(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5253818号
(P5253818)
(45)発行日　平成25年7月31日(2013.7.31)　(24)登録日　平成25年4月26日(2013.4.26)

(51)Int.Cl.			F I		
C12N 15/09	(2006.01)		C12N	15/00	ZNAA
C12N 15/115	(2010.01)		C12N	15/00	H
A61K 48/00	(2006.01)		A61K	48/00	
A61K 31/7125	(2006.01)		A61K	31/7125	
A61K 47/48	(2006.01)		A61K	47/48	

請求項の数 27　(全 96 頁)　最終頁に続く

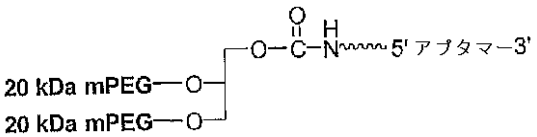
(21)出願番号　特願2007-555346 (P2007-555346)
(86)(22)出願日　平成18年2月14日 (2006.2.14)
(65)公表番号　特表2008-530133 (P2008-530133A)
(43)公表日　平成20年8月7日 (2008.8.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/005215
(87)国際公開番号　WO2006/088888
(87)国際公開日　平成18年8月24日 (2006.8.24)
審査請求日　平成21年1月30日 (2009.1.30)
(31)優先権主張番号　11/058,134
(32)優先日　平成17年2月14日 (2005.2.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　512212117
アーケミックス　エルエルシー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４１１１，　サン　フランシスコ，　モンゴメリー　ストリート　６０１，　スイート　２０２０
(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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】補体関連障害の処置に有用なアプタマー治療剤

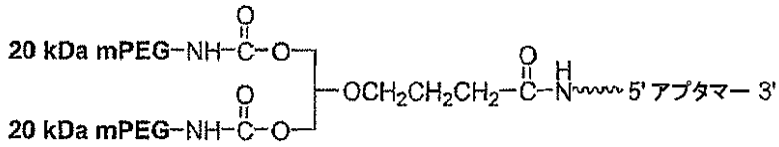
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下に示す構造：
【化１－１】



を有するアプタマー／ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）結合体またはその塩であって、ここで、
【化１－２】
`` は、アルキルリンカーを示し、
アプタマー ＝
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T (配列番号　:4),

であり、ここで、ｆＣおよびｆＵは２’－フルオロヌクレオチドであり、ならびにｍＧおよびｍＡは２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、そして、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す、
アプタマー／ＰＥＧ結合体またはその塩。
【請求項２】

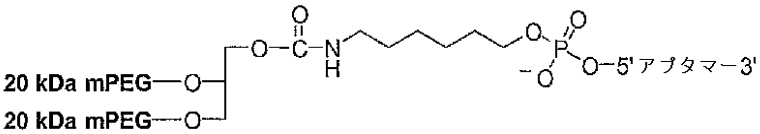
以下に示す構造：
【化１－３】



を有するアプタマー／ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）結合体またはその塩であって、ここで、
【化１－４】
〰〰 は、アルキルリンカーを示し、

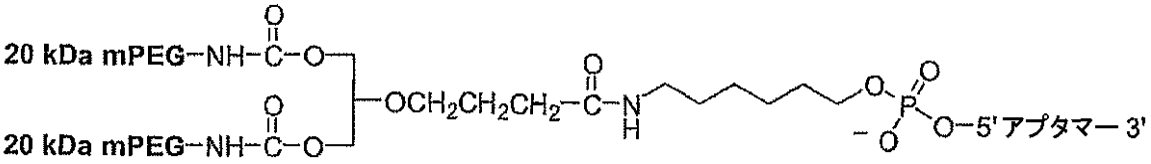
アプタマー＝
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCf
CfUmGfCmG-3T (配列番号4) であり、

ここで、ｆＣおよびｆＵは２’－フルオロヌクレオチドであり、ならびにｍＧおよびｍＡは２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す、
アプタマー／ＰＥＧ結合体またはその塩。
【請求項３】
前記アルキルリンカーが、６個の連続するＣＨ$_2$基を含むアルキルリンカー、２～１８個の連続するＣＨ$_2$基を含むアルキルリンカー、２～１２個の連続するＣＨ$_2$基を含むアルキルリンカー、または、３～６個の連続するＣＨ$_2$基を含むアルキルリンカーである、請求項１または２に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体。
【請求項４】
前記アプタマー／ＰＥＧ結合体またはその塩が、以下に示す構造：
【化２－１】



を有し、ここで、アプタマー＝
【化２－２】
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T (配列番号　4),

であり、ここで、ｆＣおよびｆＵは２’－フルオロヌクレオチドであり、ｍＧおよびｍＡは２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、そして、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す、
請求項１に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体。
【請求項５】
前記アプタマー／ＰＥＧ結合体またはその塩が、以下に示す構造：
【化２－３】



を有し、ここで、

【化２－４】

アプタマー＝

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCf

CfUmGfCmG-3T（配列番号4）であり、

ここで、ｆＣおよびｆＵは２’－フルオロヌクレオチドであり、ならびにｍＧおよびｍＡは２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す、

