従って逆転写した後、P C R 増幅 ( 2 0 m M T r i s p H 8 . 4、5 0 m M K C l、2 m M M g C l <sub>2</sub>、0 . 5  $\mu$  M の 5' プライマー

【 0 3 3 1 】

【 化 6 6 】

5' TAATACGACTCACTATAGGAGCGCACTCAGCCAC 3'

( 配列番号 1 2 0 )、0 . 5  $\mu$  M の 3' プライマー ( 配列番号 1 2 1 )、0 . 5 m M 各

10

20

30

40

50

dNTP、0.05単位/μLのTaqポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MA))を行った。PCR反応を以下のサイクル条件下で行った：a) 94 30秒；b) 60 30秒；c) 72 30秒。サイクルは、十分なPCR産物が精製されるまで繰り返した。十分なPCR産物を生成するのに必要なサイクルの最小数を表14に「PCR閾値」として報告する。

【0332】

PCR鑄型を、QIAquick PCR精製キット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて精製した。鑄型を、<sup>32</sup>P-GTP本体標識を用いて37で一晚転写した(4%PEG-8000、40mM Tris pH8.0、12mM MgCl<sub>2</sub>、1mMスペルミジン、0.002% Triton X-100、3mM 2'-OHプリン、3mM 2'-Fピリミジン、25mM DTT、0.25単位/100μLの無機ピロホスファターゼ、2μg/mL T7 Y639F単変異RNAポリメラーゼ、5 uCi <sup>32</sup>P-GTP)。

10

【0333】

第1回と同じであるがネガティブセレクション工程を加えた方法を用いて、その次の回を繰り返した。タンパク質標的とのインキュベーションの前に、プールRNAを0.45ミクロンのニトロセルロースフィルターカラムに通すことによって、フィルター結合配列を除去し、次いで、その濾液をポジティブセレクション工程において用いた。交互回において、プールRNAをゲル精製した。転写反応を50mM EDTAでクエンチし、エタノール沈殿し、次いで、1.5mm変性ポリアクリルアミドゲル(8M尿素、10%アクリルアミド；19：1のアクリルアミド：ビスアクリルアミド)上で精製した。プールRNAを、300mM NaOAc、20mM EDTA中に受動的に溶出することによってゲルから取り出した後、300mM酢酸ナトリウムおよび2.5容積のエタノールを加えてエタノール沈殿した。

20

【0334】

RNAは、全セレクションにわたってタンパク質過剰のままであった(約1μM RNA)。特定のセレクションに基づいて、タンパク質濃度を様々な低さの濃度に低下させた。セレクションに依存して、第2または3回の開始時に競合tRNAを0.1mg/mLで結合反応物に加えた。結合アッセイを選択した回において行い、合計7回を完了した。表14には、セレクションの詳細(各回に用いたプールRNA濃度、タンパク質濃度およびtRNA濃度を含む)が含まれている。結合アッセイとともに溶出値(フィルターカラムに通した全RNAのCPM値に対する、タンパク質結合RNAのCPM値の比)を用いてセレクションの進行をモニターした。

30

表14：rRfY mIL-23セレクション条件：

【0335】

【表 1 4 - 1】

## 1. rRfY mL-23

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu$ M) | タンパク<br>質濃度<br>(nM) | neg   | tRNA<br>(mg/mL) | %溶出  | PCR<br>閾値 |
|--------|--------------------------------|---------------------|-------|-----------------|------|-----------|
| 1      | 3.3                            | 500                 | なし    | 0               | 2.64 | 8         |
| 2      | 1                              | 500                 | フィルター | 0.1             | 4.24 | 8         |
| 3      | ~1                             | 200                 | フィルター | 0.1             | 0.73 | 10        |
| 4      | 1                              | 200                 | フィルター | 0.1             | 3.71 | 8         |
| 5      | ~1                             | 100                 | フィルター | 0.1             | 0.41 | 10        |
| 6      | 1                              | 100                 | フィルター | 0.1             | 9.27 | 8         |
| 7      | ~1                             | 100                 | フィルター | 0.1             | 0.87 | 9         |

10

## 2. rRfY mL-23S (ストリンジェント)

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu$ M) | タンパク質<br>濃度<br>(nM) | neg   | tRNA<br>(mg/mL) | %溶出  | PCR<br>閾値 |
|--------|--------------------------------|---------------------|-------|-----------------|------|-----------|
| 1      | 0.25                           | 50                  | なし    | 0               | 2.79 | 8         |
| 2      | 0.1                            | 50                  |       | 0               | 4.14 | 8         |
| 3      | ~1                             | 50                  | フィルター | 0.1             | 0.16 | 11        |
| 4      | 1                              | 50                  | フィルター | 0.1             | 2.57 | 8         |
| 5      | ~1                             | 25                  | フィルター | 0.1             | 0.42 | 10        |

20

【 0 3 3 6 】

30

【表 1 4 - 2】

|   |     |    |       |     |       |    |
|---|-----|----|-------|-----|-------|----|
| 6 | 0.8 | 25 | フィルター | 0.1 | 10.29 | 8  |
| 7 | ~1  | 25 | フィルター | 0.1 | 0.13  | 10 |

r R f Y m I L - 2 3 タンパク質結合解析：先に記載したようにプールのタンパク質結合親和性をモニターするために、全セレクションにわたってドットプロットアッセイを行った。m I L - 2 3 存在下でかなりのレベルのRNAの結合性が観察された場合は、そのプールを、TOPO TA クローニングキット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を製造者の指示書に従って用いてクローニングした。両方のm I L - 2 3 セレクションのために、第7回のプール鑄型をクローニングし、各セレクション由来の16個の個別のクローンを、8点m I L - 2 3 力価測定を用いてアッセイした。スクリーニングした合計32個のクローンのうち7個が、特異的な結合曲線を有し、それらを下記の表16に列挙する。表15には、その対応する配列を列挙する。他のすべてのものが、選別されていない未処理プールに類似した非特異的な結合曲線を示した。引き続き、m I L - 2 3 に対する親和性が高いクローンを、マウス I L - 1 2、ヒト I L - 2 3 およびヒト I L - 1 2 に対するタンパク質結合性について同じ様式でスクリーニングした。

40

【 0 3 3 7 】

表15において特徴付けられる r R f Y アプタマーの核酸配列を以下に示す。以下の各アプタマーに固有の配列は、配列

50

【 0 3 3 8 】

【 化 6 7 】

GGAGCGCACUCAGCCAC

( 配列番号 1 2 2 ) の直後のヌクレオチド 1 8 から始まり、 3 ' 固定核酸配列

【 0 3 3 9 】

【 化 6 8 】

UUUCGACCUCUCUGCUAGC

( 配列番号 1 2 3 ) に遭遇するまで続く。

10

【 0 3 4 0 】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5' から 3' の方向で示されており、r R f Y S E L E X<sup>T M</sup> 条件下で選別されたマウス I L - 2 3 に結合する配列を示し、ここで、プリン ( A および G ) は 2' - O H であり、ピリミジン ( U および C ) は 2' - フルオロである。表 1 5 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング ( 例えば、3' - 逆位 d T ) を含んでいても含んでいなくてもよい。

表 1 5 : m I L - 2 3 r R f Y クローン配列

【 0 3 4 1 】

【 表 1 5 - 1 】

20

配列番号 124 (ARC1628)

GGAGCGCACUCAGCCACAGGUGGC<sup>U</sup>AAUACUGUAAAGACGUGCGCGCAGAGGGAUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 125 (ARC1629)

GGAGCGCACUCAGCCACCGUAAUUCACAAGGUCCCUGAGUGCAGGGUUGUAUGUUUGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 126 (ARC1630)

GGAGCGCACUCAGCCACUCUACUCGAUUAUAGUUUUCGAGCCGGUGGUAAGAUUAUGAUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 127 (ARC1631)

【 0 3 4 2 】

30

【 表 1 5 - 2 】

GGAGCGCACUCAGCCACGCCUACAAUUCACUGUGAUUAUUCGAAUUAUAGCCUUGGUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 128 (ARC1632)

GGAGCGCACUCAGCCACCGGUAAUUAUCCAUAAGGAACGUUCGUCUCUGAGCAGGCGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 129 (ARC1633)

GGAGCGCACUCAGCCACAGCUCGGUGGC<sup>U</sup>AAUUAUCUAUGUGAACGUGCGCAACAGCUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 130 (ARC1634)

GGAGCGCACUCAGCCACCUUGGC<sup>U</sup>AAUUAUACCUAUCGGAUUGUGGCCUAGCACGGAUUUCGACCUCUCUGCUAGC

40

表 1 6 : m I L - 2 3 r R f Y クローンの結合活性

【 0 3 4 3 】

【表 16】

| 配列番号 | クローン名   | セレクション     | K <sub>D</sub> mIL-23<br>(nM) | K <sub>D</sub> mIL-12<br>(nM) | K <sub>D</sub> hIL-23<br>(nM) | K <sub>D</sub> hIL-12<br>(nM) |
|------|---------|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 124  | ARC1628 | R7 mIL-23  | 2                             | 6                             | 52                            | 161                           |
| 125  | ARC1629 | R7 mIL-23  | 34                            | 103                           | 31                            | 75                            |
| 126  | ARC1630 | R7 mIL-23S | 14                            | 18                            | 65                            | 239                           |
| 127  | ARC1631 | R7 mIL-23S | 33                            | 72                            | 39                            | 69                            |
| 128  | ARC1632 | R7 mIL-23S | 13                            | 16                            | 91                            | 186                           |
| 129  | ARC1633 | R7 mIL-23S | 17                            | 44                            | 79                            | 195                           |
| 130  | ARC1634 | R7 mIL-23S | 3                             | 29                            | 39                            | 63                            |

10

\* K<sub>D</sub> 測定のための室温、30分間のインキュベーション

\* 1 × P B S + 0.1 mg / mL の B S A 反応緩衝液

(実施例 1 F : マウス I L - 1 2 に対して特異性を有するマウス I L - 2 3 アプタマーのセレクション)

導入。マウス I L - 1 2 ( m I L - 1 2 ) に対する特異性を有する、マウス I L - 2 3 ( m I L - 2 3 ) に対するアプタマーを同定するために、1つのセレクションを行った。このセレクションは、第3回で開始する上節に記載した r R f Y セレクション m I L - 2 3 S から分離したものであった。このセレクションにより、m I L - 1 2 よりも約 3 ~ 5 倍の特異性を有する、m I L - 2 3 に対するアプタマーが得られた。

m I L - 2 3 S / m I L - 1 2 n e g r R f Y セレクション。

マウス I L - 1 2 に対する特異性を有するマウス I L - 2 3 アプタマーを得るために、実施例 1 A において上で記載したネガティブ ( P N - I L - 2 3 ) セレクションにおけるタンパク質と同様に、マウス I L - 1 2 をネガティブセレクションに含めた。上の実施例 1 E において記載した m I L - 2 3 S セレクションの第2回から得られた RNA を用いて、R 3 P N m I L - 2 3 / 1 2 n e g セレクションを開始し、ここで、m I L - 1 2 をセレクションのネガティブ工程に含めた。結合アッセイを選択した回において行い、セレクションを9回行った。セレクション条件 ( 各回に使用したプール RNA 濃度、タンパク質濃度および t R N A 濃度を含む ) を表 1 7 にまとめた。結合アッセイとともに溶出値 ( フィルターカラムに通した全 RNA の C P M 値に対する、タンパク質結合 RNA の C P M 値の比 ) を用いてセレクションの進行をモニターした。

表 1 7 : r R f Y m I L - 2 3 S / m I L - 1 2 n e g フィルターセレクションのまとめ

【 0 3 4 4 】

20

30

【表 17】

| 回<br># | RNA<br>プール<br>濃度<br>( $\mu\text{M}$ ) | タンパク<br>質濃度<br>(nM) | neg        | tRNA<br>(mg/mL) | neg<br>mIL12<br>濃度<br>(nM) | %溶出  | PCR<br>サイク<br>ル# |
|--------|---------------------------------------|---------------------|------------|-----------------|----------------------------|------|------------------|
| 1      | 0.25                                  | 50                  | なし         | 0               | 0                          | 2.79 | 8                |
| 2      | 0.1                                   | 50                  |            | 0               | 0                          | 4.14 | 8                |
| 3      | ~1                                    | 500                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 250                        | 1.33 | 10               |
| 4      | 1                                     | 500                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 500                        | 1.68 | 8                |
| 5      | 1                                     | 250                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 250                        | 0.89 | 9                |
| 6      | 1                                     | 200                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 200                        | 1.47 | 8                |
| 7      | 1                                     | 150                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 150                        | 1.39 | 8                |
| 8      | 1                                     | 150                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 150                        | 3.73 | 8                |
| 9      | 1                                     | 150                 | フィルター/IL12 | 0.1             | 150                        | 2.98 | 8                |

10

セレクション緩衝液：1 × P B S

\* 1時間のポジティブインキュベーション

r R f Y m I L - 2 3 S / m I L - 1 2 n e g タンパク質結合解析。プールのタンパク質結合親和性をモニターするために、先に記載したドットプロット結合アッセイを全セレクションにわたって行った。微量の  $^{32}\text{P}$  標識 RNA を m I L - 2 3 または m I L - 1 2 と混合し、室温で 30 分間、1 × P B S + 0 . 1 m g / m L の B S A 中、最終容積 30  $\mu\text{L}$  でインキュベートした。その反応物をドットプロット装置 ( S c h l e i c h e r a n d S c h u e l l M i n i f o l d - 1 D o t B l o t , A c r y l i c ) に添加した。前節に記載したように結合曲線を作成した。m I L - 2 3 存在下でかなりのレベルの RNA の結合性が観察された場合は、そのプールを、T O P O T A クローニングキット ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) を製造者の指示書に従って用いてクローニングした。第 9 回のプール鑄型をクローニングし、そしてセレクション由来の 10 個の個別のクローンを m I L - 2 3 に対する 8 点ドットプロット力価測定においてアッセイした。次いで、著しく m I L - 2 3 に結合しているクローンを、m I L - 1 2 への結合性についてスクリーニングした。結合クローンのタンパク質結合特性を表 1 8 にまとめた。スクリーニングした合計 10 個のうち 4 つのクローンが、様々な親和性で m I L - 2 3 および m I L - 1 2 に特異的に結合した。他のすべてのクローンは、選別されていない未処理プールに類似した非特異的結合曲線を示した。4 つの結合クローンについての配列を以下の表 1 9 に列挙する。

20

30

表 1 8 : r R f Y m I L - 2 3 S / m I L - 1 2 n e g クローン結合活性

【 0 3 4 5 】

【表 1 8】

| 配列番号 | クローン名     | $K_D$ mIL-23<br>(nM) | $K_D$ mIL-12<br>(nM) |
|------|-----------|----------------------|----------------------|
| 131  | AMX369.F1 | 63                   | 165                  |
| 132  | AMX369.H1 | 23                   | 194                  |
| 133  | AMX369.B2 | 49                   | 252                  |
| 134  | AMX369.G3 | 106                  | 261                  |

40

\*  $K_D$  測定のための室温、30分間のインキュベーション

\* 1 × P B S + 0 . 1 m g / m L の B S A 反応緩衝液

表 1 9 において特徴付けられる r R f Y アプタマーの核酸配列を以下に示す。下記の各

50

アプタマーに固有の配列は、配列

【 0 3 4 6 】

【 化 6 9 】

GGAGCGCACUCAGCCAC

( 配列番号 1 2 2 ) の直後のヌクレオチド 1 8 から開始し、3' 固定核酸配列

【 0 3 4 7 】

【 化 7 0 】

UUUCGACCUCUCUGCUAGC

10

( 配列番号 1 2 3 ) に遭遇するまで続く。

【 0 3 4 8 】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5' から 3' の方向で示されており、r R f Y S E L E X T M 条件下で選別されたマウス I L - 2 3 に結合する配列を示し、ここで、プリン ( A および G ) は 2' - O H であり、ピリミジン ( U および C ) は 2' - フルオロである。表 1 9 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング ( 例えば、3' - 逆位 d T ) を含んでいても含んでいなくてもよい。

表 1 9 : r R f Y m I L - 2 3 S / m I L - 1 2 n e g 配列情報

【 0 3 4 9 】

20

【 表 1 9 】

配列番号 131 (AMX(369)\_F1)

GGAGCGCACUCAGCCACGGUUUACUUCGCGGCAAAUUGACCUCNCUCUAGACAGGUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 132 (AMX(369)\_H1) (ARC 1914)

GGAGCGCACUCAGCCACCCUGGGAAAUCUGGGUCCUGAGUUCUAACAGCAGAGAUUUUUCGACCUCUCUGCUAGC

配列番号 133 (AMX(369)\_B2)

GGAGCGCACUCNGCCACUUCGGAAUAUCGUUCUCUGGGUGAGCAUGCGUUGAGGUUUCNACCUCUCUGCUAGC

配列番号 134 (AMX(369)\_G3)

GGAGCGCACUCAGCCACUGGGAAACAUCUCAUGUCUCUGACCCUCUUGCAGUAGAAUUUNGACCUCUCUGCUAGC

30

( 実施例 2 : 組成物および配列の最適化ならびに配列決定 )

( 実施例 2 A : 最小化 )

セレクションが成功した後およびアプタマー配列を決定した後、インビトロにおける機能性の測定に加えて、その意図された標的に対する結合特異性を保持しているが、結合特性が改善された ( 例えば、 $K_D$  および / または  $IC_{50}$  が改善された ) 一層短いオリゴヌクレオチド配列を得るために、それらの配列を最小化した。

【 0 3 5 0 】

( 実施例 2 A . 1 : r R f Y クローンの最小化 : )

実施例 1 A に記載した r R f Y セレクション由来の結合親クローンを、タイプ 1 およびタイプ 2 と呼ばれる 2 つの主要なアプタマーのファミリーに分類した。図 8 A および 8 B に、タイプ 1 およびタイプ 2 アプタマーの配列および予測される二次構造配置の例を示す。図 9 A および 9 B に、タイプ 1 および 2 の最小化されたアプタマー配列および予測される二次構造配置を示す。

40

【 0 3 5 1 】

上の実施例 1 に記載した I L - 2 3 結合解析および下記の実施例 3 に記載する細胞ベースアッセイのデータに基づいて、r R f Y P N - I L - 2 3 セレクション由来のいくつかのタイプ 1 クローン ( A M X 8 4 - A 1 0 ( 配列番号 4 3 ) 、 A M X 8 4 - B 1 0 ( 配列番号 4 4 ) および A M X 8 4 - F 1 1 ( 配列番号 4 6 ) を含む ) を、さらなる特徴付けのために選択した。最小化された D N A 構築物オリゴヌクレオチドを転写し、ゲル精製し、そしてドットプロットアッセイにおいて h - I L - 2 3 への結合性について試験した。

50

## 【0352】

最小化されたクローンの A 1 0 m i n 5 ( 配列番号 1 3 9 )、A 1 0 m i n 6 ( 配列番号 1 4 0 ) は、A M X 8 4 - A 1 0 ( 配列番号 4 3 ) に基づくものであり、最小化されたクローンの B 1 0 m i n 4 ( 配列番号 1 4 4 ) および B 1 0 m i n 5 ( 配列番号 1 4 5 ) は、A M X 8 4 - B 1 0 ( 配列番号 4 4 ) に基づくものであり、そして最小化されたクローン F 1 1 m i n 2 ( 配列番号 1 4 7 ) は、A M X 8 4 - F 1 1 ( 配列番号 4 6 ) に基づくものであった ( 図 9 A )。これらのクローンを、 $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP で 5' 末端標識し、そして親クローンと同じ方法を用いてドットプロットアッセイにおいて K<sub>D</sub> 決定のためにアッセイした。すべてが、著しいタンパク質結合性を有し ( 表 2 1 にまとめ)、そしてその各々は、下記の実施例 3 において記述するような細胞ベースアッセイにおいて試験されるとき、それらが由来するそれぞれの親クローンよりも高い効力を有していた。

10

## 【0353】

さらに、タイプ 1 およびタイプ 2 アプタマーを代表する最小化された構築物を作製し、そしてタイプ 1 およびタイプ 2 アプタマー配列ファミリーのコンセンサス ( c o n c e n s u s ) 配列に基づいて試験した。タイプ 1 . 4 ( 配列番号 1 5 1 ) およびタイプ 1 . 5 ( 配列番号 1 5 2 ) は、タイプ 1 ファミリー配列に基づいてそのような最小化された構築物の 2 つの例であり、それらは、上に記載した他のタイプ 1 最小化物と比較したとき、高い I L - 2 3 結合親和性および実施例 3 に記載する細胞ベースアッセイにおいて最も強い活性を示した。

20

## 【0354】

得られた r R f Y 最小化物の配列を以下の表 2 0 に列挙する。表 2 1 には、表 2 0 に列挙する最小化物についての最小化物の結合性データを示す。

## 【0355】

以下の表 2 0 に記載される最小化 r R f Y アプタマーについて、プリン ( A および G ) は、2' - O H プリンであり、ピリミジン ( C および U ) は、2' - フルオロピリミジンである。他に述べられない限り、個別の配列は、5' から 3' の方向で示される。表 2 0 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング ( 例えば、3' - 逆位 d T ) を含んでいても含んでいなくてもよい。

表 2 0 - P N - I L - 2 3 2' F ( r R f Y ) 最小化物アプタマー配列

30

## 【0356】

## 【表 20 - 1】

配列番号 135 (A10.min1)

GGAGAUCAUACACAAGAAGUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUCUCC

配列番号 136 (A10.min2)

GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

配列番号 137 (A10.min3)

GGAGUUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCCGACTUCC

配列番号 138 (A10.min4)

GGAGUCUGAGUACUCAGCGUCCCGAGAGGGGAUAUGCUCCGCCAGACUCC

10

配列番号 139 (A10.min5)

GGAGCAUACACAAGAAGUUUUUGUGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUAUGCUCC

配列番号 140 (A10.min6)

GGAGUACGCCGAAAGCGCUCUGAGUACUCAGCGUCCGUAAGGGAUACUCC

配列番号 141 (B10.min1)

GGAGCGAAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

配列番号 142 (B10.min2)

GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

20

配列番号 143 (B10.min3)

GGAUCAUACACAAGAAGUGCUUCACGAAAGUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

配列番号 144 (B10.min4)

GGAGCAUACACAAGAAGUGCUUCAUGCGGCAAACUGCAUGACGUCGAAUAGAUAUGCUCC

## 【 0 3 5 7 】

## 【表 2 0 - 2】

|      |                                                           |    |
|------|-----------------------------------------------------------|----|
| 配列番号 | 145 (B10.MIN5)                                            |    |
|      | GGAGUACACAAGAAGUGUCUCCGAAAGGACGUCGAAUAGAUACUCC            |    |
| 配列番号 | 146 (F11.min1)                                            |    |
|      | GGUAAAUCUCAUCGUCCCGUUUGGGGAU                              |    |
| 配列番号 | 147 (F11.min2)                                            |    |
|      | GGACAUACACAAGAUGUGCUUGAGUUAAAUCUCAUCGUCCCCGUUUGGGGAUAUGUC |    |
| 配列番号 | 148 (タイプ 1.1)                                             | 10 |
|      | GGCAUACACGAGAGUGCUGUCGAAAGACUCGGCCGAGAGGCUAUGCC           |    |
| 配列番号 | 149 (タイプ 1.2)                                             |    |
|      | GGCAUACGCGAGAGCGCUGGCGAAAGCCUCGGCCGAGAGGCUAUGCC           |    |
| 配列番号 | 150 (タイプ 1.3)                                             |    |
|      | GGAUACCCGAGAGGGCUGGCGAAAGCCUCGGCGAGAGCUAUCC               |    |
| 配列番号 | 151 (タイプ 1.4)                                             |    |
|      | GGGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACCC           |    |
| 配列番号 | 152 (タイプ 1.5)                                             | 20 |
|      | GGAGUACGCCGAAAGGCGCUUCCGAAAGGACGUCCGUAAGGGAUACUCC         |    |
| 配列番号 | 153 (タイプ 2.1)                                             |    |
|      | GGAAUCAUACCGAGAGGUUUACCCGAAAGGGGACCAUCC                   |    |
| 配列番号 | 154 (D9.1)                                                |    |
|      | GGAAUCAUACACAAGAGUGUUAUACCCCAACCCAGGGGGACCAUCC            |    |
| 配列番号 | 155 (C11.1)                                               |    |
|      | GGAAAGAAUGUCGGAAUCUCUGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCGCCAGA  |    |
| 配列番号 | 156 (C11.2)                                               | 30 |
|      | GGAGGCGCCACGCUGAGUAUAGACGGAAGCUCGCCUCC                    |    |
| 配列番号 | 157 (C10.1)                                               |    |
|      | GGACACAAGAGAGUAUUCAGGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUAUGCGUAGCUCGCC  |    |
| 配列番号 | 158 (C10.2)                                               |    |
|      | GGCGGUCCGCAUUGAUGUCAGUUUUGCGUAGCUCGCC                     |    |

表 2 1 - P N - I L - 2 3 r R f Y 最小化物の結合性データ  
【 0 3 5 8 】

【表 2 1】

| 配列番号 | クローンの説明       | +/-IL-23 20<br>nM | +/-IL-23 100<br>nM | IL-23 K <sub>D</sub><br>(nM) |
|------|---------------|-------------------|--------------------|------------------------------|
| 135  | A10min1       | 2.2               | 3.1                |                              |
| 136  | A10min2       | 4.4               | 6.0                |                              |
| 137  | A10min3       | 0.8               | 1.6                |                              |
| 138  | A10min4       | 0.9               | 0.7                |                              |
| 146  | F11min1       | 0.8               | 0.6                |                              |
| 147  | F11min2       | 7.8               | 16.9               | 65                           |
| 141  | B10min1       | 7.5               | 33.9               |                              |
| 142  | B10min2       | 1.3               | 1.6                |                              |
| 143  | B10min3       | 0.6               | 0.8                |                              |
| 139  | A10min5       | 12.8              | 40.9               | 57.8                         |
| 140  | A10min6       | 13.6              | 41.7               | 48.3                         |
| 144  | B10min4       | 39.4              | 122.1              | 36.4                         |
| 145  | B10min5       | 20.7              | 89.2               | 276.9                        |
| 148  | IL-23 タイプ 1.1 | 1.4               | 0.9                |                              |
| 149  | IL-23 タイプ 1.2 | 0.8               | 0.7                |                              |
| 150  | IL-23 タイプ 1.3 | 0.8               | 0.6                |                              |
| 153  | IL-23 タイプ 2.1 | 1.7               | 5.2                |                              |
| 154  | D9.1          | 1.2               | 3.9                |                              |
| 155  | C11.1         | 1.0               | 3.5                |                              |
| 156  | C11.2         | 1.1               | 2.3                |                              |
| 157  | C10.1         | 1.4               | 4.4                |                              |
| 158  | C10.2         | 1.4               | 1.5                |                              |
| 151  | IL-23 タイプ 1.4 | 2.3               | 11.7               | 185.3                        |
| 152  | IL-23 タイプ 1.5 | 5.2               | 26.9               | 31.4                         |

10

20

30

40

50

\* \* + 0.1 mg / mL の tRNA、室温、30 分間のインキュベーションによりアッセイを行った

\* \* R & D IL - 23 ( キャリアを含まないタンパク質 )

( 実施例 2 A . 2 : d R m Y セレクション 1 の最小化 : )

IL - 23 に結合するアプタマーに対する d R m Y セレクションプロセス ( 上の実施例 1 C に記載 ) およびオリゴヌクレオチド配列の決定の後、結合特性を保持する一層短いオリゴヌクレオチド配列を得るために、それらの配列を体系的に最小化した。上の実施例 1 A に記載した IL - 23 結合解析および下記の実施例 3 に記載する細胞ベースアッセイデータに基づいて、ARC 489 ( 配列番号 91 ) ( 74 マー ) をさらなる特徴付けのために選択した。クローン ARC 489 ( 配列番号 91 ) に基づいた 3 つの最小化された構築物を設計し、作製した。これらのクローンを  $-3^2P$  ATP で 5' 末端標識し、そして親クローンと同じ方法を用いて K<sub>D</sub> 決定のためにドットプロットアッセイにおいて、1 x PBS + 0.1 mg / mL の tRNA、0.1 mg / mL のサケ精子 DNA、0.1 mg / mL の BSA 中、30 分間の室温でのインキュベーションにおいてアッセイした。表 2 2 に、最小化 d R m Y アプタマーについての配列を示す。表 2 3 は、d R m Y 最小化アプタマーについての結合性データを含む。ただ 1 つの最小化クローン ARC 527 ( 配列番号 159 ) だけが、IL - 23 に対する結合性を示した。このクローンを、以下の実施

例 3 に記載する TransAM<sup>TM</sup>STAT3 活性化アッセイにおいて試験し、そのそれぞれの親である ARC489 (配列番号 91) と比較して、アッセイ活性の低下が示された。

【0359】

以下の表 22 に記載される最小化 dRmY アプタマーについて、プリン (A および G) は、デオキシ-プリンであり、ピリミジン (U および C) は、2'-OMe ピリミジンである。他に述べられない限り、個別の配列は、5' から 3' の方向で示されている。表 22 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール (「PAG」) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング (例えば、3'-逆位 dT) を含んでいても含んでいなくてもよい。

表 22 : 最小化 dRmY の配列

【0360】

【表 22】

配列番号 159 (ARC527)  
ACAGCGCCGGUGGGCGGGCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

配列番号 160 (ARC528)  
GCGCCGGUGGGCGGGCACCGGGUGGAUGCGCC

配列番号 161 (ARC529) ACAGCGCCGGUGUUUCAUUGGGUGGAUGCGCUGU

表 23 : dRmY セレクション 1 最小化物の結合特性

【0361】

【表 23】

| 配列番号     | クローン名   | K <sub>D</sub> (nM) |
|----------|---------|---------------------|
| 配列番号 159 | ARC 527 | 12.6                |
| 配列番号 160 | ARC 528 | NB                  |
| 配列番号 161 | ARC 529 | NB                  |

\* R & D IL-23 (キャリアを含まないタンパク質)

N . B . = 検出可能な結合は無し

(実施例 2A.3 : dRmY セレクション 2 の最小化 : )

IL-23 に結合するアプタマーに対する dRmY セレクションプロセス (上の実施例 1D に記載) およびオリゴヌクレオチド配列の決定の後、結合特性を保持する一層短いオリゴヌクレオチド配列を得るために、それらの配列を体系的に最小化した。

【0362】

上の実施例 1D に記載した親 dRmY アプタマー配列の配列解析および目視検査に基づいて、dRmY h-IL-23 結合クローンおよびそれらの最小化構築物の活性化立体配座が、G-四量体 (quartet) 構造 (図 10) にフォールディングすると仮定した。機能的結合配列の解析により、G二量体 (G double) のパターンが、G四量体構造に一致することが明らかになった (表 24)。G四量体ファミリー内の配列を、2つのサブクラス (第 1 ステム中に 3 つの塩基対を含むものおよび 2 個の塩基対を含むもの) に分類した。二重鎖 RNA および DNA に結合するとエチジウムブロマイド蛍光が増大するという様式とほとんど同じ様式で、G-四量体構造に結合すると N-メチルメソボルフィリン IX (NMM) 蛍光が増大することが報告されている (Arthanari ら、Nucleic Acids Research, 26 (16) : 3724 (1996) ; Marathais ら、Nucleic Acids Research, 28 (9) : 1969 (2000) ; Joyce ら、Applied Spectroscopy, 58 (7) : 831 (2004) )。従って、図 11 に示されるように、NMM 蛍光を用いて、ARC979 (配列番号 177) が実際に G-四量体構造をとることを確認した。

10

20

30

40

50

文献のプロトコールに従って、マグネシウムおよびカルシウムを含む Dulbecco's PBS 中に約 1 マイクロモル濃度の NMM および約 2 マイクロモル濃度の アプタマーを含む 100 マイクロリットルの反応物を、SpectraMax Gemini XS 蛍光プレートリーダーを用いて解析した。励起波長 405 nm で、蛍光発光スペクトルを 550 ~ 750 nm において集めた。抗トロンピン DNA アプタマー ARC183 の G-四量体構造 (Macaya ら、Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 3745 (1993)) をこの実験のポジティブコントロールとして用いた。ARC1346 は、G-四量体構造を有すると予測されていない ARC979 (配列番号 177) と類似のサイズおよびヌクレオチド組成のアプタマーであり、この実験のネガティブコントロールとして用いた。図 11 に見られるように、ARC183 および ARC979 (配列番号 177) は、NMM 単独と比較して NMM 蛍光の著しい増加を示しているのに対し、ネガティブコントロールの ARC1346 は、増加を示していない。

10

## 【0363】

最小化された構築物を ABI EXPEDITE™ DNA 合成装置において合成し、次いで、標準的な方法によって脱塩した。最小化されたクローンを 10% PAGE ゲル上でゲル精製し、その RNA を 300 mM NaOAc および 20 mM EDTA 中に受動的に溶出した後、エタノール沈殿を行った。

## 【0364】

それらのクローンを  $^{32}P$  ATP で 5' 末端標識し、そして直接的結合アッセイを用い、 $K_D$  決定のためにドットプロットアッセイにおいてアッセイしたが、ここで、アプタマーは放射標識されており、また、室温での 30 分間のインキュベーションのために 0.1 mg/mL の BSA を含んだ 1x PBS 中の IL-23 の濃度は、様々であったが、そのアプタマーは極低濃度 ( $< 90$  pM) で保持されていた。[IL-23] に対する結合アプタマーの割合を用いて、そのデータを以下の方程式：

20

結合アプタマーの割合 = 振幅 \* ( $[IL-23] / (K_D + [IL-23])$ ) + バックグラウンド結合  
に当てはめることによって  $K_D$  を算出した。

## 【0365】

非放射性アプタマーを力価測定し、微量  $^{32}P$  ATP 標識アプタマーと競合させる競合形式で、dRmY セレクション 2 由来の最小化された構築物のいくつかをアッセイした。競合アッセイにおいて、[IL-23] を一定に保持し、[微量標識アプタマー] を一定に保持し、そして [非標識アプタマー] を変化させた。そのデータを以下の方程式：

30

結合アプタマーの割合 = 振幅 \* ( $[アプタマー] / (K_D + [アプタマー])$ ) + バックグラウンド結合  
に当てはめることによって  $K_D$  を算出した。

## 【0366】

G 四量体に基づいた最小化物は、機能的結合物であったのに対し、ステムループ (RNA structure; D. H. Mathews ら、「Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure」. Journal of Molecular Biology, 288, 911-940, (1999)) を予測するフォールディングアルゴリズムに基づき、かつ G 二量体のパターンを含まなかった最小化物は、機能的でなかった (ARC793 (配列番号 163))。

40

## 【0367】

下記の表 25 では、最小化された配列およびそれらが由来する親クローンをまとめ、表 26 では、試験された最小化構築物の直接的結合アッセイ (+ / - tRNA) および競合結合アッセイからの結合特性をまとめている。

表 24 : 機能的クローンのアラインメント (G 四量体内の領域のみを示している)

## 【0368】

50

【表 2 4】

|                        |                                         |    |
|------------------------|-----------------------------------------|----|
| AMX(185)_C2 = arc 626  | GG-CAA-G-TAA--TTG-GG-GAGTG-C-GG-GCGG-GG | 28 |
| AMX(185)_G3 = arc 627  | GG-CAA-G-TAA--TTG-GG-GAGTG-C-GG-GCGG-GG | 28 |
| AMX(184)_H9 = arc 612  | GG-CAA-G-TAA--TTG-GG-GAGTG-C-GG-GCGG-GG | 28 |
| AMX(184)_G9 = arc 611  | GG-CAA-GGCAA--TTG-GG-GAGTG-T-GG-GTGG-GG | 29 |
| AMX(184)_G6 = arc 645  | GG-CAA-GAT-A--TTG-GG-GGAAG-C-GG-GTGG-GG | 28 |
| AMX(185)_B2 = arc 628  | GG-CAA-GGCAA--TTG-GG-GAGCG-T-GG-GTGG-GG | 29 |
| AMX(184)_A9 = arc 621  | GG-CG--G-TTA---CG-GG-GGATG-C-GG-GTG--GG | 25 |
| AMX(184)_C4 = arc 644  | GG-CG--G-TAA---CG-GG-GGGTG-A-GG-GTGG-GG | 26 |
| AMX(184)_F10 = arc 616 | GG-CG--G-T-A---CG-GG-GGGAG-T-GG-GCTG-GG | 25 |
| AMX(184)_B11 = arc 614 | GG-CG--G-T-A---CG-GG-GAGTG-T-GG-GTTG-GG | 25 |
| AMX(185)_A6 = arc 643  | GG-CC--GATGA---GG-GG-GAGCAGT-GG-GTGG-GG | 28 |
| AMX(184)_A8 = arc 620  | GG-CGC---TT---GCG-GG-GGGTG-A-GG-GAGG-GG | 26 |
| AMX(184)_H3 = arc 646  | GG-CTC-GA-AA--GAG-GG-GCGTG-A-GG-GTGG-GG | 28 |
| AMX(185)_G5 = arc 635  | GG-CTC-AA-AA--GAG-GG-GGATG-T-GG-GAGG-GG | 28 |
| AMX(184)_A4 = arc 642  | GG-CGC-AGCCA--GCG-GG-GAGTG-A-GG-GTGG-GG | 29 |
| AMX(185)_D1 = arc 632  | GG-TGG---T-G--CCG-GG-GGTTG---GG-GGCG-GG | 25 |

10

表 2 4 に列挙したクローンについての配列番号は、表 1 2 に見られるものである。

【0369】

以下の表 2 5 に記載する最小化された d R m Y アプタマーについて、プリン ( A および G ) は、デオキシ - プリンであり、ピリミジン ( C および U ) は、2' - O Me ピリミジンである。他に述べられない限り、個別の配列は、5' から 3' の方向で示される。表 2 5 に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング ( 例えば、3' - 逆位 d T ) を含んでいても含んでいなくてもよい。

20

表 2 5 : d R m Y 最小化物の配列

【0370】

【表 2 5 - 1】

| 配列番号 | 親クローン   | 最小化物   | 最小化された配列                            |
|------|---------|--------|-------------------------------------|
| 162  | ARC 627 | ARC792 | GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGG        |
| 163  | ARC 614 | ARC793 | CUACAAGGCGGUACGGGGAGUGUGG           |
| 164  | ARC 614 | ARC794 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCCGG      |
| 165  | ARC 616 | ARC795 | CGAUAUAGGCGGUACGGGGGAGUGGGCUGGGGUCG |
| 166  | ARC 626 | ARC796 | UAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGAUCG     |
| 167  | ARC 626 | ARC797 | GGUGGGGAGUGCGGGCGGGGGGUCGCC         |
| 168  | ARC 627 | ARC889 | ACAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU |
| 169  | ARC 627 | ARC890 | CCAGGCAAGGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGG |

30

40

【0371】

【表 2 5 - 2】

|     |            |             |                                                 |    |
|-----|------------|-------------|-------------------------------------------------|----|
| 170 | ARC<br>627 | ARC891      | GGCAAGGUAUUUGGGAAGUGUGGGCGGGG                   |    |
| 171 | ARC<br>627 | ARC892      | GGCAAGGUAUUUGGGUAGUGAGGGCGGGG                   |    |
| 172 | ARC<br>627 | ARC893      | GGCAAGGUAUUUGGGGAGUGCGGGCUGGG                   |    |
| 173 | ARC<br>627 | ARC894      | GGCAAGGUAUUUGGGAAGUGUGGGCUGGG                   |    |
| 174 | ARC<br>627 | ARC895      | GGCAAGGUAUUUGGGUAGUGAGGGCUGGG                   | 10 |
| 175 | ARC<br>627 | ARC896      | ACAGGCAAGGUAUUUGGGUAGUGAGGGCUGGGUGU             |    |
| 176 | ARC<br>627 | ARC897      | GAUGUUGGCAAGUAUUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUUCA<br>UC-3T |    |
| 177 | ARC<br>627 | ARC979      | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGU              |    |
| 178 | ARC<br>627 | ARC980      | CCAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGGUGG              |    |
| 179 | ARC<br>621 | ARC981      | GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGG                       | 20 |
| 180 | ARC<br>621 | ARC982      | GGCGGUUACGGGGGAUGCGGGUGGGACAGG                  |    |
| 181 | ARC<br>627 | ARC111<br>7 | GGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGG                     |    |
| 182 | ARC<br>627 | ARC111<br>8 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGCGGGCGGGUGU               |    |
| 183 | ARC<br>614 | ARC111<br>9 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCC                    |    |
| 184 | ARC<br>614 | ARC112<br>0 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGGCC                    | 30 |
| 185 | ARC<br>614 | ARC112<br>1 | GGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG                          |    |
| 186 | ARC<br>614 | ARC112<br>2 | GGUACGGGGAGUGUGGGCUGGG                          |    |
| 187 | ARC<br>614 | ARC112<br>3 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGGGCC                    |    |
| 188 | ARC<br>614 | ARC112<br>4 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGCUGGGGCC                    |    |
| 189 | ARC<br>614 | ARC112<br>5 | GGUACGGGGAGUGUGGGUUGG                           |    |
| 190 | ARC<br>614 | ARC112<br>6 | GGUACGGGGAGUGUGGGCUGG                           | 40 |
| 191 | ARC        | ARC112      | GGCGGUACGGGGGAGUGGGCUGGGGUC                     |    |

【 0 3 7 2 】

【表 2 5 - 3】

|     |            |             |                             |
|-----|------------|-------------|-----------------------------|
|     | 616        | 7           |                             |
| 192 | ARC<br>616 | ARC112<br>8 | GGCGGUACGGGGGAGUGGGCUGGGUC  |
| 193 | ARC<br>616 | ARC112<br>9 | GGCGGUACGGGGAGAGUGGGCUGGGUC |
| 194 | ARC<br>616 | ARC113<br>0 | GGUACGGGGGAGUGGGCUGGG       |
| 195 | ARC<br>616 | ARC113<br>1 | GGUACGGGGGAGUGGGCUGG        |
| 196 | ARC<br>616 | ARC113<br>2 | GGUACGGGGAGAGUGGGCUGGG      |
| 197 | ARC<br>616 | ARC117<br>0 | GGCGGUACGGGGGAGUGGGCUGGG    |
| 198 | ARC<br>614 | ARC117<br>1 | GGCGGUACGGGGAGUGUGGGUUGGG   |

10

表 2 6 : d R m Y 最小化物のタンパク質結合特性

【 0 3 7 3 】

【表 2 6 - 1】

20

| 配列<br>番号 | 最小化物<br>ARC# | $K_D$<br>(+tRNA)<br>nM | $K_D$ (-tRNA)<br>nM | $K_D$<br>(競合<br>)<br>nM |
|----------|--------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| 162      | ARC792       | 117                    |                     | 11                      |
| 164      | ARC794       | 69                     |                     | 14                      |
| 165      | ARC795       | 40                     |                     | 4                       |
| 166      | ARC796       | 106                    |                     |                         |
| 167      | ARC797       | 50                     |                     |                         |
| 168      | ARC889       | 115                    |                     |                         |
| 169      | ARC890       | 114                    |                     |                         |
| 170      | ARC891       | 177                    |                     |                         |
| 171      | ARC892       | 255                    |                     |                         |
| 172      | ARC893       | 2857                   |                     |                         |
| 173      | ARC894       | 結合せず                   |                     |                         |
| 174      | ARC895       | 結合せず                   |                     |                         |
| 175      | ARC896       | 結合せず                   |                     |                         |
| 176      | ARC897       | 93                     |                     |                         |
| 177      | ARC979       | 93                     | 90                  | 9                       |
| 178      | ARC980       | 139                    |                     |                         |

30

40

【 0 3 7 4 】

【表 2 6 - 2】

|     |         |        |  |  |
|-----|---------|--------|--|--|
| 179 | ARC981  | 結合せず   |  |  |
| 180 | ARC982  | 結合せず   |  |  |
| 181 | ARC1117 | <親クローン |  |  |
| 182 | ARC1118 | <親クローン |  |  |
| 183 | ARC1119 | <親クローン |  |  |
| 184 | ARC1120 | <親クローン |  |  |
| 185 | ARC1121 | <親クローン |  |  |
| 186 | ARC1122 | <親クローン |  |  |
| 187 | ARC1123 | <親クローン |  |  |
| 188 | ARC1124 | <親クローン |  |  |
| 189 | ARC1125 | <親クローン |  |  |
| 190 | ARC1126 | <親クローン |  |  |
| 191 | ARC1127 | <親クローン |  |  |
| 192 | ARC1128 | <親クローン |  |  |
| 193 | ARC1129 | <親クローン |  |  |
| 194 | ARC1130 | <親クローン |  |  |
| 195 | ARC1131 | <親クローン |  |  |
| 196 | ARC1132 | <親クローン |  |  |
| 197 | ARC1170 | 結合せず   |  |  |
| 198 | ARC1171 | 結合せず   |  |  |

10

20

30

40

50

リガンド（アプタマー）の濃度を変化させ、そしてレセプター（IL-23）の濃度を一定に保持した飽和結合実験において競合結合データを再解析し、そして[総投入アプタマー]に対して[結合アプタマー]をプロットした。ARC979（配列番号177）をこの解析に用いた。

## 【0375】

結合している[ARC979]は、約1.7nMで飽和し（図12）、このことは、アプタマーとの結合が許容されるIL-23の濃度が、1nMまたは投入IL-23の2%（1/50）であったことが示唆された。計算された $K_D$ 値は、8nMであり、これは、競合様式で示されたデータ（8.7nM）を当てはめることによって得られる値とよく一致している。

## 【0376】

IL-12競合結合データを同じ解析に供したところ(図13)、活性IL-12の割合は、より高く(10%)、また、IL-12と比べたIL-23に対するARC979の特異性(33倍)は、直接的な結合測定によって予測された値(2~5倍)よりも高かった。

## 【0377】

引き続き、先に記載した結合反応条件(0.1mg/mLのBSAを含む1xPBSによる室温での30分間のインキュベーション)および異なる結合反応条件(0.1mg/mLのBSAを含む1xDulbecco's PBS(Mg<sup>++</sup>およびCa<sup>++</sup>含有)による室温での30分間)を用いて、直接的な結合アッセイをARC979について繰り返した。両方の条件において、新たに化学合成されたアプタマーを、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて精製し、<sup>32</sup>P-ATPで5'末端標識し、そして全長ヒトIL-23への直接的な結合について試験した。8点タンパク質力価測定をドットプロット結合アッセイ({100nM、30nM、10nM、3nM、1nM、300pM、100pM、0pM}または{10nM、3nM、1nM、300pM、100pM、30pM、10pM、0pM}のいずれか)において使用した。KaleidaGraph(KaleidaGraph v.3.51, Synergy Software)を用いて、方程式 $y = (\text{最大値} / (1 + K_D / \text{タンパク質})) + y$ 切片に当てはめることによってK<sub>D</sub>値を計算した。緩衝液の条件が、結合親和性にいくらか影響を及ぼすとみられた。1xPBS条件下では、ARC979についてのK<sub>D</sub>値は、約10nMと計算されたのに対し、1xDulbecco's PBS条件化では、ARC979についてのK<sub>D</sub>値は、約1nMと計算された(図14を参照のこと)。これらのK<sub>D</sub>値は、その後のアッセイにおいて検証され(データ示さず)、以下の実施例3Dに記載されるPHA BlastアッセイにおいてARC979がもたらす約6nMというIC<sub>50</sub>値と一致するものである。

## 【0378】

(実施例2A.4:マウスIL-23 rRfY最小化)

実施例1Eに記載したマウスIL-23 rRfYアプタマーの親クローン配列の目視検査、およびRNAフォールディングプログラム(RNA structure)を用いた予測RNA構造に基づいて、7つの結合性mIL-23クローンの各々に対して、最小化された構築物を設計した。最小化された構築物オリゴ用のPCR鋳型は、Integrated DNA Technologies(Coraville, IA)に発注した。構築物をPCR増幅し、転写し、ゲル精製し、そして先に記載したドットプロット結合アッセイを用いてmIL-23への結合について試験した。微量<sup>32</sup>P標識RNAを、mIL-23と混合し、1xPBS+0.1mg/mLのBSA中、最終容積30μLで室温にて30分間インキュベートした。この反応物をドットプロット装置(Schleicher and Schuell Minifold-1 Dot Blot, Acrylic)に添加した。前節に記載したように結合曲線を作成した。表32には、mIL-23に結合する最小化構築物の配列を列挙する。表33では、mIL-23への著しい結合性を有する各rRfY最小化構築物についてのタンパク質結合特性をまとめた。

## 【0379】

他に述べられない限り、以下に列挙される個別の配列は、5'から3'の方向で示されており、rRfY SELEX<sup>TM</sup>条件下で選別されたマウスIL-23に結合する配列を示し、ここで、プリン(AおよびG)は2'-OHであり、ピリミジン(UおよびC)は2'-フルオロである。表32に列挙される配列の各々は、ポリアルキレングリコール(「PAG」)部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング(例えば、3'-逆位dT)を含んでいても含んでいなくてもよい。

表32 最小化されたマウスrRfYクローン配列

## 【0380】

## 【表 3 2】

配列番号 199 (ARC 1739)

GGGCACUCAGCCACAGGUGGCUUAAUACUGUAAAAGACGUGCCC

配列番号 200 (ARC 1918)

GGAGCGCACUCAGCCACCGGCUUAAUACUCAAUAGGAACGUUCGCUCU

配列番号 201

GGGCACUCAGCCACAGCUCGUGGCUUAAUACUUAUGUGAACGUGCCC

配列番号 202

GGGCACUCAGCCACCUUGGGCUUAAUACCUAUCGGAUGUGCCC

10

表 3 3 : m I L - 2 3 r R f Y クロンの  $K_D$  のまとめ

## 【 0 3 8 1 】

## 【表 3 3】

| 最小化クローン<br>配列番号 | 親クローン名  | 親クローン<br>配列番号 | $K_D$ mL-23<br>(nM) |
|-----------------|---------|---------------|---------------------|
| 199             | ARC1628 | 124           | 1                   |
| 200             | ARC1632 | 128           | 1                   |
| 201             | ARC1633 | 129           | 25                  |
| 202             | ARC1634 | 130           | 19                  |

20

\*  $K_D$  測定のための室温、30分間のインキュベーション\*  $1 \times PBS + 0.1 mg / mL$  の BSA 反応緩衝液

(実施例 2 B : 医薬品化学による最適化)

アプタマー医薬品化学は、改変体アプタマーセットを化学合成するアプタマー改良法である。これらの改変体セットは、代表的には、単一置換基を導入することによって親アプタマーと異なるものとなり、また、この置換基の配置によって互いに異なるものとなる。次いで、これらの改変体を互いに、そしてその親と比較する。単一置換基を含むことが、特定の治療的基準を達成するために必要なすべてであり得るのに十分な特性の改良は意味深いものであり得る。

30

## 【 0 3 8 2 】

あるいは、単一改変体のセットから集められる情報を用いて、2つ以上の置換基が同時に導入されるさらなる改変体セットを設計し得る。1つの設計ストラテジーでは、単一置換基改変体のすべてに順位をつけ、上位4つを選択し、これらの4つの単一置換基改変体のすべての可能性のある組み合わせ(2つからなるもの(6個)、3つからなるもの(4個)および4つからなるもの(1個))を合成し、アッセイする。第2の設計ストラテジーでは、最良の単一置換基改変体を新しい親と見なし、そしてこの最高位の単一置換基改変体を含む可能性のあるすべての置換基改変体(2つからなるもの)を合成し、アッセイする。他のストラテジーを使用してもよく、これらのストラテジーは、さらに改善される改変体を同定し続けながら置換基の数を徐々に増やして繰り返し適用され得る。

40

## 【 0 3 8 3 】

アプタマー医薬品化学は、全体的ではなく局所的な置換基の導入を探索する方法として最も価値のある方法である。アプタマーは、転写によって生成されるライブラリー内で発見されるので、SELEX<sup>TM</sup> プロセス中に導入されるいかなる置換基も全体的に導入されなければならない。例えば、ヌクレオチド間にホスホロチオエート結合を導入することが望ましい場合、その結合は、すべてのA(またはすべてのG、C、T、Uなど)において導入され得るだけである(全体的な置換)。一部のA(またはいくつかのG、C、T、Uなど)においてホスホロチオエートを必要とするが、他のAにおいてはホスホロチオエートを許容できないアプタマー(局所的な置換)は、このプロセスによって容易に見え

50

れ得ない。

【0384】

アプタマー医薬品化学プロセスによって利用され得る置換基の種類は、固相合成試薬としてそれらを作製し、オリゴマー合成スキームにそれらを導入する能力によってしか制限されない。無論、プロセスは、ヌクレオチドだけに制限されない。アプタマー医薬品化学スキームは、立体的なかさ高さ、疎水性、親水性、親油性、疎油性、正電荷、負電荷、中性電荷、両性イオン、分極率、ヌクレアーゼ耐性、配座的剛性、配座的可撓性、タンパク質結合特性、質量などを導入する置換基を含み得る。アプタマー医薬品化学スキームは、塩基改変、糖改変またはホスホジエステル結合改変を含み得る。

【0385】

治療的アプタマーの概念の中で有益である可能性のある置換基の種類を考慮するとき、以下のカテゴリーの1つ以上に分類される置換を導入することが望ましい場合がある：

(1) 本体にすでに存在する置換基、例えば、2'-デオキシ、2'-リボ、2'-O-メチルプリンもしくはピリミジンまたは5-メチルシトシン。

(2) 承認された治療薬のすでに一部である置換基、例えば、ホスホロチオエート結合したオリゴヌクレオチド。

(3) 上記2カテゴリーの1つに加水分解または分解する置換基、例えば、メチルホスホネート結合したオリゴヌクレオチド。

【0386】

(実施例2B.1：ホスホロチオエート置換によるARC979の最適化)

ARC979 (配列番号177) は、dRmY組成のIL-23に対する34ヌクレオチドアプタマーである。各リン酸エステル結合 (ARC1149 ~ ARC1169) (配列番号203 ~ 配列番号223) において単一ホスホロチオエート置換がなされた21個のARC979のホスホロチオエート誘導体を設計し、合成した (表27を参照のこと)。これらの分子をゲル精製し、上に記載したようなドットプロットアッセイを用いて、互いにそして親分子のARC979と比較してIL-23結合についてアッセイした。8点IL-23力価測定 (0 nM ~ 300 nM、3倍系列希釈) を結合アッセイにおいて使用した。算出された $K_D$ を表28にまとめた。

【0387】

ARC979にホスホロチオエート結合を含めることは、ARC979と比較して十分に許容された。これらの構築物の多くは、IL-23に結合する割合が増大し、さらにその $K_D$ 値が改善された (すなわち、低くなった) (図15)。類似の親和性の増大は、競合アッセイにおいて見られ (図16)、このことは、ARC979のホスホロチオエート誘導体が、ARC979より高い親和性でIL-23に対して競合することをさらに支持するものである。

【0388】

他に述べられない限り、以下の表27に列挙される配列の各々は、5'から3'の方向であり、ポリアルキレングリコール (「PAG」) 部分を用いて誘導体化され得、そしてキャッピング (例えば、3'-逆位dT) を含んでいても含んでいなくてもよい。

表27：ARC979ホスホロチオエート誘導体の配列：単一ホスホロチオエート置換

【0389】

10

20

30

40

【表 2 7】

| 配列番号 | ARC#    | 塩基(x, y)間のホスホロチオエートリンカー |    | 配列                                  |
|------|---------|-------------------------|----|-------------------------------------|
|      |         |                         |    |                                     |
| 203  | ARC1149 | 1                       | 2  | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 204  | ARC1150 | 2                       | 3  | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 205  | ARC1151 | 6                       | 7  | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 206  | ARC1152 | 7                       | 8  | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 207  | ARC1153 | 8                       | 9  | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 208  | ARC1154 | 9                       | 10 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 209  | ARC1155 | 10                      | 11 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 210  | ARC1156 | 11                      | 12 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 211  | ARC1157 | 12                      | 13 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 212  | ARC1158 | 13                      | 14 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 213  | ARC1159 | 14                      | 15 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 214  | ARC1160 | 18                      | 19 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 215  | ARC1161 | 19                      | 20 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 216  | ARC1162 | 20                      | 21 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 217  | ARC1163 | 21                      | 22 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 218  | ARC1164 | 22                      | 23 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 219  | ARC1165 | 26                      | 27 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 220  | ARC1166 | 27                      | 28 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 221  | ARC1167 | 28                      | 29 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 222  | ARC1168 | 32                      | 33 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |
| 223  | ARC1169 | 33                      | 34 | ACAGGCAAGUAAUUGGGGAGUGC GGGCGGGGUGU |

10

20

表 2 8 : A R C 9 7 9 ホスホロチオエート誘導体に対する  $K_D$  のまとめ

30

【 0 3 9 0 】

【表 2 8 - 1】

| 配列番号 | ARC#    | $K_D$ (+tRNA)<br>nM | $K_D$ (-tRNA)<br>nM | $K_D$ (競合)<br>nM |
|------|---------|---------------------|---------------------|------------------|
| 177  | ARC979  | 93                  | 90                  | 9                |
| 203  | ARC1149 | 試験せず                |                     |                  |
| 204  | ARC1150 | 試験せず                |                     |                  |
| 205  | ARC1151 |                     | 142                 |                  |