請求項２に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体。

【請求項６】

請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体またはその塩の治療有効量と、薬学的に許容され得る担体または希釈剤とを含む、哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善するための組成物。

【請求項７】

哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善するための医薬の製造における、請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体の使用。

【請求項８】

哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む組成物。

【請求項９】

前記哺乳動物がヒトである、請求項７に記載の使用。

【請求項１０】

前記疾患が、急性虚血性疾患、急性炎症性疾患、慢性炎症性疾患または免疫媒介性疾患である、請求項７に記載の使用。

【請求項１１】

前記疾患が、心筋梗塞、脳卒中、虚血性／再灌流傷害、感染性疾患、敗血症、ショック、急性／超急性移植拒絶、アレルギー、喘息、関節リウマチおよび他のリウマチ系疾患、多発性硬化症および他の神経系疾患、乾癬および他の皮膚科系疾患、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、または亜急性／慢性移植拒絶；あるいは、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患である、請求項７に記載の使用。

【請求項１２】

前記疾患が、冠動脈バイパス移植術（ＣＡＢＧ）術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷または再狭窄に関連する心筋損傷である、請求項７に記載の使用。

【請求項１３】

前記処置される疾患が、ＣＡＢＧ術に関連するＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質媒介性合併症である、請求項７に記載の使用。

【請求項１４】

前記アプタマー／ＰＥＧ結合体が周術期に投与されることを特徴とする、請求項７に記載の使用。

【請求項１５】

前記アプタマー／ＰＥＧ結合体が静脈内投与されることを特徴とする、請求項７に記載の使用。

【請求項１６】

請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む組成物であって、該組成物を、Ｃ５補体タンパク質またはその改変体を含むと疑われるサンプルと接触させると、該Ｃ５補体タンパク質またはその改変体の存在または不在が検出される、組成物。

【請求項１７】
前記Ｃ５補体タンパク質またはその改変体が、ヒトＣ５補体タンパク質またはその改変体である、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
インビトロ診断剤として使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む組成物。
【請求項１９】
インビボ診断剤として使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む組成物。
【請求項２０】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患のインビボでの処置、予防または改善に使用するための、請求項１～５のいずれか１項に記載のアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む組成物。
【請求項２１】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該哺乳動物がヒトである、組成物。
【請求項２２】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該疾患が、急性虚血性疾患、急性炎症性疾患、慢性炎症性疾患または免疫媒介性疾患である、組成物。
【請求項２３】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該疾患が、心筋梗塞、脳卒中、虚血性／再灌流傷害、感染性疾患、敗血症、ショック、急性／超急性移植拒絶、アレルギー、喘息、関節リウマチおよび他のリウマチ系疾患、多発性硬化症および他の神経系疾患、乾癬および他の皮膚科系疾患、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、または亜急性／慢性移植拒絶；あるいは、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患である、組成物。
【請求項２４】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該疾患が、冠動脈バイパス移植術（ＣＡＢＧ）術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷または再狭窄に関連する心筋損傷である、組成物。
【請求項２５】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該処置される疾患が、ＣＡＢＧ術に関連するＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質媒介性合併症である、組成物。
【請求項２６】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該アプタマー／ＰＥＧ結合体が周術期に投与される、組成物。
【請求項２７】
哺乳動物においてＣ５、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９補体タンパク質により媒介される疾患を処置、予防または改善する方法において使用するためのアプタマー／ＰＥＧ結合体を含む、請求項８に記載の組成物であって、該アプタマー／ＰＥＧ結合体が静脈内投与

される、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（発明の分野）

本発明は、一般的に、核酸の分野に関し、より詳しくは、補体関連心疾患、炎症性および自己免疫障害、虚血性再灌流障害および／またはＣ５媒介性補体活性化が関与している他の疾患もしくは障害における治療剤および診断剤として有用な補体系のＣ５タンパク質に結合できるアプタマーに関する。本発明は、さらに、Ｃ５補体系タンパク質に結合できるアプタマーの投与のための材料および方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

（発明の背景）

アプタマーは、古典的なワトソン－クリック塩基対合以外の相互作用によって分子に対する特異的結合親和性を有する核酸分子である。

【０００３】

ファージディスプレイまたはモノクローナル抗体（「ＭＡｂ」）によって作製されるペプチドなどのアプタマーは、選択された標的に特異的に結合することができ、例えばアプタマーの結合による標的の活性のモジュレーションにより、その標的が機能を果たす能力がブロックされ得る。アプタマーは、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選択プロセスによって創製されるため、１００種を超えるタンパク質、例えば、増殖因子、転写因子、酵素、免疫グロブリンおよび受容体に対して作製されている。典型的なアプタマーは、１０～１５ｋＤａの大きさ（３０～４５ヌクレオチド）であり、その標的にナノモル以下の（ｓｕｂ－ｎａｎｏｍｏｌａｒ）親和性で結合し、密接に関連した標的を識別する（例えば、アプタマーは、典型的には、同じ遺伝子ファミリーの他のタンパク質には結合しない）。一連の構造の試験により、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もたらす結合相互作用（例えば、水素結合、静電気的相補性、疎水性接触、立体的排除）と同じ型のものを利用し得ることが示されている。

【０００４】

アプタマーは、治療剤および診断剤としての使用に望ましいいくつかの特性、例えば、高い特異性および親和性、生物学的有効性、ならびに優れた薬物動態特性を有する。また、これらは、抗体および他のタンパク質の生物学に対して特異的な競合する利点を提供する。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、初期リード化合物（ｌｅａｄ）、例えば、治療剤リード化合物の速やかな作製を可能にする。インビトロ選択により、アプタマーの特異性および親和性が厳重に制御されるのを可能にし、リード化合物、例えば、毒性および非免疫原性標的の両方に対するリード化合物の作製を可能にする。

【０００５】

２）毒性および免疫原性。１類型としてのアプタマーは、毒性または免疫原性がほとんどまたはまったくないことが示されている。ラットまたはウッドチャックへの高レベルのアプタマー（１０ｍｇ／ｋｇを毎日９０日間）の慢性投与において、毒性は、臨床的、細胞的または生化学的測定のいずれによっても観察されない。一方、多くのモノクローナル抗体の有効性は、抗体自体に対する免疫応答によって厳格に制限され得、アプタマーに対する抗体を惹起することは、アプタマーが、ＭＨＣを介してＴ細胞によって提示され得ず、免疫応答は、一般的に、核酸断片を認識するように慣らされていないため、ほとんどの場合、極めて困難である。

【０００６】

３）投与。現在承認されているほとんどの抗体治療剤は、静脈内注入（典型的には、２～４時間にわたって）によって投与されるが、アプタマーは、皮下注射によって投与され

得る（アプタマーの皮下投与によるバイオアベイラビリティは、サルでの試験において＞８０％である（非特許文献１）。この差は、主に、ほとんどの治療剤ＭＡｂが可溶性が比較的低く、したがって大きな容量が必要であることによる。良好な可溶性（＞１５０ｍｇ／ｍＬ）および比較的低い分子量（アプタマー：１０～５０ｋＤａ；抗体：１５０ｋＤａ）では、アプタマーの週用量は、０．５ｍＬ未満の容量の注射によって送達され得る。また、サイズの小さいアプタマーは、抗体または抗体断片の浸透は許容されない立体配座的狭窄部（ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ　ｃｏｎｓｔｒｉｃｔｉｏｎ）の領域内に浸透するのが可能になり、アプタマー系治療剤または予防法のまた別の利点が提示される。

【０００７】

４）拡張可能性およびコスト。治療用アプタマーは、化学的に合成され、そのため、製造の要望を満たすために、必要に応じて容易に拡張され得る。製造の拡張における困難性により、現在、一部の生物学的反応の利用可能性が制限されており、大規模タンパク質生産工場の資本コストは莫大であるが、単一の大規模オリゴヌクレオチド合成装置により、１００ｋｇ／年以上で作製され得、必要とされる初期投資額は、比較的適当である。アプタマー合成製品の現在のコストは、キログラム規模で＄５００／ｇと概算され、高度に最適化された抗体と同等である。製品コストを５年で＜＄１００／ｇに低下させるため、プロセス開発における改善の継続が期待されている。

【０００８】

５）安定性。治療用アプタマーは、化学的に頑強である。これらは、熱および変性剤などの因子への曝露後、活性を回復するように内因的に適合されており、長期間（＞１年）、室温で凍結乾燥粉末として保存が可能である。

補体系

補体系は、調節されたカスケード系において一緒になって作用し、細胞外形態の病原体（例えば、細菌）を攻撃する１組の少なくとも２０種類の血漿タンパク質および膜タンパク質を含む。補体系には、古典的で第二経路（図１）、および膜攻撃経路として知られる非酵素系経路の２種類の異なる酵素系活性化カスケードが含まれる。

【０００９】

第１の酵素的活性化カスケードは、古典的経路として知られるものであって、いくつかの成分、Ｃｌ、Ｃ４、Ｃ２、Ｃ３およびＣ５（該経路内の順に列挙）を含む。補体系の古典的経路の開始は、免疫賦活剤および非免疫賦活剤の両方による第１の補体成分（Ｃ１）の結合および活性化後に起こる。Ｃ１は、成分Ｃ１ｑ、Ｃ１ｒおよびＣ１ｓのカルシウム依存性複合体を含み、Ｃ１ｑ成分の結合を介して活性化される。Ｃ１ｑは、６つの同一のサブユニットを含有し、各サブユニットは、３つの鎖（Ａ、ＢおよびＣ鎖）を含む。各鎖は球形の頭部領域を有し、これはコラーゲン様テイルに連結されている。抗原－抗体複合体によるＣ１ｑの結合および活性化は、Ｃ１ｑ頭部基領域を介して起こる。数多くの非抗体Ｃ１ｑ活性化剤、例えば、タンパク質、脂質および核酸が、コラーゲン様茎部領域上の異なる部位を介してＣ１ｑに結合し、活性化する。次いで、Ｃｌｑｒｓ複合体は、補体成分Ｃ４およびＣ２の活性化を触媒し、Ｃ３コンバターゼとしての機能を果たすＣ４ｂＣ２ａ複合体を形成する。