40

【 0 3 9 1 】

【表 28 - 2】

|     |         |  |     |   |
|-----|---------|--|-----|---|
| 206 | ARC1152 |  | 232 |   |
| 207 | ARC1153 |  | 174 |   |
| 208 | ARC1154 |  | 412 |   |
| 209 | ARC1155 |  | 168 |   |
| 210 | ARC1156 |  | 369 |   |
| 211 | ARC1157 |  | 69  |   |
| 212 | ARC1158 |  | 192 |   |
| 213 | ARC1159 |  | 77  |   |
| 214 | ARC1160 |  | 38  | 5 |
| 215 | ARC1161 |  | 55  | 6 |
| 216 | ARC1162 |  | 47  | 6 |
| 217 | ARC1163 |  | 49  | 8 |
| 218 | ARC1164 |  | 79  |   |
| 219 | ARC1165 |  | 55  |   |
| 220 | ARC1166 |  | 132 |   |
| 221 | ARC1167 |  | 107 |   |
| 222 | ARC1168 |  | 82  |   |
| 223 | ARC1169 |  | 74  |   |

10

20

30

40

50

(実施例 2 B . 2 : 最適化 : 2' - OMe、ホスホロチオエートおよびイノシン置換) 体系的な改変を ARC 979 (配列番号 177) に対して行うことにより、全体的な安定性および血漿ヌクレアーゼ耐性が増大した。ARC 979 の最も安定で強力な改変体を、4 期のアプタマー合成、精製および結合活性についてのアッセイを含む体系的な合成アプローチを通じて同定した。そのプロセスにおける第 1 工程は、ARC 1386 (配列番号 224) (3' 逆位 dT を含む ARC 979) の合成および結合活性についてのアッセイであった。一旦、ARC 1386 (配列番号 224) が、親分子 ARC 979 (配列番号 177) の親和性と同様の親和性で IL - 23 に結合することが示されたら、その後のすべての ARC 979 の誘導体は、安定化 3' - 逆位 - dT を用いて合成された。

## 【0392】

先に記載したドットプロット結合アッセイを用いて、合成した大部分のアプタマーの相対的効力を特徴付けた。K<sub>D</sub> を決定するために、化学合成されたアプタマーを、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて精製し、<sup>32</sup>P ATP で 5' 末端標識し、そして完全長ヒト IL - 23 への直接的な結合について試験した。8 点タンパク質力価測定を、0.1 mg/mL の BSA を含む Dulbecco's PBS (Mg<sup>++</sup> および Ca<sup>++</sup> 含有) 中でのドットプロット結合アッセイ ( { 100 nM、30 nM、10 nM、3 nM、1 nM、300 pM、100 pM、0 pM } または { 10 nM、3 nM、1 nM、300 pM、100 pM、30 pM、10 pM、0 pM } のいずれか ) において使用した。K<sub>D</sub> 値は、Kaleida Graph (Kaleida Graph v. 3.51, Synergy Software) を用いて方程式  $y = (\text{最大値} / (1 + K / \text{タンパク質})) + y$  切片に当てはめることにより計算した。合成され、精製され、そして IL - 23 への結合についてアッセイされた ARC 979 誘導体の配列ならびにタンパク質結合特性の結果を下記の表 29 および 30 に作表した。表 30 に見られるように、また、上の実施例 2 A . 3 において先に記載したように、ARC 1386 (配列番号 224) (これは、3' 逆位 dT を含む ARC 979 (配列番号 177) である) は、これらの条件下において 1 nM という K<sub>D</sub> を有する。

## 【0393】

A R C 1 4 2 7 ~ A R C 1 4 7 1 ( 配列番号 2 2 5 ~ 2 6 9 ) を含む最適化プロセスの第 1 期において、A R C 1 3 8 6 ( 配列番号 2 2 4 ) 中の各個別のプリン残基を、対応する 2' - Oメチル含有残基によって置換した。第 1 期ではさらに、ホスホロチオエート置換が、ヌクレアーゼ安定性をもたらすことに加えて、A R C 9 7 9 の誘導体の結合親和性を増大させると示唆された、先に得られた結果に基づいて、一連の個別および混成のホスホロチオエート置換を試験した。最終的には、第 1 期の終わりに、A R C 9 7 9 / A R C 1 3 8 6 の機能的状況におけるステム 1 の役割をさらに探索する試験を一連のアプタマーに行った。表 3 0 における結合データからわかるように、多くの位置において、2' - Oメチル残基へのデオキシ残基の置換が容易に許容された。任意の特定のホスホロチオエートの付加は、アプタマーの親和性を著しく増大させるようにはみえなかった。興味深いことに、A R C 1 4 6 5 ~ 1 4 7 1 ( 配列番号 2 6 3 ~ 2 6 9 ) の比較によってわかるように、ステム 1 は、高い親和性結合の維持にとって重要であったが、しかしながら、アプタマーコアとステム 1 を含む 2 本の鎖との間への P E G スペースの導入が、アプタマーの結合特性に著しく影響すると思われなかったため、ステム 1 の役割は、構造的クランプであるように思われた。

10

## 【0394】

最適化プロセスの第 1 期からの構造活性関係 ( S A R ) 結果に基づいて、第 2 のシリーズのアプタマーを設計し、合成し、精製し、そして I L - 2 3 への結合について試験した。A R C 1 5 3 9 ~ A R C 1 5 4 5 ( 配列番号 2 7 0 ~ 2 7 6 ) を含む第 2 期の最適化において、第 1 期からのデータを使用し、もっぱら 2' - Oメチル置換を用いて、より高度に改変された複合性分子を作製した。これらの分子およびその後のすべての分子に対しては、約 2 n M またはそれよりも良好な親和性 (  $K_D$  ) ならびに 1 0 0 n M ( または第 3 および 4 期では 1 0 n M ) で少なくとも 5 0 % の I L - 2 3 に結合するという程度を保持した分子を同定することが目標であった。単純な結合親和性に関してこれらのうち最良のものは、A R C 1 5 4 4 ( 配列番号 2 7 5 ) であった。

20

## 【0395】

A R C 1 5 9 1 ~ A R C 1 6 2 6 ( 配列番号 2 7 7 ~ 3 1 2 ) を含む最適化の第 3 期では、A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) の G - 四量体構造の安定性は、デオキシイノシン ( d I ) による ( デオキシグアノシン ) d G の体系的な置換の間に I L - 2 3 結合についてアッセイすることによって探査された。デオキシイノシンが、デオキシグアノシンに見られる環外アミンを有しないので、d G から d I への置換ごとに可能性のある G - 四量体からアミノ - N 7 水素結合が 1 つだけ除去される。データからわかるように、重大な置換だけが、I L - 2 3 に対する親和性の実質的な低下をもたらすことから、アプタマー構造が頑強であることが示唆される。さらに、A R C 1 5 4 4 ( 配列番号 2 7 5 ) へのホスホロチオエート含有残基の付加を評価した ( A R C 1 6 2 0 ~ A R C 1 6 2 6 ( 配列番号 3 0 6 ~ 3 1 2 ) を含む ) 。表 3 0 に見られるように、A R C 1 6 2 0 ~ 1 6 2 6 ( 配列番号 3 0 6 ~ 3 1 2 ) の親和性は、A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) と比較して実際に改善された。図 1 7 は、第 3 期最適化の試み由来の選ばれた A R C 9 7 9 誘導体 ( A R C 1 6 2 4 および A R C 1 6 2 5 ) についての結合曲線を示すものであり、ここで、選ばれたホスホロチオエート含有残基を含めることによってもたらされる結合親和性が、親分子 A R C 9 7 9 と比較して著しく改善されたことが示されている。

30

40

## 【0396】

A R C 1 7 5 5 ~ 1 7 5 6 ( 配列番号 3 1 3 ~ 3 1 4 ) を含む最適化の第 4 期は、一層多いデオキシを 2' - Oメチル置換に導入し、親和性を保持する目的で、たった 2 つの配列だけを含むものであった。A R C 1 7 5 5 および 1 7 5 6 とともに見られるように、これらの実験は成功であった。

## 【0397】

他に述べられない限り、表 2 9 に列挙される配列の各々は、5' から 3' の方向であり、ポリアルキレングリコール ( 「 P A G 」 ) 部分を用いて誘導体化され得る。

50

表 29 : 第 1 ~ 4 期の ARC 979 最適化の配列情報

【 0 3 9 8 】

【 表 2 9 - 1 】

| 配列番号 | ARC #       | 説明                    | 配列 (5' → 3')、(3T=逆位dT)、(T=dT)、(s=ホスホリボチオエート)、(mN=2'-Oメチル含有残基)、(dI=デオキシイノシン含有残基) |
|------|-------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 224  | ARC13<br>86 | 3' - 逆位dTを有する ARC 979 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T         |
| 225  | ARC14<br>27 | ARC979<br>第1期最適化      | mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T         |

10

【 0 3 9 9 】

【表 29 - 2】

|     |             |                  |                                                                                 |
|-----|-------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 226 | ARC14<br>28 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 227 | ARC14<br>29 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAmGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 228 | ARC14<br>30 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGmGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 229 | ARC14<br>31 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCmAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 230 | ARC14<br>32 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAmAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 231 | ARC14<br>33 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAmGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 232 | ARC14<br>34 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUmAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 233 | ARC14<br>35 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAmAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 234 | ARC14<br>36 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUmG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 235 | ARC14<br>37 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>mGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T |
| 236 | ARC14<br>38 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GmGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T |
| 237 | ARC14<br>39 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGmGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T |
| 238 | ARC14<br>40 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGmAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T |
| 239 | ARC14<br>41 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAmGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T |

10

20

30

40

【 0 4 0 0 】

【表 29 - 3】

|     |             |                  |                                                                                        |
|-----|-------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 240 | ARC14<br>42 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 241 | ARC14<br>43 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCmGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 242 | ARC14<br>44 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGmGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 243 | ARC14<br>45 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGmGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 244 | ARC14<br>46 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCmGdGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 245 | ARC14<br>47 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGmGdGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 246 | ARC14<br>48 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGmGdG<br>mUdGmU-3T        |
| 247 | ARC14<br>49 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGmG<br>mUdGmU-3T        |
| 248 | ARC14<br>50 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUmGmU-3T        |
| 249 | ARC14<br>51 | ARC979<br>第1期最適化 | mAmCmAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUmGmU-3T        |
| 250 | ARC14<br>52 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUm<br>GdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdG<br>dGmUdGmU-3T        |
| 251 | ARC14<br>53 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdA-s-<br>dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd<br>AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGm<br>U-3T |
| 252 | ARC14<br>54 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdG-s-<br>dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAd<br>GmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-<br>3T |
| 253 | ARC14<br>55 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdG-s-<br>mCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGdAdGm                                       |

10

20

30

40

【表 2 9 - 4】

|     |             |                  |                                                                                                   |    |
|-----|-------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|     |             |                  | UdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T                                                                    |    |
| 254 | ARC14<br>56 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG-<br>s-<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T            |    |
| 255 | ARC14<br>57 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>G-s-<br>dGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T            | 10 |
| 256 | ARC14<br>58 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdG-s-<br>dGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmUd<br>GmU-3T            |    |
| 257 | ARC14<br>59 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmC-s-<br>dGdGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T                |    |
| 258 | ARC14<br>60 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdG-s-<br>dGdGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T                | 20 |
| 259 | ARC14<br>61 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdG-s-<br>dGmCdGdGdGdGmUdGmU-3T                |    |
| 260 | ARC14<br>62 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGmCdGdG-s-<br>dGdGmUdGmU-3T                  |    |
| 261 | ARC14<br>63 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdG-s-<br>dGmUdGmU-3T                |    |
| 262 | ARC14<br>64 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-<br>s-mUdGmU-3T                | 30 |
| 263 | ARC14<br>65 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdA-s-<br>dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-<br>mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdGmUdGmU-3T |    |
| 264 | ARC14<br>66 | ARC979<br>第1期最適化 | dAmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUm<br>UdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdG<br>dGdGPEGmUdGmU-3T             |    |
| 265 | ARC14<br>67 | ARC979<br>第1期最適化 | mCmGmCdAPEGdGdGmCdAdAdGmUdAdAm<br>UmUdGdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdG<br>dGdGdGPEGmUdGmCmG-3T         | 40 |
| 266 | ARC14<br>68 | ARC979<br>第1期最適化 | dGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdGdGdGd<br>AdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T                                   |    |

【表 2 9 - 5】

|     |             |                  |                                                                                       |
|-----|-------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 267 | ARC14<br>69 | ARC979<br>第1期最適化 | dGdGmCmAmAdGmUdAdAmUmUmGdGdGdG<br>dAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG-3T                       |
| 268 | ARC14<br>70 | ARC979<br>第1期最適化 | dGdGmCdAdAdGmUdA-s-<br>dAmUmUdGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-<br>mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T |
| 269 | ARC14<br>71 | ARC979<br>第1期最適化 | dGdGmCmAmAdGmUdA-s-<br>dAmUmUmGdGdGdGdA-s-dG-s-mU-s-dG-s-<br>mCdGdGdG-s-mCdGdGdGdG-3T |
| 270 | ARC15<br>39 | ARC979<br>第2期最適化 | mAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>dGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUmGmU-3T       |
| 271 | ARC15<br>40 | ARC979<br>第2期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUd<br>GdGdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdG<br>dGmUdGmU-3T       |
| 272 | ARC15<br>41 | ARC979<br>第2期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGmGmAmGmUmGmCdGdGdGmCdGdGdGd<br>GmUdGmU-3T       |
| 273 | ARC15<br>42 | ARC979<br>第2期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGmGmCmGmGdGd<br>GmUdGmU-3T       |
| 274 | ARC15<br>43 | ARC979<br>第2期最適化 | mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUd<br>GdGdGmGmAmGmUmGmCdGdGmGmCmGm<br>GdGdGmUmGmU-3T       |
| 275 | ARC15<br>44 | ARC979<br>第2期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>mGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGm<br>GmGmUdGmU-3T       |
| 276 | ARC15<br>45 | ARC979<br>第2期最適化 | mAmCdAdGdGmCdAmAmGmUmAdAmUmUd<br>GmGmGmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCmG<br>mGmGmGmUmGmU-3T       |
| 277 | ARC15<br>91 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdIdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T       |
| 278 | ARC15<br>92 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T       |
| 279 | ARC15<br>93 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdIdImCdAdAdGmUdAdAmUmUdGdG<br>dGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T       |
| 280 | ARC15<br>94 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdImUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T       |

10

20

30

40

【表 29 - 6】

|     |             |                  |                                                                                 |
|-----|-------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 281 | ARC15<br>95 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdId<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdGmU-3T |
| 282 | ARC15<br>96 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>IdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 283 | ARC15<br>97 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdIdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 284 | ARC15<br>98 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdIdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 285 | ARC15<br>99 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdI<br>dGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 286 | ARC16<br>00 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>IdIdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 287 | ARC16<br>01 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdIdIdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 288 | ARC16<br>02 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdIdI<br>dIdIdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGmU<br>dGmU-3T |
| 289 | ARC16<br>03 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdImUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 290 | ARC16<br>04 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdImCdGdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 291 | ARC16<br>05 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdIdGdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 292 | ARC16<br>06 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdIdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 293 | ARC16<br>07 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdImCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |
| 294 | ARC16<br>08 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdIdIdGmCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T |

10

20

30

40

【表 29 - 7】

|     |             |                  |                                                                                           |
|-----|-------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 295 | ARC16<br>09 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdIdImCdGdGdGdGm<br>UdGmU-3T           |
| 296 | ARC16<br>10 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdIdIdImCdGdGdGdGmU<br>dGmU-3T           |
| 297 | ARC16<br>11 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdGdGdGm<br>UdGmU-3T           |
| 298 | ARC16<br>12 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdGdGm<br>UdGmU-3T           |
| 299 | ARC16<br>13 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdGm<br>UdGmU-3T           |
| 300 | ARC16<br>14 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdIm<br>UdGmU-3T           |
| 301 | ARC16<br>15 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdGdGm<br>UdGmU-3T           |
| 302 | ARC16<br>16 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdIdIdGm<br>UdGmU-3T           |
| 303 | ARC16<br>17 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdIdIm<br>UdGmU-3T           |
| 304 | ARC16<br>18 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdIdIdImUd<br>GmU-3T             |
| 305 | ARC16<br>19 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGd<br>GdGdGdAdGmUdGmCdGdGdGmCdGdGdGdG<br>mUdImU-3T           |
| 306 | ARC16<br>20 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmC-s-<br>dAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG<br>dGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGm<br>UdGmU-3T    |
| 307 | ARC16<br>21 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdA-s-dG-s-<br>dGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmGdGdA<br>dGmUdGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGm<br>U-3T |

10

20

30

40

【表 29 - 8】

|     |             |                  |                                                                                                                                        |    |
|-----|-------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 308 | ARC16<br>22 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-<br>dAmUmU-s-<br>dGmGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdG<br>mGmGmUdGmU-3T                                  | 10 |
| 309 | ARC16<br>23 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>mGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-<br>dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T                                            |    |
| 310 | ARC16<br>24 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>mGmGdGdAdGmUdGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-<br>s-dGmGmGmUdGmU-3T                                               |    |
| 311 | ARC16<br>25 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdG<br>mGmGdGdAdGmUdGmCmGmGdGmCdGdGm<br>GmGmU-s-dGmU-3T                                                     |    |
| 312 | ARC16<br>26 | ARC979<br>第3期最適化 | dAmC-s-dA-s-dG-s-dGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-<br>s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-<br>dGmU-s-dGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-<br>dGmGmGmU-s-dGmU-3T |    |
| 313 | ARC17<br>55 | ARC979<br>第4期最適化 | mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-<br>dAmUmU-s-<br>dGmGmGmGmAmGmUmGmCmGmGmGmCm<br>GmGmGmGmUmGmU-3T                                        |    |
| 314 | ARC17<br>56 | ARC979<br>第4期最適化 | mAmC-s-dAdGdGmC-s-dAmAmGmUmA-s-<br>dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-<br>dGmCmGmGmGmCmGmGmGmUmGmU-<br>3T                              |    |

表 30 : 結合特性

【 0 4 0 6 】

【表 30 - 1】

| 配列番号 | ARC #   | 説明                          | K <sub>D</sub> (nM) | 100nM(ARC<br>1619)または1<br>0nM(ARC16<br>20~1756)に<br>おける%結合 | 30 |
|------|---------|-----------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------|----|
| 224  | ARC1386 | 3' - 逆位dTを<br>有するARC97<br>9 | 1                   | 69.9                                                       |    |
| 225  | ARC1427 | ARC979<br>第1期最適化            | 3.0                 | 49.4                                                       |    |
| 226  | ARC1428 | ARC979<br>第1期最適化            | 1.8                 | 57.8                                                       | 40 |

【 0 4 0 7 】

【表 3 0 - 2】

|     |         |                  |      |      |
|-----|---------|------------------|------|------|
| 227 | ARC1429 | ARC979<br>第1期最適化 | 29.5 | 48.4 |
| 228 | ARC1430 | ARC979<br>第1期最適化 | 14.2 | 51.6 |
| 229 | ARC1431 | ARC979<br>第1期最適化 | 10.0 | 56.3 |
| 230 | ARC1432 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.8  | 57.9 |
| 231 | ARC1433 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.8  | 55.2 |
| 232 | ARC1434 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.0  | 52.9 |
| 233 | ARC1435 | ARC979<br>第1期最適化 | 9.8  | 51.2 |
| 234 | ARC1436 | ARC979<br>第1期最適化 | 15.1 | 46.9 |
| 235 | ARC1437 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.9  | 43.1 |
| 236 | ARC1438 | ARC979<br>第1期最適化 | 6.0  | 36.7 |
| 237 | ARC1439 | ARC979<br>第1期最適化 | 4.8  | 43.5 |
| 238 | ARC1440 | ARC979<br>第1期最適化 | 6.7  | 54.9 |
| 239 | ARC1441 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.7  | 49.8 |
| 240 | ARC1442 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.8  | 60.5 |
| 241 | ARC1443 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.0  | 52.8 |
| 242 | ARC1444 | ARC979<br>第1期最適化 | 4.4  | 58.1 |
| 243 | ARC1445 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.8  | 56.3 |
| 244 | ARC1446 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.1  | 55.0 |
| 245 | ARC1447 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.5  | 56.5 |
| 246 | ARC1448 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.3  | 59.5 |