【００１０】

第２の酵素的活性化カスケードは、第二経路として知られるものであって、補体系活性化および増幅の速やかな抗体非依存性経路である。第二経路は、いくつかの成分、Ｃ３、Ｂ因子およびＤ因子（該経路内の順に列挙）を含む。第二経路の活性化は、Ｃ３のタンパク質分解的切断形態であるＣ３ｂが、細菌などの表面活性化因子に結合された場合に起こる。次いで、Ｂ因子がＣ３ｂに結合され、Ｄ因子によって切断されて、活性な酵素Ｂａが生じる。酵素Ｂａは、次いで、さらにＣ３を切断し、さらにＣ３ｂを生成させ、該活性化表面上へのＣ３ｂ－Ｂａ複合体の広範な沈着をもたらす。

【００１１】

したがって、古典的および第二の両方の補体経路により、因子Ｃ３をＣ３ａとＣ３ｂに分裂させるＣ３コンバターゼが生成される。この点で、両方のＣ３コンバターゼは、さら

に、Ｃ５コンバターゼ（Ｃ４ｂ２ａ３ｂおよびＣ３ｂ３ｂＢｂ）に合成される。これらの複合体は、続いて、補体成分Ｃ５を２つの成分：Ｃ５ａポリペプチド（９ｋＤａ）とＣ５ｂポリペプチド（１７０ｋＤａ）に切断する。Ｃ５ａポリペプチドは、７回膜貫通Ｇタンパク質共役型受容体（これは、元々、白血球と会合していたが、現在では、さまざまな組織、例えば、肝細胞およびニューロン上で発現されることが知られている）に結合する。Ｃ５ａ分子は、ヒト補体系の主要な化学走化性成分であり、さまざまな生物学的応答、例えば、白血球化学走性、平滑筋収縮、細胞内シグナル伝達経路の活性化、好中球－内皮接着、サイトカインおよび脂質メディエータ放出ならびに酸化体形成を誘発し得る。

【００１２】

より大きいＣ５ｂ断片ほど、補体カスケードより後期の成分、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８およびＣ９に順に結合し、Ｃ５ｂ－９膜攻撃複合体（「ＭＡＣ」）を形成する。Ｃ５ｂ－９　ＭＡＣは、赤血球を直接溶解することができ、より多量では、白血球に対して溶解性であり、筋肉、上皮および内皮細胞などの組織に対して障害性である。溶解性に満たない量では、ＭＡＣは接着分子の上方調節を刺激し得、細胞内カルシウムが増加し、サイトカインが放出される。また、Ｃ５ｂ－９　ＭＡＣは、内皮細胞および血小板などの細胞を、細胞溶解を引き起こすことなく刺激し得る。Ｃ５ａおよびＣ５ｂ－９　ＭＡＣの非溶解性効果は、非常に類似していることがある。

【００１３】

補体系は、健康の維持に重要な役割を有するが、疾患を引き起こすか、または寄与する可能性を有する。例えば、補体系は、冠動脈バイパス移植術（「ＣＡＢＧ」）術、数多くの腎臓系、リウマチ系、神経系、皮膚科系、血液系、血管系／肺系、アレルギー、感染性および生体適合性／ショックの疾患および／または状態、ならびに糖尿病性網膜症に関連する副作用に関与している。補体系は、必ずしも疾患状態の唯一の原因ではないが、病因に寄与するいくつかの因子の１つであり得る。

【００１４】

非特許文献２では、心肺バイパス（「ＣＰＢ」）による冠動脈バイパス移植術を受けた患者に対する、抗Ｃ５単鎖抗体断片Ｐｅｘｅｌｉｚｕｍａｂの効果が試験された。個々の患者にはＰｅｘｅｌｉｚｕｍａｂが、１０分間、単回ボーラス投与で、ＣＰＢの直前に０．５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇおよび２．０ｍｇ／ｋｇで投与された。血液試料を採取し、補体活性が、投与前、投与５分後、５分後２８℃で、再昇温の開始後、５分後３７℃で、ＣＰＢ後７日間まで試験された。薬力学的解析により、２ｍｇ／ｋｇの投薬量で１４時間までで、補体溶血性活性の有意な用量依存的阻害が示され、炎症誘発性補体副産物（ｓＣ５ｂ－９）の生成が、用量依存的に有効に阻害された。しかしながら、前述のように、抗体治療剤は一定の制限を有する。

【００１５】

したがって、補体関連障害の処置における治療剤および診断剤としての使用のための補体系の新規なインヒビターがあることは、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】Ｆｉｔｃｈら、Ｃｉｒｃ．１００：２４９９－５０６（１９９９）

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１６】

（発明の要旨）

本発明は、補体関連疾患の処置、予防および改善のための材料および方法を提供する。一実施形態において、ＰＥＧ部分に結合体化されたＡＲＣ１８６（配列番号：４）によるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。特定の実施形態において、このＡＲＣ１８６アプタマー／ＰＥＧ結合体は、Ｃ５補体タンパク質に対して、配列番号：４による配列からなるが、ＰＥＧ部分を欠くアプタマーと実質的に同じ結合親和性を含む。実質的に同じ結合親和性は、本明細書で用いる場合、ドットブロット解析によって測定したとき

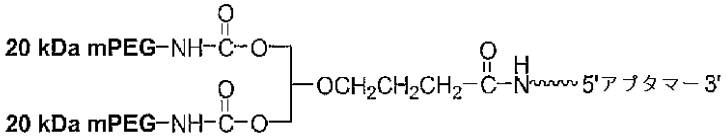
、解離定数が約２～１０倍を越えない差、好ましくは、２～５倍を越えない差であることを意味する。ある一部の実施形態において、解離定数は、以下の実施例１Ａに記載のような競合ドットブロット解析によって測定される。ある一部の実施形態において、ポリエチレングリコール部分は、１０ｋＤＡより大きい分子量、特に２０ｋＤＡの分子量、より特別には３０ｋＤａおよびより特別には４０ｋＤａを構成する。ある一部の実施形態において、ＰＥＧ部分は、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の５’末端に結合体化されている。ある一部の実施形態において、アプタマー／ＰＥＧ結合体は、以下の実施例５Ｅに記載の方法で測定したとき、霊長類において、少なくとも１５時間、好ましくは、少なくとも２４時間、より好ましくは、少なくとも４８時間の２コンパートメントモデルでの半減期、好ましくは最終半減期を含む。ある一部の実施形態において、アプタマー／ＰＥＧ結合体は、ラットにおいて、少なくとも１０、好ましくは、少なくとも１５時間の２コンパートメントモデルでの半減期、好ましくは最終半減期を含む。ある一部の実施形態において、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の５’末端に結合体化されたＰＥＧは、４０ｋＤａ　ＰＥＧである。特定の実施形態において、４０ｋＤａ　ＰＥＧは分枝鎖ＰＥＧである。ある一部の実施形態において、分枝鎖４０ｋＤａ　ＰＥＧは、１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）である。他の実施形態において、分枝鎖４０ｋＤａ　ＰＥＧは、２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイルである。

【００１７】

分枝鎖４０ｋＤａ　ＰＥＧが１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）である実施形態において、以下に示す構造：

【００１８】

【化３－１】



（式中、

【００１９】

【化３－２】

```` は、リンカーを示し、
アプタマー ＝
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T ( 配列番号 ：4),

ここで、ｆＣおよびｆＵ＝２’－フルオロヌクレオチド、ならびにｍＧおよびｍＡ２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチド０は２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す）

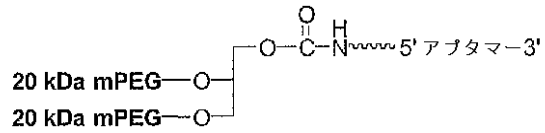
を有するアプタマーが提供される。

【００２０】

分枝鎖４０ｋＤａ　ＰＥＧが２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイルである実施形態において、以下に示す構造を有するアプタマー：

【００２１】

【化４－１】




（式中、

【００２２】
````

【化４－２】

`` `` `` `` は、リンカーを示し、
アプタマー ＝
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T (配列番号 4),

ここで、ｆＣおよびｆＵ＝２’－フルオロヌクレオチド、ならびにｍＧおよびｍＡ＝２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す）
が提供される。

【００２３】

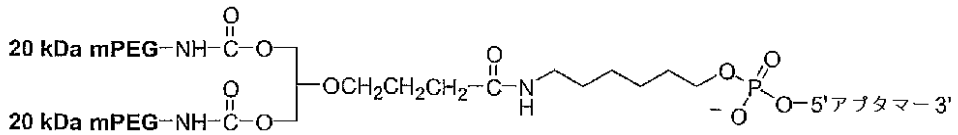
本発明のこの態様のある一部の実施形態において、リンカーはアルキルリンカーである。特定の実施形態において、アルキルリンカーは２～１８個の連続するCH_2基を含む。好ましい実施形態において、アルキルリンカーは２～１２個の連続するCH_2基を含む。特に好ましい実施形態において、アルキルリンカーは３～６個の連続するCH_2基を含む。

【００２４】

特定の実施形態において、以下に示す構造：

【００２５】

【化５－１】



（アプタマー＝

【００２６】

【化５－２】

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T (配列番号 :4)

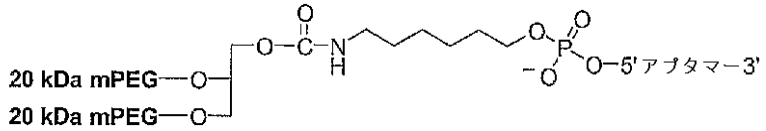
ここで、ｆＣおよびｆＵ＝２’－フルオロヌクレオチド、ならびにｍＧおよびｍＡ＝２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す）
を有するアプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）が提供される。

【００２７】

別の実施形態において、以下に示す構造：

【００２８】

【化６－１】



（式中、
アプタマー＝

【００２９】

【化６－２】

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T (配列番号 :4)

ここで、ｆＣおよびｆＵ＝２’－フルオロヌクレオチド、ならびにｍＧおよびｍＡ＝２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示すを有するアプタマー、ＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）
が提供される。