10

20

30

40

【 0 4 0 8 】

【表 3 0 - 3】

|     |         |                  |      |      |
|-----|---------|------------------|------|------|
| 247 | ARC1449 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.6  | 48.4 |
| 248 | ARC1450 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.6  | 46.5 |
| 249 | ARC1451 | ARC979<br>第1期最適化 | 10.2 | 46.1 |
| 250 | ARC1452 | ARC979<br>第1期最適化 | 18.9 | 56.9 |
| 251 | ARC1453 | ARC979<br>第1期最適化 | 4.4  | 65.0 |
| 252 | ARC1454 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.7  | 61.6 |
| 253 | ARC1455 | ARC979<br>第1期最適化 | 1.6  | 56.6 |
| 254 | ARC1456 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.2  | 55.5 |
| 255 | ARC1457 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.0  | 56.1 |
| 256 | ARC1458 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.9  | 49.6 |
| 257 | ARC1459 | ARC979<br>第1期最適化 | 4.0  | 50.7 |
| 258 | ARC1460 | ARC979<br>第1期最適化 | 5.8  | 46.1 |
| 259 | ARC1461 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.7  | 47.3 |
| 260 | ARC1462 | ARC979<br>第1期最適化 | 1.7  | 53.4 |
| 261 | ARC1463 | ARC979<br>第1期最適化 | 3.6  | 53.5 |
| 262 | ARC1464 | ARC979<br>第1期最適化 | 2.4  | 54.6 |
| 263 | ARC1465 | ARC979<br>第1期最適化 | 1.3  | 57.0 |
| 264 | ARC1466 | ARC979<br>第1期最適化 | 1.9  | 38.7 |
| 265 | ARC1467 | ARC979<br>第1期最適化 | 1.7  | 57.0 |
| 266 | ARC1468 | ARC979<br>第1期最適化 | 10.0 | 49.8 |

10

20

30

40

【 0 4 0 9 】

【表 3 0 - 4】

|     |         |                  |                            |             |
|-----|---------|------------------|----------------------------|-------------|
| 267 | ARC1469 | ARC979<br>第1期最適化 | 49.8                       | 59.8        |
| 268 | ARC1470 | ARC979<br>第1期最適化 | 8.6                        | 61.0        |
| 269 | ARC1471 | ARC979<br>第1期最適化 | 23.5                       | 62.9        |
| 270 | ARC1539 | ARC979<br>第2期最適化 | 6.6                        | 43.8        |
| 271 | ARC1540 | ARC979<br>第2期最適化 | 7.5                        | 50.3        |
| 272 | ARC1541 | ARC979<br>第2期最適化 | 3.9                        | 57.0        |
| 273 | ARC1542 | ARC979<br>第2期最適化 | 1.2                        | 57.6        |
| 274 | ARC1543 | ARC979<br>第2期最適化 | 5.9                        | 40.9        |
| 275 | ARC1544 | ARC979<br>第2期最適化 | 0.9                        | 58.6        |
| 276 | ARC1545 | ARC979<br>第2期最適化 | 0.4および62.0(結合曲線が強い二相性であった) | 17.4 & 20.9 |
| 277 | ARC1591 | ARC979<br>第3期最適化 |                            | 54.8        |
| 278 | ARC1592 | ARC979<br>第3期最適化 | 8.1                        | 54.4        |
| 279 | ARC1593 | ARC979<br>第3期最適化 | 13.8                       | 51.0        |
| 280 | ARC1594 | ARC979<br>第3期最適化 | 4.2                        | 60.1        |
| 281 | ARC1595 | ARC979<br>第3期最適化 | 5.4                        | 53.9        |
| 282 | ARC1596 | ARC979<br>第3期最適化 | 11.1                       | 59.0        |
| 283 | ARC1597 | ARC979<br>第3期最適化 | 11.2                       | 61.3        |
| 284 | ARC1598 | ARC979<br>第3期最適化 | 4.7                        | 61.0        |

10

20

30

40

【 0 4 1 0 】

【表 3 0 - 5】

|     |         |                  |      |      |
|-----|---------|------------------|------|------|
| 285 | ARC1599 | ARC979<br>第3期最適化 | 7.2  | 57.7 |
| 286 | ARC1600 | ARC979<br>第3期最適化 | 15.6 | 61.3 |
| 287 | ARC1601 | ARC979<br>第3期最適化 | 4.4  | 58.6 |
| 288 | ARC1602 | ARC979<br>第3期最適化 | 40.8 | 64.4 |
| 289 | ARC1603 | ARC979<br>第3期最適化 | 1.6  | 64.2 |
| 290 | ARC1604 | ARC979<br>第3期最適化 | 2.1  | 50.2 |
| 291 | ARC1605 | ARC979<br>第3期最適化 | 7.5  | 56.8 |
| 292 | ARC1606 | ARC979<br>第3期最適化 | 5.0  | 60.3 |
| 293 | ARC1607 | ARC979<br>第3期最適化 | 3.3  | 61.5 |
| 294 | ARC1608 | ARC979<br>第3期最適化 | 9.7  | 61.1 |
| 295 | ARC1609 | ARC979<br>第3期最適化 | 4.7  | 60.5 |
| 296 | ARC1610 | ARC979<br>第3期最適化 | 5.2  | 60.4 |
| 297 | ARC1611 | ARC979<br>第3期最適化 | 1.7  | 62.1 |
| 298 | ARC1612 | ARC979<br>第3期最適化 | 1.9  | 60.9 |
| 299 | ARC1613 | ARC979<br>第3期最適化 | 2.3  | 58.4 |
| 300 | ARC1614 | ARC979<br>第3期最適化 | 1.7  | 60.5 |
| 301 | ARC1615 | ARC979<br>第3期最適化 | 5.8  | 55.2 |
| 302 | ARC1616 | ARC979<br>第3期最適化 | 6.1  | 59.5 |
| 303 | ARC1617 | ARC979<br>第3期最適化 | 4.1  | 61.9 |
| 304 | ARC1618 | ARC979<br>第3期最適化 | 34.0 | 67.0 |

10

20

30

40

【 0 4 1 1 】

【表 3 0 - 6】

|     |         |                  |     |      |
|-----|---------|------------------|-----|------|
| 305 | ARC1619 | ARC979<br>第3期最適化 | 2.8 | 52.1 |
| 306 | ARC1620 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.4 | 68.0 |
| 307 | ARC1621 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.5 | 64.6 |
| 308 | ARC1622 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.3 | 66.0 |
| 309 | ARC1623 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.2 | 68.7 |
| 310 | ARC1624 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.4 | 68.0 |
| 311 | ARC1625 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.4 | 75.0 |
| 312 | ARC1626 | ARC979<br>第3期最適化 | 0.1 | 79.2 |
| 313 | ARC1755 | ARC979<br>第4期最適化 | 0.8 | 31   |
| 314 | ARC1756 | ARC979<br>第4期最適化 | 0.5 | 56   |

10

20

30

40

50

\*  $K_D$  測定のための室温、30分間のインキュベーション

\*  $1 \times Dulbecco's$  PBS ( $Ca^{++}$  および  $Mg^{++}$  含有) + 0.1 mg/ml の BSA 反応緩衝液

(実施例 2 C : 抗 IL - 23 アプタマーの血漿安定性)

最適化プロセスの間に同定されたアプタマーのサブセットを、ヒト血漿中におけるヌクレアーゼ安定性についてアッセイした。以下に記載するような変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて血漿ヌクレアーゼ分解を測定した。簡潔には、血漿安定性測定に向けて、化学合成したアプタマーを、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて精製し、 $^{32}P$  ATP で 5' 末端標識し、次いで、再度ゲル精製した。200 マイクロリットルの結合反応物中において、95% ヒト血漿中の 100 nM の未標識アプタマー存在下で微量  $^{32}P$  標識アプタマーをインキュベートした。血漿を PBS に置き換えること以外は同じ成分を用いて時間 0 についての反応物を別個に作製し、ゲル上に負荷された放射能の量を、実験を通じて一致することを確実にした。反応物を、1、3、10、30 および 100 時間、サーモサイクラーにおいて 37 °C でインキュベートした。各時点において、20 マイクロリットルの反応物を取り出し、200 マイクロリットルのホルムアミドローディング色素と混合し、そして液体窒素中で急凍し、-20 °C で保存した。最後の時点が終わった後、凍結サンプルを解冻し、各時点のものから 20 マイクロリットルを取り出した。次いで、最終濃度が 0.1% となるように少量のサンプルに SDS を加えた。次いで、そのサンプルを 90 °C で 10 ~ 15 分間インキュベートし、15% 変性 PAGE ゲル上に直接ロードし、12 W で 35 分間電気泳動した。Storm 860 Phosphor imager システム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いてゲル上の放射能を定量した。完全長アプタマーバンドを定量し、そしてレーン中の総数で割ることによって、各時点での完全長アプタマーのパーセンテージを決定した。次いで、各時点での完全長アプタマーの割合を、0 時間での完全長アプタマーのパーセンテージに対して正規化した。時間の関数として完全長アプタマーの割合を方程式：

$$m_1 * e^{(-m_2 * m_0)}$$

(式中、 $m_1$  は、完全長アプタマーの最大% ( $m_1 = 100$ ) であり； $m_2$  は、分解速度である)

に当てはめた。アプタマーの半減期 ( $T_{1/2}$ ) は、 $(\ln 2) / m_2$  に等しい。

【0412】

サンプルデータを図18に示し、試験したアプタマーに対する結果を表31にまとめる。

表31：血漿安定性

【0413】

【表31-1】

| 配列番号 | ARC #   | 説明                    | ヒト血漿中での<br>およその $T_{1/2}$<br>(時間) |
|------|---------|-----------------------|-----------------------------------|
| 177  | ARC979  |                       | 14                                |
| 224  | ARC1386 | 3'-逆位dTを<br>有するARC979 | 33                                |
| 307  | ARC1621 | ARC979<br>第3期最適化      | 59                                |
| 308  | ARC1622 | ARC979<br>第3期最適化      | 54                                |
| 309  | ARC1623 | ARC979<br>第3期最適化      | 45                                |
| 310  | ARC1624 | ARC979<br>第3期最適化      | 35                                |
| 311  | ARC1625 | ARC979<br>第3期最適化      | 31                                |

10

20

【0414】

【表31-2】

|     |         |                  |     |
|-----|---------|------------------|-----|
| 312 | ARC1626 | ARC979<br>第3期最適化 | 113 |
| 313 | ARC1755 | ARC979<br>第4期最適化 | 83  |
| 314 | ARC1756 | ARC979<br>第4期最適化 | 96  |

30

(実施例2D：アプタマー-5'-PEG結合体の合成)

抗IL-23アプタマーARC1623(配列番号309)およびARC1626(配列番号312)の5'-PEG結合体は、化学結合を促進するアプタマーの5'-アミン  
40  
改変バージョンをまず合成することによって調製した。

【0415】

## 【化 7 1】

5' NH<sub>2</sub>-

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-  
 dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T (ARC1987, 配列番号 315)および 5' NH<sub>2</sub>-  
 dAmC-s-dA-s-dG-s-dGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-  
 s-dGmU-s-dGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmU-s-dGmU-3T (ARC1989, 配列番号  
 316)

を、AKTA OligoPilot100 合成装置 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) において製造者の推奨する手順に従って標準的な市販の 2'-OMe RNA、DNA ホスホルアミダイト (Glen Research, Sterling, VA) および逆位デオキシチミジン CPG 支持体を使用して合成した。硫化試薬 (Glen Research, Sterling, VA) を使用し、標準的な手順に従ってホスホロチオエート結合を導入した。末端のアミン官能基を 5'-アミノ-改変因子 C6-TFA (Glen Research, Sterling, VA) と結合した。脱保護した後、そのオリゴヌクレオチドを、Super Q 5PW(30) 樹脂 (Tosoh Biosciences) によるイオン交換クロマトグラフィによって精製し、そしてエタノール沈殿した。

10

## 【0416】

20

5'-アミノ-改変アプタマーのアリコート、合成後に PEG 部分 (例えば、40 kDa PEG 部分) に結合体化した。アプタマーを水/DMSO (1:1) 溶液に 1.5~3 mM の濃度に溶解した。炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.5 を最終濃度 100 mM とするように加え、そして等容積のアセトニトリルに溶解された、1.7~3 倍の過剰なモル濃度の所望の PEG 試薬 (40 kDa Sunbright GL2-400 NP p-ニトロフェニル炭酸エステル [NOF Corp, Japan]) とそのオリゴを一晩反応させた。得られた 40 kDa PEG 化産物を Super Q 5PW(30) 樹脂 (Tosoh Biosciences) によるイオン交換クロマトグラフィによって精製し、Amberchrom CG300-S 樹脂 (Rohm and Haas) において行われる逆相クロマトグラフィを用いて脱塩し、そして凍結乾燥した。

30

## 【0417】

得られた 5'-PEG 化アプタマーの一般的な概略を図 26 に示す。得られた PEG 化アプタマー配列を以下に列挙する。小文字の「m」および「d」は、それぞれ 2'-O-メチルおよびデオキシ改変を示し、「s」は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート置換を示し、「NH」は、化学結合を促進するアミンを示し、そして「3T」は、3' 逆位 dT を示している。

## 【0418】

(ARC1988 の結合解析)

Biacore バイオセンサーシステムを用いて、IL-23 への ARC1988 (配列番号 317) の結合性を ARC1623 (配列番号 309) と比較して測定した。

40

## 【0419】

すべてのバイオセンサー結合測定を、研究等級の CM3 バイオセンサーチップ (BIACORE Inc. Piscataway, NJ) を装着した BIACORE 2000 を用いて 25 °C において行った。精製された組換えヒト IL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を、アミノ結合化学を用いてバイオセンサー表面に固定した。これを達成するために、0.1 M NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) と 0.4 M EDC (3-(N,N-ジメチルアミン)プロピル-N-エチルカルボジイミド) との 1:1 混合物を用いて、5 μl/分の流速で、2つの流動細胞の表面をまず 7 分間活性化した。表面活性化後に、一方の流動細胞を、50 μg/ml の IL-23 とともに 10 μl/分の速度で 15 分間注入することにより、活性化された表面への共有結合を確

50

立させた。次に、1 M 塩酸エタノールアミン pH 8.5 を、不活性な残留エステルに 5  $\mu$ l / 分の速度で 7 分間注入した。ネガティブコントロールとして、不活性な残留エステルにタンパク質注入なしで 1 M 塩酸エタノールアミン pH 8.5 を連続的に 7 分間注入することによって、空の流動細胞を調製した。

【0420】

IL-23 結合にむけて、アプタマーを HBS-P 緩衝液 (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、0.005% Surfactant 20) に連続希釈した。様々な濃度のアプタマー (1.6 nM ~ 100 nM の範囲) サンプルを、結合のために 20  $\mu$ l / 分の速度で連続的に 5 分間、一度に注入した後、5 分間注入しない時間を設けた。その後の濃度を試験するために、20  $\mu$ l / 分の速度で 30 秒間 1 N NaCl を注入することによって表面を再生した。BIAevaluation ソフトウェアを用いて速度定数および解離定数を計算した。両方の ARC1988 に対する解離定数 ( $K_D$ ) を、Biacore 法を用いて計算したところ、約 2 nM であったことから、PEG 化が、ARC1988 の結合親和性に対して影響を与えなかったことが示唆される。抗 IL-23 アプタマー ARC1623 および ARC1626 の 5' PEG 結合体

10

【0421】

【化72】

ARC1988 (配列番号 317) (ARC1623 + 40kDa PEG)  
PEG40K--nh-dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-  
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-3T

20

ARC1990 (配列番号 318) (ARC1626 + 40kDa PEG)  
PEG40K--nh-dAmC-s-dA-s-dG-s-dGmC-s-dA-s-dA-s-dGmU-s-dA-s-dAmUmU-s-dGmGmG-s-dG-s-dA-s-  
dGmU-s-dGmCmGmG-s-dGmC-s-dG-s-dGmGmGmU-s-dGmU-3T

(実施例 2 E : アプタマー - 3' - 5' - PEG 結合体の合成)

抗 IL-23 アプタマー ARC1623 (配列番号 309) の 5' - 3' - PEG 結合体を、化学結合を促進するアプタマーの 5' - アミン改変バージョンをまず合成することによって調製した。オリゴヌクレオチド

【0422】

【化73】

30

NH<sub>2</sub>-

dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-  
dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-NH<sub>2</sub> (ARC2349, 配列番号 319)

を、AKTA Oligopilot 100 合成装置 (GE Healthcare Uppsala, Sweden) において製造者の推奨する手順に従って標準的な市販の 2' - OMe RNA、DNA ホスホルアミダイト (Glen Research, Sterling, VA) および 3' - フタルイミド - アミノ - 改変因子 C6 CPG 支持体 (Glen Research, Sterling, VA) を使用して合成した。末端のアミン官能基を 5' - アミノ - 改変因子 C6 - TFA (Glen Research, Sterling, VA) と結合した。硫化試薬 (Glen Research, Sterling, VA) を使用し、標準的な手順に従ってホスホロチオエート結合を導入した。脱保護した後、そのオリゴヌクレオチドを、Super Q 5PW (30) 樹脂 (Tosoh Biosciences) によるイオン交換クロマトグラフィによって精製し、そしてエタノール沈殿した。

40

【0423】

3' - 5' - ジアミン - 改変アプタマーのアリコート、合成後に PEG 部分 (例えば、20 kDa 部分) に結合体化した。アプタマーを 1.5 ~ 3 mM の濃度に水 / DMSO (1 : 1) 溶液に溶解した。炭酸ナトリウム緩衝液, pH 8.5 を最終濃度 100 mM となるように加え、そしてそのオリゴを等容積のアセトニトリルに溶解された、2.7 ~ 3

50

・ 5 倍の過剰なモル濃度の所望の PEG 試薬 (例えば、20 kDa Sunbright MENP-20T p-ニトロフェニル炭酸エステル [NOF Corp, Japan]) と一晩反応させた。得られた 2 x 20 kDa PEG 化産物を Super Q 5PW (30) 樹脂 (Tosoh Biosciences) におけるイオン交換クロマトグラフィによって精製し、Amberchrom CG300-S 樹脂 (Rohm and Haas) において行われる逆相クロマトグラフィを用いて脱塩し、そして凍結乾燥した。

#### 【0424】

得られた 5' - PEG 化アプタマーの一般的な概略を図 27 に示す。得られた二 PEG 化アプタマー配列を以下に列挙する。小文字の「m」および「d」は、それぞれ 2-O-メチルおよびデオキシ改変を示し、「s」は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート置換を示し、「NH」は、化学結合を促進するアミンを示している。

抗 IL-23 アプタマー ARC1623 の 3' - 5' - PEG 結合体

#### 【0425】

#### 【化74】

ARC2350 (配列番号 320)