【００３０】
別の態様において、本発明は、医薬組成物を提供する。一実施形態において、治療有効量のＡＲＣ１８７（配列番号：５）もしくはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）またはその塩を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体または希釈剤を含むものであり得る。この態様において、本発明は、Ｃ５補体タンパク質切断をインビボで阻害する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され得る担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。本発明のこの態様において、インビボでの疾患の処置、予防または改善における使用のためのＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）医薬組成物が提供される。また、本発明のこの態様において、医薬組成物の調製のためのＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）が提供される。

【００３１】
本発明の別の態様において、処置方法が提供される。一実施形態において、本発明の方法は、Ｃ５補体タンパク質および／またはその誘導体Ｃ５ａおよびＣ５ｂ－９によって媒介される疾患を処置、予防または改善することを含み、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）またはその塩を含む医薬組成物を脊椎動物に投与することを含む。ある一部の実施形態において、該方法は、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。ある一部の実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【００３２】
ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、急性虚血性疾患（心筋梗塞、脳卒中、虚血性／再灌流障害）；急性炎症性疾患（感染性疾患、敗血症、ショック、急性／超急性移植拒絶）；慢性炎症性および／または免疫媒介性疾患（アレルギー、喘息、関節リウマチ、および他のリウマチ系疾患、多発性硬化症ならびに他の神経系疾患、乾癬および他の皮膚科系疾患、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、亜急性／慢性移植拒絶、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患）である。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患としては、透析あるいは血液が合成チュービング（ｔｕｂｉｎｇ）および／または異物上および／またはその内部を通過する環境と関連する補体活性化が挙げられる。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷および再狭窄に関連する心筋損傷からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性障害は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷、再狭窄に関連する心筋損傷、ＣＡＢＧ術に関連する補体タンパク質媒介性合併症、経皮的冠動脈インターベンションに関連する補体タンパク質媒介性合併症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、急性移植拒絶、超急性移植拒絶、亜急性移植拒絶および慢性移植拒絶からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する合併症である。特定の実施形態において、処置対象の疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷である。

【００３３】
ある一部の実施形態において、本発明の方法は、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．５～約１０倍であるアプタマー血漿濃度が達成されるように、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）を含む医薬組成物を投与することを含む。ある一部の実施形態において、医薬用ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）アプタマー組成物は、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．７５～約５倍、．７５～約３倍および１．５～約２倍であるアプタマー血漿濃度が達成されるように投与され、一方、他の実施形態において、アプタマー組成物は、内在性補体タンパク質と同等の濃度が達成されるように投与される。ある一部の実施形態において、本発明のＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）を含む医薬組成物は、約

５μＭ、約４μＭ、約３μＭ、約２μＭ、約１．５μＭ、約１μＭまたは約５００ｎＭのアプタマー血漿濃度が達成されるように投与される。

【００３４】

本発明のアプタマー血漿濃度が達成されるのに充分な投与の経路、持続時間および速度の任意の組合せが使用され得る。ある一部の実施形態において、医薬組成物は静脈内投与される。ある一部の実施形態において、医薬組成物は、ボーラスとして、および／または連続注入によって投与される。

【００３５】

ＣＡＢＧ術と関連する合併症、特に、ＣＡＢＧ術と関連する心筋損傷を処置、予防および／または改善する特定の実施形態において、本発明の方法は、医薬組成物を外科処置の前に投与すること、投与を少なくとも２４時間、ある一部の実施形態において約４８時間、またはある一部の実施形態において約７２時間継続することを含む。本発明のこの態様の特定の実施形態において、内在性補体タンパク質濃度の約２倍の血漿アプタマー濃度が、より低用量のアプタマーの静脈内注入より先、同時またはその後に、処置対象の患者の体重１ｋｇあたり約．７５～１．２５、好ましくは約１ｍｇのアプタマーの静脈内ボーラスの投与によって達成され、ここで、ｍｇは、結合体化されたＰＥＧの重量は含まない。ある一部の実施形態において、該より低用量は、０．００１～０．００５ｍｇ／ｋｇ／分の範囲から選択される速度で注入され、ここで、ｍｇは、結合体化されたＰＥＧの重量は含まない。特定の実施形態において、該より低用量は、約０．００１３ｍｇ／ｋｇ／分の速度で注入される。アプタマー／結合体が充分に長い半減期を含む本発明のこの態様のさらに他の実施形態において、アプタマー医薬組成物は、１日１回または２回、静脈内ボーラス投与として投与され得る。

【００３６】

本発明の別の態様において、診断方法が提供される。一実施形態において、該診断方法は、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）を、Ｃ５補体タンパク質またはそのバリアントを含むことが疑われる組成物と接触させること、およびＣ５補体タンパク質またはそのバリアント存在または非存在を検出することを含む。ある一部の実施形態において、補体タンパク質またはバリアントは脊椎動物であり、特に、哺乳動物、より詳しくはヒトである。本発明は、インビトロまたはインビボ診断剤としての使用のためのＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）組成物を提供する。

【００３７】

本発明の別の態様において、医薬組成物の調製における使用のための、ＡＲＣ３３０（配列番号：２）およびＡＲＣｌ８８－１８９、ＡＲＣ２５０、ＡＲＣ２９６－２９７、ＡＲＣ３３１－３３４、ＡＲＣ４１１－４４０、ＡＲＣ４５７－４５９、ＡＲＣ４７３、ＡＲＣ５２２－５２５、ＡＲＣ５３２、ＡＲＣ５４３－５４４、ＡＲＣ５５０－５５４、ＡＲＣ６５７－６５８、ＡＲＣ６７２、ＡＲＣ７０６、ＡＲＣ１５３７、ＡＲＣ１７３０、（配列番号：６～配列番号（ＳＥＱ　ＮＯ）：６６）が提供される。別の実施形態において、ａｎｙ　ｏｎｅ　ｏｆ　ＡＲＣ３３０（配列番号：２）およびＡＲＣ１８８－１８９、ＡＲＣ２５０、ＡＲＣ２９６－２９７、ＡＲＣ３３１－３３４、ＡＲＣ４１１－４４０、ＡＲＣ４５７－４５９、ＡＲＣ４７３、ＡＲＣ５２２－５２５、ＡＲＣ５３２、ＡＲＣ５４３－５４４、ＡＲＣ５５０－５５４、ＡＲＣ６５７－６５８、ＡＲＣ６７２、ＡＲＣ７０６、ＡＲＣ１５３７、ＡＲＣ１７３０（配列番号：６～配列番号：６６）からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。この態様において、本発明は、Ｃ５補体タンパク質切断をインビボで阻害する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され得る担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

【００３８】

特定の実施形態において、配列番号：１によるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。特定の実施形態において、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提

供される。アプタマーが配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むある一部の実施形態において、アプタマーが、Ｃ５補体タンパク質に対して、配列番号：４による配列からなるが、ＰＥＧ部分を欠くアプタマーと実質的に同じ結合親和性を含む。

【００３９】

アプタマーが配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むある一部の実施形態において、アプタマーは、以下の実施例５Ｅにおいて測定したとき、霊長類において少なくとも１５、好ましくは少なくとも３０時間の２コンパートメントモデルでの半減期、好ましくは最終半減期を含む。アプタマーが配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むある一部の実施形態において、アプタマーは、ラットにおいて少なくとも１時間半、好ましくは少なくとも７時間の２コンパートメントモデルでの半減期、好ましくは最終半減期を含む。

【００４０】

本発明のこの態様のある一部の実施形態において、アプタマーが配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む場合、アプタマーは、以下のような

【００４１】

【化６－３】

H_2N〰〰5'アプタマー3'，（ここで〰〰は、リンカーを示す）

を用いて合成される。ある一部の実施形態において、リンカーは、以下のような：$H_2N-(CH_2)_n$５’アプタマー３’（ここで、ｎ＝２～１８、好ましくは、ｎ＝２～１２、より好ましくはｎ＝３～６、より好ましくは、ｎ＝６）アルキルリンカーであり、ここで、アプタマー＝

【００４２】

【化６－４】

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfU
AfCfCfUmGfCmG-3T（配列番号　4）

ここで、ｆＣおよびｆＵ＝２’－フルオロヌクレオチド、ならびにｍＧおよびｍＡ＝２’－ＯＭｅヌクレオチドであり、すべての他のヌクレオチドは２’－ＯＨであり、３Ｔは、逆位デオキシチミジンを示す。得られるアミン修飾アプタマーは、１０ｋＤａ　ＰＥＧ、２０ｋＤａ　ＰＥＧ、３０ｋＤａ　ＰＥＧおよび４０ＫＤａ線状ＰＥＧからなる群より選択されるＰＥＧ部分に結合体化されたものであり得る。ある一部の実施形態において、配列番号：１、配列番号：２および配列番号：６～配列番号（配列番号：６６からなる群、特に、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーまたはその塩の治療有効量を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体または希釈剤を含むものであり得る。本発明のこの態様において、インビボでの疾患の処置、予防または改善における使用のための、配列番号：２および配列番号：６～配列番号（配列番号：６６からなる群、特に、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーを含む医薬組成物が提供される。

【００４３】

別の実施形態において、配列番号：２および配列番号：６～配列番号（配列番号：６６からなる群、特に、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーまたはその塩を含む医薬組成物を、脊椎動物に投与することを含む、Ｃ５補体タンパク質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が提供される。本発明のこの態様のある一部の実施形態において、該方法は、本発明の医薬組成物を哺乳動物、好ましくはヒトに投与すること

を含む。

【００４４】

ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、急性虚血性疾患（心筋梗塞、脳卒中、虚血性／再灌流障害）；急性炎症性疾患（感染性疾患、敗血症、ショック、急性／超急性移植拒絶）；慢性炎症性および／または免疫媒介性疾患（アレルギー、喘息、関節リウマチ，および他のリウマチ系疾患、多発性硬化症および他の神経系疾患、乾癬および他の皮膚科系疾患、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、亜急性／慢性移植拒絶、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患）である。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患としては、透析あるいは血液が合成チュービングおよび／または異物上および／またはその内部を通過する環境と関連する補体活性化が挙げられる。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷および再狭窄に関連する心筋損傷からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性障害は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷、再狭窄に関連する心筋損傷、ＣＡＢＧ術に関連する補体タンパク質媒介性合併症、経皮的冠動脈インターベンションに関連する補体タンパク質媒介性合併症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、急性移植拒絶、超急性移植拒絶、亜急性移植拒絶、および慢性移植拒絶からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する合併症である。特定の実施形態において、処置対象の疾患はＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷である。