PEG20K--nh-dAmCdAdGdGmCdAdAdGmUdAdAmUmUdGmGmG-s-dG-s-dA-s-dGmU-s-dGmCmGmGdGmCdGdGmGmGmUdGmU-nh-PEG20K

(実施例 3 : 機能的細胞アッセイ)

(活性 rRfY IL-23 アプタマーの細胞ベースアッセイおよび最小化)

IL-23 は、JAK / STAT シグナル伝達に関与しており、STAT1、3、4 および 5 をリン酸化する。IL-23 アプタマーが、細胞ベース活性を示すか否かを試験するために、PHA (フィトヘマグルチニン) を含む培養液中で生育された末梢血単核球 (PBMC)、すなわち PHA Blast の溶解産物においてシグナル伝達をアッセイした。より詳細には、細胞ベースアッセイは、IL-23 アプタマーが、PHA Blast 中で IL-23 誘導性 STAT-3 リン酸化を阻害することができるか否かを判定するものであった。

#### 【0426】

本質的には、IL-23 処理細胞の溶解産物は、静止状態の細胞またはアプタマーで阻止された細胞よりも活性化された STAT3 を含み得る。IL-23 誘導性 STAT3 リン酸化の阻害は、2つの方法：抗リン酸化型 STAT3 抗体 (Tyr705) (Cell Signaling, Beverly, MA) を用いたウエスタンブロット；および TransAM<sup>TM</sup> アッセイ (Active Motif, Carlsbad, CA) によって測定された。TransAM<sup>TM</sup> アッセイキットは、STAT コンセンサス結合部位 (5' TTC CCG GA A - 3') を含むオリゴヌクレオチドが固定された 96 ウェルプレートを用意する。STAT3 が活性化されているときだけ到達可能な STAT3 上のエピトープを認識する抗 STAT3 抗体は、HRP-結合体化 2 次抗体と組み合わせて使用することにより、分光測定によって定量可能な比色結果をもたらす (図 19 を参照のこと)。

#### 【0427】

まとめれば、Histopaque 勾配 (Sigma, St. Louis, MO) を用いて全血から末梢血単核球 (PBMC) を単離することによって細胞ベースアッセイを行った。PHA を含み、IL-2 (100 単位 / mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN) が補充された Peripheral Blood Medium (Sigma) 中で 3 ~ 5 日間、37 / 5% CO<sub>2</sub> で PBMC を培養することにより、PHA Blast がもたらされた。IL-23 アプタマーを試験するために、その PHA Blast を 1 x PBS で 2 回洗浄し、次いで、RPMI、0.20% FBS 中で 4 時間、血清欠乏にした。血清欠乏後、約 200 万細胞を、適切に標識されたエプンドルフチューブに等分した。3 ng / mL という一定の最終濃度の hIL-23 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を、実施例 1 に記載したような様々な

10

20

30

40

50

IL-23 アプタマーの希釈系列と混合し、サイトカイン/アプタマー混合物を、等分された細胞に最終容積 100  $\mu$ l で加え、37 °C で 10 ~ 12 分間インキュベートした。このインキュベーション反応を、1 mL の 1.5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  を含んだ氷冷 PBS を加えることによって停止した。製造者の指示書に従って TransAM<sup>TM</sup> STAT3 アッセイによってもたらされる溶解緩衝液を用いて、細胞溶解産物を作製した。図 20 には、細胞ベースアッセイに使用したプロトコールの流れのまとめを示している。

【0428】

2'-Fピリミジン含有プール (rRfY)、リボノ 2'-O-Me 含有プール (rRmY)、デオキシノ 2'-O-Me 含有プール (dRmY) および最適化された dRmY アプタマーを用いた様々なセレクション由来の親アプタマーおよび最小化 IL-23 アプタマーを、TransAM<sup>TM</sup> 法を用いて試験した。

10

【0429】

(実施例 3A : rRfY セレクション由来の親クローンおよび最小化クローンについての細胞ベースアッセイ結果)

実施例 1A に記載した rRfY セレクション由来の完全長クローンおよび実施例 2A . 1 に記載した、選ばれた最小化 rRfY クローンを、TransAM<sup>TM</sup> STAT3 活性化アッセイを用いて試験した。実施例 1A に記載した rRfY セレクションから得られた IL-23 完全長アプタマーについての細胞ベースアッセイのデータを表 34 にまとめている。実施例 2A . 1 に記載した rRfY 最小化クローンの活性データをそれぞれの親 (完全長) クローンの活性と比較して表 35 にまとめている。最小化 rRfY クローン F1 1 min 2 (配列番号 147)、A 10 min 5 (配列番号 139)、A 10 min 6 (配列番号 140)、B 10 min 4 (配列番号 144)、B 10 min 5 (配列番号 145)、タイプ 1.4 (配列番号 151) およびタイプ 1.5 (配列番号 152) 各々は、TransAM<sup>TM</sup> STAT3 活性化アッセイにおいて試験したとき、完全長 rRfY クローンのすべてに加えてそれぞれの親クローン (図 21 を参照のこと) よりも優れていた。

20

表 34 : 細胞ベースアッセイ結果 : 試験した rRfY クローンのまとめ

【0430】

【表 3 4 - 1】

| 配列番号 | クローン名         | セレクション       | ウエスタンブロッ<br>ト | TransAM | TransAM IC <sub>50</sub> |
|------|---------------|--------------|---------------|---------|--------------------------|
| 27   | AMX86-<br>C5  | R8 h-IL-23   | あり            | あり      | 3 μM                     |
| 13   | AMX86-<br>D5  | R8 h-IL-23   | あり            | あり      | > 5 μM                   |
| 16   | AMX86-<br>D6  | R8 h-IL-23   | あり            | あり      | > 5 μM                   |
| 24   | AMX86-<br>E6  | R8 h-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 22   | AMX86-<br>F6  | R8 h-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 18   | AMX86-<br>A7  | R8 h-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 25   | AMX86-<br>H7  | R8 h-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 35   | AMX86-<br>B9  | R8 X-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 32   | AMX86-<br>C9  | R8 X-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 33   | AMX86-<br>G9  | R8 X-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 39   | AMX86-<br>H9  | R8 X-IL-23   | あり            | あり      | 250 nM                   |
| 28   | AMX86-<br>B10 | R8 X-IL-23   | あり            | あり      | 800 nM                   |
| 36   | AMX86-<br>G10 | R8 X-IL-23   | あり            | あり      | ~2 μM                    |
| 37   | AMX86-<br>A11 | R8 X-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 30   | AMX86-<br>D11 | R8 X-IL-23   | あり            | なし      |                          |
| 43   | AMX84-<br>A10 | R10 PN-IL-23 | あり            | あり      | 400 nM                   |
| 44   | AMX84-<br>B10 | R10 PN-IL-23 | あり            | あり      | > 1 μM                   |
| 45   | AMX84-<br>A11 | R10 PN-IL-23 | あり            | あり      | > 5 μM                   |

10

20

30

40

【 0 4 3 1 】

【表 3 4 - 2】

|    |                 |              |    |    |             |    |
|----|-----------------|--------------|----|----|-------------|----|
| 46 | AMX84-F11       | R10 PN-IL-23 | あり | あり | 250 nM      |    |
| 47 | AMX84-E12       | R10 PN-IL-23 | あり | あり | > 1 $\mu$ M |    |
| 48 | AMX84-C10       | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 250 nM      |    |
| 49 | AMX84-C11       | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 800 nM      | 10 |
| 50 | AMX84-G11       | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 250 nM      |    |
| 51 | ARX83-plate1-H1 | R12 PN-IL23  | なし | あり | > 5 $\mu$ M |    |
| 52 | AMX91-F11       | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 5 $\mu$ M   |    |
| 53 | AMX91-G1        | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 2 $\mu$ M   |    |
| 54 | AMX91-E3        | R10 PN-IL-23 | なし | あり | > 5 $\mu$ M | 20 |
| 55 | AMX91-H3        | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 50 nM       |    |
| 64 | AMX91-G11       | R12 PN-IL23  | なし | あり | 3 $\mu$ M   |    |
| 65 | AMX91-C12       | R12 PN-IL23  | なし | あり | 50 nM       |    |
| 66 | AMX91-H12       | R12 PN-IL23  | なし | あり | 350 nM      |    |
| 56 | AMX91-B5        | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 1 $\mu$ M   | 30 |
| 57 | AMX91-A6        | R10 PN-IL-23 | なし | あり | 3 $\mu$ M   |    |
| 58 | AMX91-G7        | R12 PN-IL23  | なし | あり | 150 nM      |    |
| 59 | AMX91-H7        | R12 PN-IL23  | なし | あり | 50 nM       |    |
| 60 | AMX91-B8        | R12 PN-IL23  | なし | あり | 450 nM      |    |
| 61 | AMX91-H8        | R12 PN-IL23  | なし | あり | 3 $\mu$ M   | 40 |
| 62 | AMX91-          | R12 PN-IL23  | なし | あり | 50 nM       |    |

【 0 4 3 2 】

【表 3 4 - 3】

|    |          |             |    |    |        |
|----|----------|-------------|----|----|--------|
|    | G9       |             |    |    |        |
| 63 | AMX91-D9 | R12 PN-IL23 | なし | あり | 150 nM |

の結合性

【 0 4 3 3 】

【 表 3 5 】

| 配列番号 | クローン名   | セレクション       | ウェスタンブロット | TransAM | 最小化物の IC <sub>50</sub> | 完全長の IC <sub>50</sub> |
|------|---------|--------------|-----------|---------|------------------------|-----------------------|
| 147  | F11min2 | R10 PN-IL-23 | なし        | あり      | 25 nM                  | 250 nM                |
| 139  | A10min5 | R10 PN-IL-23 | なし        | あり      | 300 nM                 | 1 μM                  |
| 140  | A10min6 | R10 PN-IL-23 | なし        | あり      | 250 nM                 | 1 μM                  |
| 144  | B10min4 | R10 PN-IL-23 | なし        | あり      | 500 nM                 | 700 nM                |
| 145  | B10min5 | R10 PN-IL-23 | なし        | あり      | 80 nM                  | 700 nM                |
| 151  | タイプ 1.4 | N/A          | なし        | あり      | 80 nM                  | N/A                   |
| 152  | タイプ 1.5 | N/A          | なし        | あり      | 80 nM                  | N/A                   |

10

( 実施例 3 B : 第 1 d R m Y セレクション由来の親クローンおよび最小化クローンに対する細胞ベースアッセイの結果 )

20

実施例 1 C に記載した d R m Y セレクションからの親クローンおよびこのセレクション ( 実施例 2 A . 2 に記載 ) 由来の最小化 d R m Y クローンを、TransAM<sup>T M</sup>STAT3 活性化アッセイを用いて活性について試験した。実施例 1 C に記載した、IL - 23 に対して最も高い結合親和性を示した 3 つの完全長 d R m Y クローンである ARC 4 8 9 ( 配列番号 9 1 )、ARC 4 9 0 ( 配列番号 9 2 )、ARC 4 9 1 ( 配列番号 9 4 ) を試験した。IL - 23 に結合しないことを示した ARC 4 9 2 ( 配列番号 9 7 ) をネガティブコントロールとして使用した。ARC 4 8 9 ( 配列番号 9 1 ) および ARC 4 9 1 ( 配列番号 9 4 ) は、TransAM<sup>T M</sup>STAT3 活性化アッセイにおいて類似の細胞ベース活性を示し、予備データは、50 nM ~ 500 nM 範囲の IC<sub>50</sub> を示している ( データ示さず )。

30

【 0 4 3 4 】

IL - 23 に結合することが示され、実施例 2 A . 2 に記載された d R m Y 最小化の試みからの唯一の最小化クローンである ARC 5 2 7 ( 配列番号 1 5 9 ) を、TransAM<sup>T M</sup>STAT3 活性化アッセイにおいて試験し、そのそれぞれの完全長 ARC 4 8 9 ( 配列番号 9 1 ) と比較してアッセイ活性の低下が示された ( データ示さず )。

【 0 4 3 5 】

( 実施例 3 C : 第 2 d R m Y セレクション由来の親クローンおよび最小化クローンについての細胞ベースアッセイの結果 )

実施例 1 D に記載された d R m Y セレクションからの親クローンおよび h I L - 2 3 に対して高い親和性を示したこのセレクション ( 実施例 2 A . 3 に記載 ) 由来の最小化クローンを、3 ng / mL という一定の IL - 2 3 濃度と組み合わせた 0 ~ 3 μ M、3 倍希釈の 8 点 IL - 2 3 力価測定を用いて、TransAM<sup>T M</sup>アッセイにおいて機能性についてスクリーニングした。完全長クローンについての IC<sub>50</sub> を用量反応曲線から算出した。図 2 2 は、TransAM<sup>T M</sup>アッセイにおいて強力な細胞ベース活性を示した、実施例 1 D に記載されたセレクション由来の d R m Y クローン ( ARC 6 1 1 ( 配列番号 1 0 3 )、ARC 6 1 4 ( 配列番号 1 0 5 )、ARC 6 2 1 ( 配列番号 1 0 8 ) および ARC 6 2 7 ( 配列番号 1 1 0 ) ) についての用量反応曲線の例である。

40

【 0 4 3 6 】

最小化 d R m Y クローン ( 実施例 2 A . 3 に記載 ) を機能性についてスクリーニングし

50

、そしてTransAM<sup>TM</sup>アッセイにおいてそれぞれの親クローンと比較した。IC<sub>50</sub>を用量反応曲線から算出した。図23は、親完全長クローンであるARC621（配列番号108）およびARC627（配列番号110）と比較したときの、いくつかのより強力な最小化dRmYクローンであるARC979（配列番号177）、ARC980（配列番号178）、ARC982（配列番号180）についての用量反応曲線の例である。3つの実験にわたって平均したとき、ARC979（配列番号177）は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおいて一貫して最良の結果（40nM+/-10nMのIC<sub>50</sub>）を示した。ARC792（配列番号162）、ARC794（配列番号164）、ARC795（配列番号165）は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおいても強力な活性を示した。

10

#### 【0437】

（実施例3D：最適化されたARC979誘導体についての細胞ベースアッセイの結果）

hIL-23に対して高い親和性を示した、実施例2B.2に記載の最適化されたARC979誘導体のいくつかを、IL-23誘導性STAT3活性化を阻害する能力について、先に記載したPHA Blastアッセイを用いてスクリーニングした。Pathscan（登録商標）Phospho-STAT3（Tyr705）Sandwich ELISA Kit（Cell Signaling Technology, Beverly, MA）を用いてIL-23誘導性STAT3リン酸化の阻害を測定した。

20

#### 【0438】

先に記載したTransAM<sup>TM</sup>アッセイ方法と同様に、Pathscan（登録商標）Phospho-STAT3（Tyr705）Sandwich ELISA Kitは、96ウェルプレートのウェル上にコーティングされているSTAT3ウサギモノクローナル抗体を使用することによって内在性レベルのPhospho-STAT3（Tyr705）タンパク質を検出する。細胞溶解産物とのインキュベーションの後、非リン酸型とリン酸型のSTAT3タンパク質との両方をコーティングされた抗体によって捕捉する。リン酸型STAT3マウスモノクローナル抗体を加えることにより、捕捉されたリン酸型STAT3タンパク質を検出し、次いで、HRP-連結抗マウス抗体を用いて、結合した検出抗体を認識する。HRP基質であるTMBを加えることによって発色させる。この発色についての光学密度の規模は、リン酸型STAT3タンパク質の量に比例する。

30

#### 【0439】

PHA Blastを単離し、上に記載したように調製し、そして、先に記載したようにTransAM<sup>TM</sup>アッセイで3ng/mLを使用する代わりに最終一定濃度6ng/mL（R&D Systems, Minneapolis, MN）においてhIL-23で処理することにより、STAT3活性化を誘導した。STAT3活性化を誘導するために、先に記載したようにTransAM<sup>TM</sup>アッセイで3ng/mLを使用する代わりにIL-23（R&D Systems, Minneapolis, MN）の6ng/mLという一定のIL-23濃度と組み合わせ、0~700nM、3倍希釈の6点IL-23力価測定を用いることによってクローンをスクリーニングした。処理細胞の溶解産物を、Pathscanキットに備えられていた緩衝液を用いて調製し、そして製造者の指示書に従ってアッセイを行った。完全長クローンについてのIC<sub>50</sub>を用量反応曲線から算出した。

40

#### 【0440】

TransAM<sup>TM</sup>法を用いたとき40+/-10nMというIC<sub>50</sub>を示したARC979は、Pathscan（登録商標）法を用いたとき6+/-1nMというIC<sub>50</sub>を一貫して示した。先に述べたように、このIC<sub>50</sub>値は、ARC979についての1nMというK<sub>D</sub>値と一致し、この値は、実施例2B.2に記載の直接結合アッセイ条件下で繰り返し確認された。表36からわかるように、ARC979の最適化された誘導体のいくつかは、Pathscan（登録商標）法を用いて直接比較したとき、ARC979よりもさらに高い効力を著しく示し、特に、ARC1624およびARC1625は、それ

50

ぞれ 2 nM および 4 nM という  $IC_{50}$  値を示した。

【0441】

図 24 は、IL-23 に対して高い親和性および Pathscan (登録商標) アッセイにおいて強力な細胞ベース活性を示した最適化クローンのいくつかについての用量反応曲線の例である。表 36 には、試験した最適化アプタマーについての用量反応曲線から得られた  $IC_{50}$  をまとめた。

表 36 : Pathscan (登録商標) アッセイにおける最適化 ARC 979 誘導体についての  $IC_{50}$

【0442】

【表 36】

| 配列番号 | クローン | Pathscan <sup>®</sup> $IC_{50}$<br>(nM) |
|------|------|-----------------------------------------|
| 177  | 979  | 6 +/- 1                                 |
| 275  | 1544 | —                                       |
| 308  | 1622 | 9                                       |
| 309  | 1623 | 5                                       |
| 310  | 1624 | 2                                       |
| 311  | 1625 | 4                                       |
| 312  | 1626 | 12                                      |
| 313  | 1755 | 68                                      |
| 314  | 1756 | 19                                      |

(実施例 3E : PEG 化抗 IL-23 アプタマー ARC 1988 Pathscan (登録商標) についての細胞ベースアッセイの結果)

5' - PEG 化アプタマーである ARC 1988 (5' 末端に結合体化された 40 kDa PEG を有する ARC 1623) (配列番号 317) を非 PEG 化対応物である ARC 1623 (配列番号 309) と同時に上の実施例 3D に記載した Pathscan アッセイにおいて試験した。図 28 からわかるように、ARC 1988 は、Pathscan アッセイにおいて非 PEG 化の ARC 1623 と比較してより強力であった。

【0443】

(マウス脾細胞による IL-17 生成)

ARC 1988 (配列番号 317) を ARC 1623 (配列番号 309) と同時に、アプタマーがマウス脾細胞による IL-23 / IL-2 誘導性 IL-17 生成を阻害する能力を測定するように設定されたエキソピボ脾細胞アッセイにおいても試験した。脾細胞は、以下のように調製した。2匹の CD-2 雌マウス (6 ~ 8 週齢) (Charles River Labs, Wilmington, MA) から脾臓を (安楽死後に) 取り出し、中型のペトリ皿に移した。脾臓をすりつぶすために先端が平坦な 3 mL 注射器を用いて細胞を脾臓から分離した。分離後、細胞を回収し、50 mL チューブに移し、そして 1200 rpm で遠心することにより、細胞を沈殿させた。遠心分離後、沈殿した細胞を 5 mL の溶解緩衝液 (Biosource, Camarillo, CA, cat # p304 -

10

20

30

40

50

100) に再懸濁し、そして室温で5分間インキュベートして赤血球を溶解した。溶解した後、RPMI Medium 1640 (Gibco (Invitrogen), Carlsbad, CA cat # 07599) を用いて細胞を最終容積50 mLにし、1200 rpmで5分間遠心することにより、細胞を沈殿させた。沈殿、溶解した細胞を10 mLのRPMI 1640に再懸濁した。次いで、溶解した細胞を計数し、96ウェルMicrotest Tissue Cultureプレート (Falcon (BD Biosciences, San Jose, CA), cat # 353072) 中、最終容積50  $\mu$ L 1に $4 \times 10^5$ 細胞/ウェル (well) の密度で蒔いた。

#### 【0444】

IL-23およびIL-2を、マウス脾細胞によるIL-17生成を誘発するために使用し、ヒトIL-12 (p40) 抗体 (Pharmigen (BD Biosciences, San Jose, CA) cat # 554659) およびマウスIgG (Pharmigen cat # 554721) を、ARC1988アプタマー用のポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして使用した。50  $\mu$ LのIL-2 (20,000 U/mL) およびIL-23 (200 ng/mL) を、それぞれ最終濃度5000 U/mL、50 ng/mLとなるように各ウェルに加えた。50  $\mu$ Lのアプタマー (4  $\mu$ M) またはコントロール抗体 (800 ng/mL) のいずれかを、それぞれ最終濃度1  $\mu$ Mおよび200 ng/mLとなるように適切なウェルに加えた。最終容積が200  $\mu$ L/ウェルになるまでRPMI-1640を各ウェルに加えた。蒔いて処理されたこれらの細胞を37°Cで24時間インキュベートし、次いで、後の定量のために-20°Cで凍結するか、またはすぐに定量した。IL-17生成をELISA (Quantikine Murine IL-17キット cat. # M1700, R&D Systems, Minneapolis, MN) によって製造者の推奨プロトコールに従って定量した。

#### 【0445】

図29からわかるように、ARC1988 (40 kDa PEG) は、マウス脾細胞において用量依存的様式でIL-23誘導性IL-17生成を阻害した (IC<sub>50</sub>は27 nMと算出された) のに対し、ARC1623 (無PEG) は、マウス脾細胞においてIL-23誘導性IL-17生成に影響を及ぼさなかった。この結果は、すぐ上に記載したPathscanアッセイにおけるARC1623と比較したとき、ARC1988で見られたようなPEG結合体化によってもたらされる活性の増大と一致する。

#### 【0446】

(PHA BlastによるIL-12およびIL-23依存性インターフェロンガンマ生成)

ARC1988 (配列番号317) を、PHA Blastにおいて抗IL-23アプタマーがIL-12/IL-18またはIL-23/IL-18依存性IFN- $\gamma$ 生成を阻害する能力について設定されたアッセイにおいても試験した。

#### 【0447】

PHA Blastを単離し、上に記載したように調製した。PHA Blastを単離したら、使用する前に4日間培養した (使用の前夜に再供給しない)。4日間培養した後、適切な数の細胞 (0.5  $\times 10^6$ 細胞/ウェルで十分) を回収し、遠心分離によって沈殿させ、そしてRPMI 1640および2% FBSで洗浄した (2回繰り返す)。次いで、それぞれ25 mLのRPMI 1640 - 2% FBSが入った2枚の150 mM滅菌培養皿に2~3時間置き換えることによってこれらの細胞を血清欠乏にした。血清欠乏後、細胞を、0.5  $\times 10^6$ 細胞/200  $\mu$ L血清欠乏培地の密度で96ウェルマイクロタイタープレートに蒔いた。

#### 【0448】

IL-12/IL-18またはIL-23/IL-18を用いて、PHA BlastにおいてIFN- $\gamma$ 生成を以下のように誘発した。60 ng/mLという濃度の10  $\mu$ LのIL-23 (R&D Systems) (または20 ng/mLという濃度の10  $\mu$ LのIL-12) および200 ng/mLという濃度の10  $\mu$ LのIL-18 (MBL) を

適切なウェルに加えた。ARC1988の10点連続希釈(1:3希釈、0~60 μM)を血清欠乏培地中に調製し、各濃度の10 μlを適切なウェルに加えた。蒔いた細胞の各ウェルの最終容積は、230 μlであり、各々以下の最終濃度を含んでいた: 約3 ng/mLのIL-23(または約1 ng/mLのIL-12); 約1 ng/mLのIL-18; 約0~3 μMのARC1988力価測定。ヒトIL-12(p40)抗体(Pharmingen(BD Biosciences, San Jose, CA) cat#554659)およびマウスIgG抗体(Pharmingen(BD Biosciences, San Jose, CA) cat#554721)をポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして使用した。すべての点において2つ組で試験した。PHA Blastを37で24時間処理しながらインキュベートした。インキュベーション後、200 μlの上清を各ウェルから取り出し、-80で急凍するか、またはすぐにIFN-について定量した。ELISAキットを用いて、製造者の推奨プロトコールに従ってPHA BlastにおけるIL-23/IL-18およびIL-12/IL-18誘導性IFN-を定量した(Recombinant human IFN- Quantikine kit, R&D Systems, Minneapolis, MN)。96ウェルプレートリーダーを用いて比色結果を定量し、そして吸光度値をグラフにした。図30は、ARC1988が、用量依存的様式でIL-23/IL-18とIL-12/IL-18誘導性IFN-生成の両方を阻害する(IC<sub>50</sub>はそれぞれ約4 nMおよび約122 nMと算出される)ことを示しており、このことから、ARC1988が予想されたようにIL-12よりもIL-23に対してより特異的であることが示唆される。

10

20

【0449】

(実施例3G:マウスIL-23セレクション由来の親クローンおよび最小化クローンについての細胞ベースアッセイの結果)

上に記載したPHA BlastアッセイおよびTransAM<sup>TM</sup>法を用いて、マウスIL-23が、ヒトPHA blastにおいてSTAT3を活性化することが示された(図25を参照のこと)。それゆえ、実施例1Eに記載のマウスIL-23セレクション由来の親クローンおよびmIL-23への親和性を示したこのセレクション(実施例2A.4に記載)由来の最小化クローンがヒトPHA blast細胞においてマウスIL-23誘導性STAT3活性化を阻止する能力を、TransAM<sup>TM</sup>アッセイを用いて測定した。使用したプロトコールは、3 ng/mLという濃度でヒトIL-23を使用する代わりに30 ng/mLという濃度でマウスIL-23を用いてPHA BlastにおいてSTAT3活性化を誘導したこと以外は、先に記載したプロトコールと同一であった。親クローンについての結果を表37に列挙し、最小化クローンについての結果を以下の表38に列挙する。

30

表37: TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおける親mIL-23-rRfYクローン活性

【0450】

【表37】

| 配列番号 | クローン名   | セレクション     | IC <sub>50</sub> (nM) |
|------|---------|------------|-----------------------|
| 124  | ARC1628 | R7 mIL-23  | 37                    |
| 125  | ARC1629 | R7 mIL-23  | 試験せず                  |
| 126  | ARC1630 | R7 mIL-23S | 16.6*                 |
| 127  | ARC1631 | R7 mIL-23S | 試験せず                  |
| 128  | ARC1632 | R7 mIL-23S | 18                    |
| 129  | ARC1633 | R7 mIL-23S | 31                    |
| 130  | ARC1634 | R7 mIL-23S | 9                     |

40

\* 複数の実験結果の平均。

表38: TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおけるマウスIL-23 rRfY最小化クロー

50

ン活性

【 0 4 5 1 】

【 表 3 8 】

| 最小化クローン<br>配列番号 | 親クローン   | IC <sub>50</sub> mL-23<br>(nM) |
|-----------------|---------|--------------------------------|
| 199             | ARC1628 | 18 nM                          |
| 200             | ARC1632 | 不活性                            |
| 201             | ARC1633 | 7                              |
| 202             | ARC1634 | 26                             |

10

記述された説明および実施例によって本発明を説明してきたが、本発明が種々の実施形態において実施され得ることおよび上記の説明および実施例が例示目的であり、以下の特許請求の範囲を制限するものではないことを当業者は認識するであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 4 5 2 】

【 図 1 】 図 1 は、サイトカインのインターロイキン - 1 2 ファミリーの略図である。

【 図 2 】 図 2 は、ランダム配列オリゴヌクレオチドのプールからのインビトロアプタマーセレクション ( S E L E X <sup>T M</sup> ) プロセスの略図である。

20

【 図 3 】 図 3 は、ネガティブセレクション工程に I L - 1 2 を含めることによって I L - 2 3 に特異的なアプタマーを選別し、それによって、I L - 1 2 と I L - 2 3 の両方に共通のサブユニットである p 4 0 を認識する配列を排除するためのインビトロセレクションスキームの概略図である。

【 図 4 】 図 4 は、4 0 k D a 分枝状 P E G の図である。

【 図 5 】 図 5 は、アプタマーの 5 ' 末端に結合した 4 0 k D a 分枝状 P E G の図である。

【 図 6 】 図 6 は、標準的な - P E G 化、多 P E G 化および P E G 化を介したダイマー形成を表している様々な P E G 化ストラテジーを示している図である。

【 図 7 】 図 7 は、様々な回数のセレクションを行った後の、I L - 2 3 への r R m Y および r G m H プールの結合を示しているグラフである。

30

【 図 8 A 】 図 8 A は、タイプ 1 I L - 2 3 アプタマーの配列および予測される二次構造配置の代表的な概略図である。

【 図 8 B 】 図 8 B は、いくつかのタイプ 2 I L - 2 3 アプタマーの配列および予測される二次構造配置の代表的な概略図である。

【 図 9 A 】 図 9 A は、タイプ 1 I L - 2 3 アプタマーの最小化されたアプタマー配列および予測される二次構造配置の概略図である。

【 図 9 B 】 図 9 B は、タイプ 2 I L - 2 3 アプタマーの最小化されたアプタマー配列および予測される二次構造配置の概略図である。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、d R m Y 最小化物 A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) の予測される G - 四量体構造を示している。

40

【 図 1 1 】 図 1 1 は、A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) における N M M 蛍光の増加を示しているグラフであり、A R C 9 7 9 が G - 四量体構造をとることを裏付けている。

【 図 1 2 】 図 1 2 は、5 0 n M の I L - 2 3 を用いて結合した総 [ アプタマー ] に基づいて解析された A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) 競合結合曲線のグラフである。

【 図 1 3 】 図 1 3 は、2 5 0 n M の I L - 1 2 を用いて結合した [ アプタマー ] に基づいて解析された A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) 競合結合曲線のグラフである。

【 図 1 4 】 図 1 4 は、2 つの異なる結合反応条件下 ( 1 x P B S ( C a <sup>++</sup> または M g <sup>++</sup> を含まない ) または 1 x D u l b e c c o s P B S ( C a <sup>++</sup> および M g <sup>++</sup> を含む ) ) における A R C 9 7 9 ( 配列番号 1 7 7 ) についての直接結合曲線のグラフである。

50

【図15】図15は、ARC979（配列番号177）ホスホロチオエート誘導体についての直接結合曲線のグラフであり、単一ホスホロチオエート置換が、IL-23への結合の割合の増大をもたらすことを示している。

【図16】図16は、ARC979（配列番号177）ホスホロチオエート誘導体についての競合結合曲線のグラフであり、ARC979において単一ホスホロチオエート置換が、IL-23に対してより高い親和性で競合することを示している。

【図17】図17は、親ARC979（配列番号177）アプタマーと比較した、ARC979最適化誘導体であるARC1624（配列番号310）およびARC1625（配列番号311）についての直接結合曲線のグラフである（ARC895はネガティブコントロールである）。

【図18】図18は、最適化ARC979誘導体構築物と比較した、ARC979（配列番号177）の血漿安定性を示しているグラフである。

【図19】図19は、本発明のアプタマーに曝露されたPHA blast細胞の溶解産物中のSTAT3活性を測定するために使用したTransAM<sup>TM</sup>アッセイの略図である。

【図20】図20は、本発明のアプタマーに曝露されたPHA blastにおけるIL-23誘導性STAT3リン酸化の検出に使用したプロトコールのフローチャートである。

【図21】図21は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイを用いてPHA BlastにおけるIL-23誘導性STAT3リン酸化に対するrRfY組成の親IL-23アプタマーの阻害効果をそれぞれの最適化クローンと比較して示している代表的なグラフである。

【図22】図22は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおけるdRmY組成のIL-23アプタマーによるIL-23誘導性STAT3リン酸化のパーセント阻害のグラフである（ARC793（配列番号163）は非結合アプタマーである）。

【図23】図23は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイにおいて、最適化クローン（ARC979（配列番号177）、ARC980（配列番号178）、ARC982（配列番号180））と比較した、dRmY組成のそれぞれの親IL-23アプタマー（ARC621（配列番号108）、ARC627（配列番号110））によるIL-23誘導性STAT3リン酸化のパーセント阻害のグラフである。

【図24】図24は、Pathscan（登録商標）アッセイにおける、ARC979（配列番号177）およびARC979の2つの最適化誘導体クローン（ARC1624（配列番号310）およびARC1625（配列番号311））によるIL-23誘導性STAT3リン酸化のパーセント阻害グラフである。

【図25】図25は、TransAM<sup>TM</sup>アッセイによって測定された、ヒトPHA BlastにおいてヒトとマウスのIL-23誘導性STAT3活性化を比較しているグラフである。

【図26】図26Aは、抗IL-23アプタマーの1つのPEG化ストラテジーの概略図であり、ここで、40kDa分枝状PEGは、リンカーを介してアプタマーの5'末端に結合体化されている。図26Bは、6個連続したCH<sub>2</sub>基を含んでいるアルキルリンカーを介して5'末端に結合体化された40kDa分枝状PEGを有する抗IL-23アプタマーの概略図である。

【図27A】図27Aは、抗IL-23アプタマーに対する1つのPEG化ストラテジーの概略図であり、ここで、20kDa PEGは、リンカーを介してアプタマーの5'末端と3'末端の両方に結合体化されている。

【図27B】図27Bは、6個連続したCH<sub>2</sub>基を含んでいるアルキルリンカーを介してアプタマーの5'末端と3'末端の両方に結合体化された20kDa PEGを有する抗IL-23アプタマーの概略図である。

【図28】図28は、Pathscan（登録商標）アッセイにおいてARC1623（配列番号309）と比較したときのARC1988（配列番号317）によるIL-23誘導性STAT3リン酸化のパーセント阻害のグラフである。「コントロール」は、アッ

10

20

30

40

50

セイにおいてネガティブコントロールとして使用した非特異的で無関係のアプタマーである。

【図29】図29は、抗IL-23アプタマーであるARC1623（配列番号317）、ARC1623（配列番号309）による、マウス脾細胞におけるIL-23/IL-2誘導性IL-17生成の阻害を比較している棒グラフである。X軸上の「マイナスIL-23」との表示は、コントロール、すなわち、IL-23なし（IL-2のみ）で処理されたマウス脾細胞を示し、X軸上の「プラスIL-23」との表示は、コントロール、すなわち、IL-2およびIL-23単独で処理されたマウス脾細胞を示し、凡例中の「p40 Mab」との表示は、IL-23/IL-2を用いて誘導されるマウス脾細胞を処理するために使用し、アプタマーに対するポジティブコントロールとして使用したヒトp40抗体を示し、凡例中の「irr ab」は、ヒトp40抗体に対してネガティブコントロールとして使用した無関係の抗体を示し、またそれは、X軸上の「Abコントロール」との表示に対応し、そして凡例中の「irr apt」は、抗IL-23アプタマーに対してネガティブコントロールとして使用した非特異的アプタマーを示す。

10

【図30】図30は、PHA Blastにおける、IL-23/IL-18およびIL-12/IL-18誘導性インターフェロン-ガンマ生成の抗IL-23アプタマーARC1988（配列番号317）によるパーセント阻害を比較しているグラフである。

【図1】

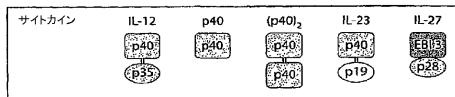


Fig. 1

【図3】

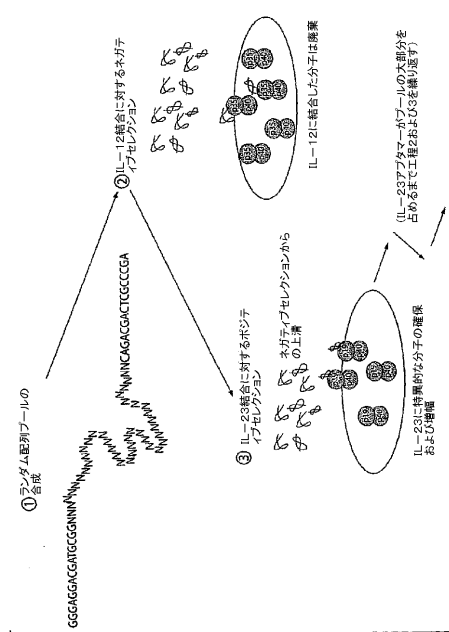


Fig. 3

【図2】

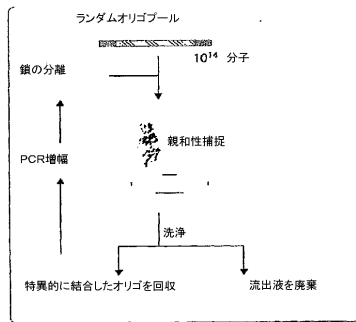


Fig. 2

【図4】

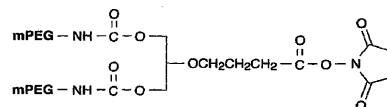


Fig. 4

【 図 5 】

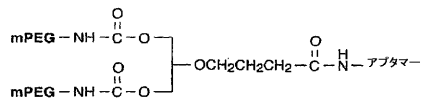


Fig.5

【 図 6 】

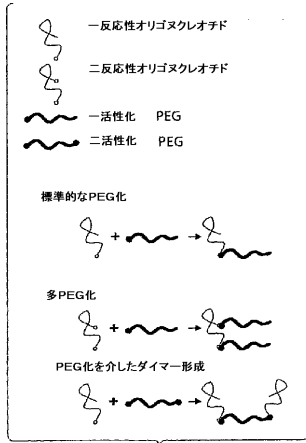


Fig.6

【 図 7 】

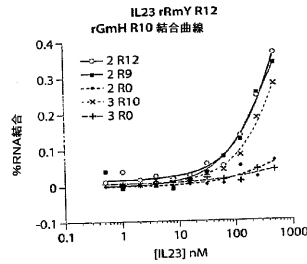


Fig.7

【 図 8 A 】

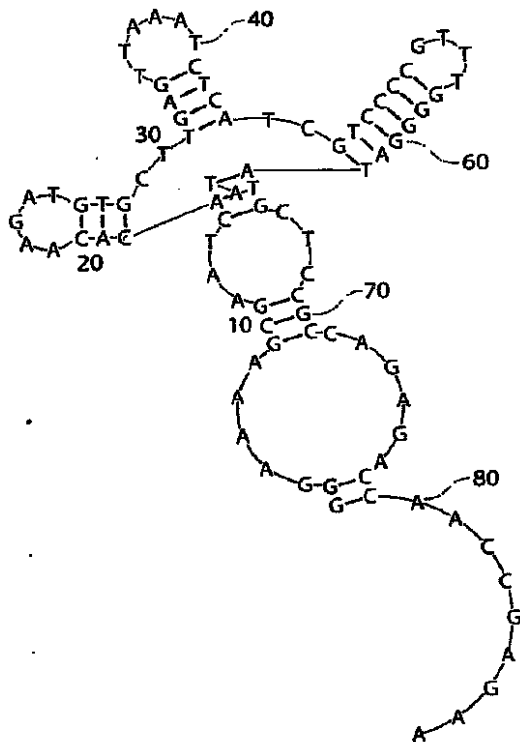


Fig. 8A

【 図 8 B 】

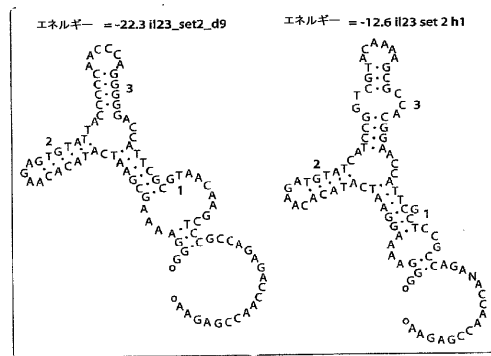


Fig. 8B

【 図 9 A 】

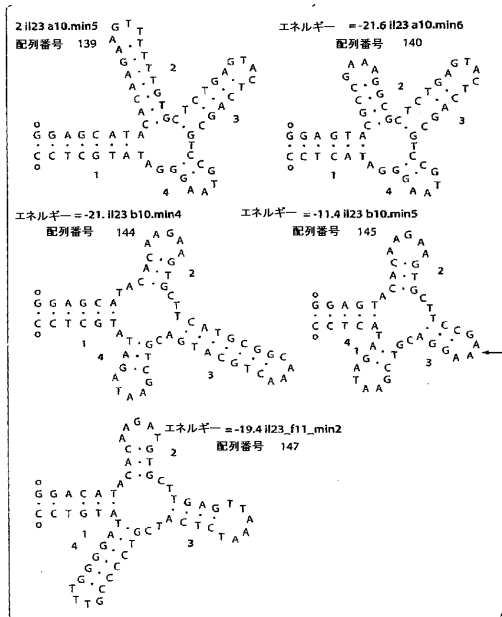


Fig. 9A

【 図 9 B 】

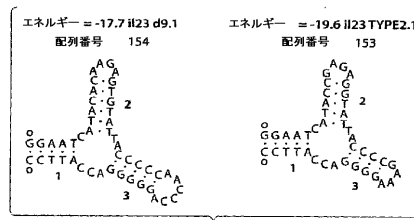


Fig. 9B

【 図 1 0 】

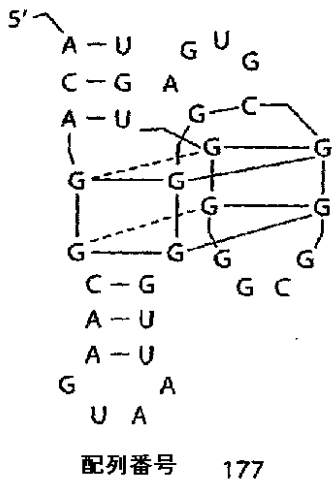


Fig. 10

【 図 1 1 】

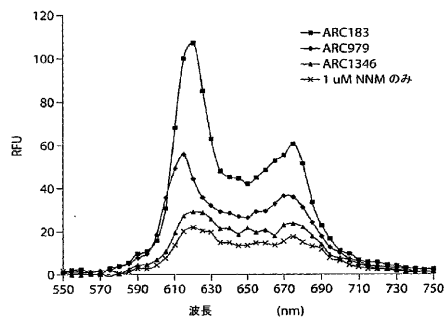


Fig. 11

【 図 1 2 】

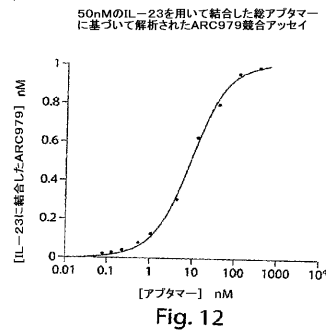


Fig. 12

【 図 1 3 】

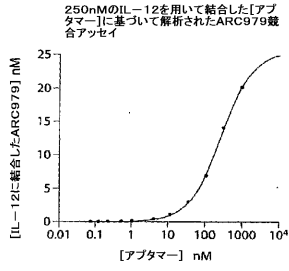


Fig. 13

【 図 1 5 】

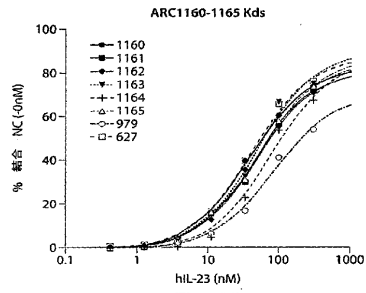


Fig. 15

【 図 1 4 】

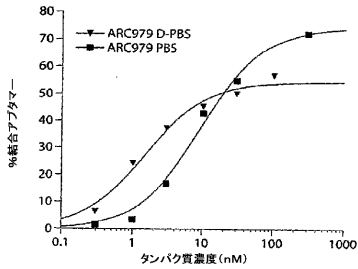


Fig. 14

【 図 1 6 】

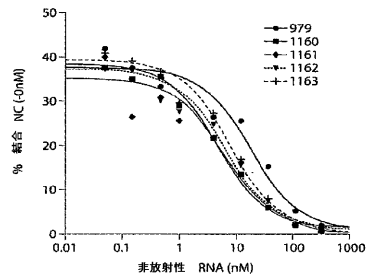


Fig. 16

【 図 1 7 】

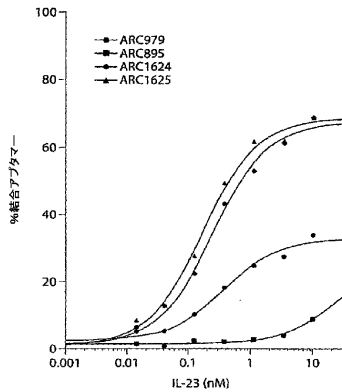


Fig. 17

【 図 1 8 】

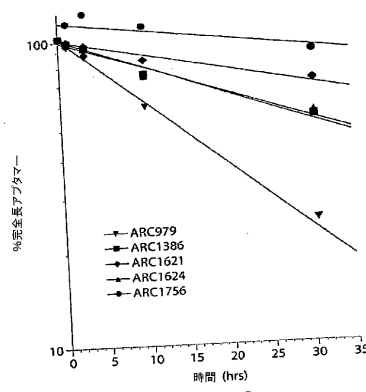


Fig. 18

【 図 1 9 】

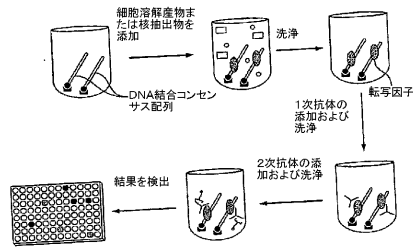


Fig. 19

【 図 2 0 】

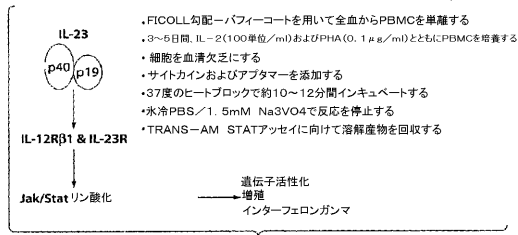


Fig. 20

【 図 2 2 】

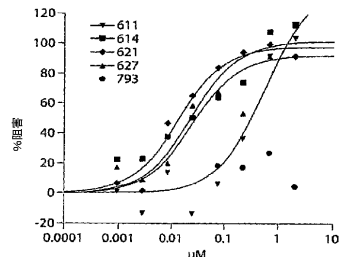


Fig. 22

【 図 2 1 】

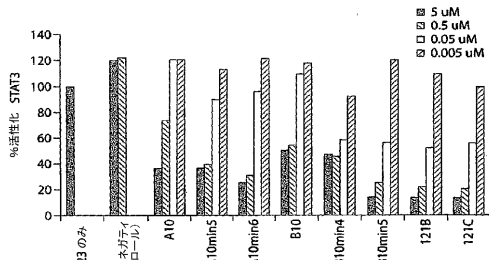


Fig. 21

【 図 2 3 】

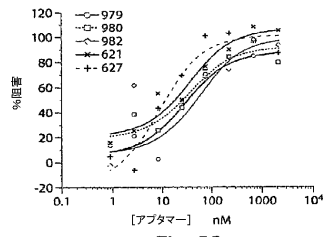


Fig. 23

【 図 2 4 】

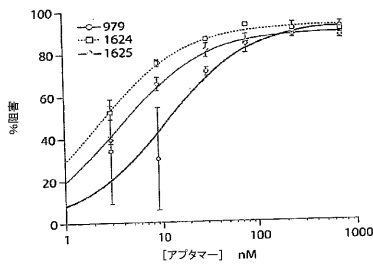


Fig. 24

【 図 2 6 】

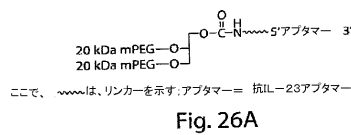


Fig. 26A

【 図 2 5 】

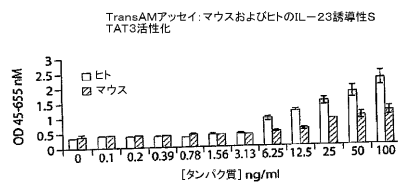


Fig. 25

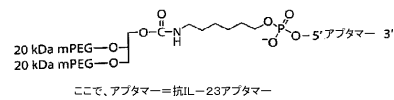


Fig. 26B

【 図 2 7 A 】

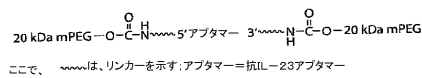


Fig. 27A



【配列表】

2009521208000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年3月30日(2009.3.30)

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009521208000001.app

【国際調査報告】

60800400021



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/37276

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC: C07H 21/04(2006.01);C07H 21/02(2006.01)<br><br>USPC: 536/24.5:536/23.1<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S.:<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Please See Continuation Sheet                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E, Y</td> <td>US 2007/0066550 A1 (DIENER et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 177 and 223-250, for example, and disclosure at pages 1-9.</td> <td>1 and 3-22</td> </tr> <tr> <td>E, Y</td> <td>US 2007/0066551 A1 (KEEFE et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 1, 4, and 5-9, for example, and disclosure at pages 1-12.</td> <td>1 and 3-22</td> </tr> <tr> <td>P, Y</td> <td>US 2006/0193821 A1 (DIENER et al.) 31 August 2006 (31.08.06), see SEQ ID Nos. 177 and 224-250, for example, and disclosure at pages 1-20.</td> <td>1 and 3-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,346611 (PAGRATIS et al.) 12 February 2002 (12.02.2002), column 13, lines 15-30.</td> <td>1 and 3-22</td> </tr> </tbody> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                  | Category *                               | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                                                                    | E, Y                                                                                                                                                                                                | US 2007/0066550 A1 (DIENER et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 177 and 223-250, for example, and disclosure at pages 1-9. | 1 and 3-22                                                                                                                                                                   | E, Y                                                                                                                                                                    | US 2007/0066551 A1 (KEEFE et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 1, 4, and 5-9, for example, and disclosure at pages 1-12.                                                                                                          | 1 and 3-22                                                                   | P, Y                                          | US 2006/0193821 A1 (DIENER et al.) 31 August 2006 (31.08.06), see SEQ ID Nos. 177 and 224-250, for example, and disclosure at pages 1-20. | 1 and 3-22 | Y | US 6,346611 (PAGRATIS et al.) 12 February 2002 (12.02.2002), column 13, lines 15-30. | 1 and 3-22 |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                               | Relevant to claim No.                    |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| E, Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2007/0066550 A1 (DIENER et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 177 and 223-250, for example, and disclosure at pages 1-9.                                                                                                        | 1 and 3-22                               |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| E, Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2007/0066551 A1 (KEEFE et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), see SEQ ID Nos. 1, 4, and 5-9, for example, and disclosure at pages 1-12.                                                                                                          | 1 and 3-22                               |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| P, Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2006/0193821 A1 (DIENER et al.) 31 August 2006 (31.08.06), see SEQ ID Nos. 177 and 224-250, for example, and disclosure at pages 1-20.                                                                                                        | 1 and 3-22                               |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | US 6,346611 (PAGRATIS et al.) 12 February 2002 (12.02.2002), column 13, lines 15-30.                                                                                                                                                             | 1 and 3-22                               |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| <table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"I" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table> |                                                                                                                                                                                                                                                  | * Special categories of cited documents: |                                                                                    | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "I" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | "E" earlier application or patent published on or after the international filing date                                                     | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone | "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family | "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                    |            |   |                                                                                      |            |
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | "I" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| "E" earlier application or patent published on or after the international filing date                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| Date of the actual completion of the international search<br>05 April 2008 (05.04.2008)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Date of mailing of the international search report<br>25 APR 2008                                                                                                                                                                                |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (571) 273-3201                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Authorized officer<br>Louis Wollenberger<br>Telephone No. 571-272-8144<br>24. 7. 2008                                                                                                                                                            |                                          |                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                              |                                               |                                                                                                                                           |            |   |                                                                                      |            |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US06/37276

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 and 3-22 as drawn to SEQ ID NO:309

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US06/37276

## BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1, 3-22, drawn to an aptamer that binds to IL-23, wherein the aptamer is SEQ ID NO:309, and to treatment and diagnostic methods thereof using said aptamer.

Group II, claim(s) 1-22, drawn to an aptamer that has the same ability to inhibit IL-23 induced STAT3 phosphorylation as SEQ ID NO:309, wherein the aptamer may be any of those listed in claim 2, and to treatment and diagnostic methods thereof using said aptamer. This group contains a claim (claim 2) drawn to a eight (8) structurally distinct nucleic acid molecules, which lack unity of invention, as explained below. Therefore, Group II comprises 8 separate inventions.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The special technical feature of Group II is SEQ ID NO:309, which is not specifically required by the invention of Group II, drawn to all other aptamers having the same activity as SEQ ID NO:309, which may include any of those listed in claim 2. Therefore the inventions lack unity of invention *a priori*.

Applicant is further advised that Group II is drawn to a plurality of inventions that do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features. Specifically referred to is the Markush listing of alternative nucleic acid molecules listed in claim 2 as SEQ ID NO:306 to 308 and 310 to 314. While the alternative molecules may have a common activity, they do not share a significant structural element essential to that utility. The molecules are structurally unique, one from the other, having a distinctive array of modifications, the precise configuration of which is expected to dictate their physical, chemical, and biological activities *in vitro* and *in vivo*. Therefore the alternatives, and thereby the methods using said alternatives, lack unity of invention *a priori*.

4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US06/37276

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
EAST(SEQ ID NO:309 searched against Published and Issued Patent Literature); STN (SEQ ID NO:309 searched against CaPlus, Registry); Length limited search by STIC-Biotech of SEQ ID NO:309 (upper and lower limits of 10 and 40 nucleotides) against the commercial databases.

## 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 19/10 | (2006.01) | A 6 1 P 19/10 |            |
| A 6 1 P 3/10  | (2006.01) | A 6 1 P 3/10  |            |
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |            |
| A 6 1 P 25/00 | (2006.01) | A 6 1 P 25/00 |            |
| A 6 1 P 19/02 | (2006.01) | A 6 1 P 19/02 |            |
| A 6 1 P 17/06 | (2006.01) | A 6 1 P 29/00 | 1 0 1      |
| A 6 1 P 37/02 | (2006.01) | A 6 1 P 17/06 |            |
| A 6 1 P 1/04  | (2006.01) | A 6 1 P 37/02 |            |
| C 1 2 Q 1/68  | (2006.01) | A 6 1 P 1/04  |            |
| G 0 1 N 33/53 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/68  | A          |
|               |           | G 0 1 N 33/53 | P          |

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

- (72)発明者 エプSTEIN, デイビッド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 8, ベルモント, パイン ストリート 5 6
- (72)発明者 ファーガソン, アリシア  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, サマー ストリート 1 6 2, ナンバー 3 3
- (72)発明者 浜口 伸子  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 0 1, フレーミングハム, ダートマス ドライブ 7
- (72)発明者 ラガッセ, ダニエル エイチ. エー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, ハイランド アベニュー 1 1 2, アpartment エフ
- (72)発明者 ペンダーグラスト, シャノン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 2 1 3 9, ケンブリッジ, グリーン ストリート 5 1 6, ナンバー 1 エー
- (72)発明者 ソーニー, プージャ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 4, アーリントン, マサチューセッツ アベニュー 2 7 6, アpartment 5 1 1
- (72)発明者 トンプソン, クリスティン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 7 4, アーリントン, カレッジ アベニュー 1 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA09 HA11 HA17  
4B063 QA01 QA19 QQ79 QR32 QR35 QR55 QS32  
4C084 AA13 MA13 MA17 MA23 MA28 MA34 MA35 MA37 MA43 MA52  
MA56 MA58 MA59 MA66 NA14 ZA02 ZA662 ZA682 ZA892 ZA962  
ZA972 ZB052 ZB082 ZB112 ZB152 ZB262 ZC352  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA66 ZA68  
ZA89 ZA96 ZA97 ZB05 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZC35

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 适体对抗人IL-12细胞因子家族及其治疗自身免疫相关疾病的用途                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2009521208A</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 公开(公告)日 | 2009-06-04 |
| 申请号            | JP2008532477                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 申请日     | 2006-09-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿克组合公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 阿克组合公司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| [标]发明人         | ディーナー ジョンエル<br>エプステイン デイビッド<br>ファーガソン アリシア<br>浜口 伸子<br>ラガッセ ダニエル エイチ.エー.<br>ペンダーグラスト シャノン<br>ソーニー プージャ<br>トンプソン クリスティン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 发明人            | ディーナー, ジョン エル.<br>エプステイン, デイビッド<br>ファーガソン, アリシア<br>浜口 伸子<br>ラガッセ, ダニエル エイチ.エー.<br>ペンダーグラスト, シャノン<br>ソーニー, プージャ<br>トンプソン, クリスティン                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 A61K31/711 A61K48/00 A61P37/06 A61P29/00 A61P19/10 A61P3/10 A61P35/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P37/02 A61P1/04 C12Q1/68 G01N33/53 C07H21/04 C12N15/115                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| CPC分类号         | A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 C07H21/04 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/315 C12N2310/317 C12N2310/321 C12N2310/322 C12N2310/331 C12N2310/346 C12N2310/351 C12N2310/3521                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.A A61K31/711 A61K48/00 A61P37/06 A61P29/00 A61P19/10 A61P3/10 A61P35/00 A61P25/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P37/02 A61P1/04 C12Q1/68.A G01N33/53.P                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QS32 4C084/AA13 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA34 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB05 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZC35 |         |            |
| 代理人(译)         | 夏木森下                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |            |
| 优先权            | 11/234676 2005-09-22 US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |            |
| 摘要(译)          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |            |

本发明提供了用于治疗其中细胞因子参与发病机制的免疫疾病的材料和方法。本发明的材料和方法可用于治疗自身免疫疾病。本发明的材料和方法涉及能够与人IL-23和/或人IL-12细胞因子结合并因此调节其生物学活性的核酸配体，并可用作免疫，自身免疫和癌症的治疗剂。疗法。