【００４５】

ある一部の実施形態において、本発明の方法は、配列番号：２および配列番号：６～配列番号：６６からなる群、特に、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するアプタマーを含む医薬組成物を、患者に、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．５～約１０倍のアプタマー血漿濃度が達成されるように投与することを含む。ある一部の実施形態において、医薬用アプタマー組成物は、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．７５～約５倍、．７５～約３倍および１．５～約２倍であるアプタマー血漿濃度が達成されるように投与され、一方、他の実施形態において、アプタマー組成物は、内在性補体タンパク質と同等の濃度が達成されるように投与される。ある一部の実施形態において、本発明の医薬組成物は、約５μＭ、約４μＭ、約３μＭ、約２μＭ、約１．５μＭまたは約５００ｎＭのアプタマー血漿濃度が達成されるように投与される。

【００４６】

本発明のアプタマー血漿濃度が達成されるのに充分な投与の経路、持続時間および速度の任意の組合せが使用され得る。ある一部の実施形態において、医薬組成物は静脈内投与される。ある一部の実施形態において、医薬組成物は、ボーラスとして、および／または連続注入によって投与される。

【００４７】

ＣＡＢＧ術と関連する合併症、特に、ＣＡＢＧ術と関連する心筋損傷を処置、予防および／または改善する特定の実施形態において、本発明の方法は、医薬組成物を外科処置の前に投与すること、および投与を少なくとも２４時間、ある一部の実施形態において約４８時間、またはある一部の実施形態において約７２時間継続することを含む。本発明のこの態様の特定の実施形態において、所望のアプタマー血漿濃度、例えば、ある一部の実施形態において内在性補体タンパク質濃度の２倍が、より低用量のアプタマーの静脈内注入より先、同時またはその後に、処置対象の患者への静脈内ボーラスの投与によって達成される。本発明のこの態様のさらに他の実施形態において、アプタマー／結合体が充分に長い半減期を含む場合、アプタマー医薬組成物は、１日１回または２回、静脈内ボーラス投与として投与され得る。

【００４８】
本発明の別の態様において、診断方法が提供される。一実施形態において、該診断方法は、Ｃ５補体タンパク質またはそのバリアントを含むことが疑われる組成物を、配列番号：２および配列番号：６～配列番号６６からなる群、特に、配列番号：６１、配列番号：６２および配列番号：６４～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーと接触させること、およびＣ５補体タンパク質またはそのバリアントの存在または非存在を検出することを含む。ある一部の実施形態において、補体タンパク質またはバリアントは、脊椎動物、特に、哺乳動物、より詳しくはヒトである。本発明は、インビトロまたはインビボ診断剤としての使用のための、配列番号：２および配列番号：６～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーを有するアプタマー組成物を提供する。本発明において、医薬組成物の調製における使用のための、配列番号：２および配列番号：６～配列番号：６６からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。

【００４９】
本発明の別の態様において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つと８０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。ある一部の実施形態において、配列番号：７５～８１および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つの特有の領域と８０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。別の実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つと９０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。特定の実施形態において、配列番号：７５～８１および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つの特有の領域と９０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。また別の実施形態において、配列番号：７５～８１および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つに含まれる４０個の連続するヌクレオチドと同一である４０個の連続するヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。別の実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つに含まれる３０個の連続するヌクレオチドと同一である３０個の連続するヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。また別の実施形態において、Ｃ５補体タンパク質に特異的に結合し、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択される配列のいずれか１つに含まれる１０個の連続するヌクレオチドと同一である１０個の連続するヌクレオチドのヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。好ましい実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列のいずれか１つによるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。

【００５０】
ある一部の実施形態において、すぐ上に記載の本発明のこの態様のアプタマーは、核酸配列の糖鎖の位置における化学的置換；リン酸基の位置における化学的置換；および塩基の位置における化学的置換からなる群より選択される化学的修飾をさらに含むものであり得る。ある一部の実施形態において、該修飾は、修飾ヌクレオチドの組込み；３’キャッピング、高分子量の非免疫原性化合物へのコンジュゲーション；親油性化合物へのコンジュゲーション；およびリン酸主鎖の修飾からなる群より選択される。

【００５１】
本発明のこの態様の好ましい実施形態において、アプタマーは、Ｃ５補体タンパク質またはそのバリアントの機能をモジュレートする。特に好ましい実施形態において、アプタマーは、Ｃ５補体タンパク質またはそのバリアントの機能を、好ましくはインビボで、より好ましくは、インビボでヒトにおいて阻害する。本発明のこの態様の一実施形態において、アプタマーによってモジュレートされる、好ましくは阻害される機能は、Ｃ５補体タンパク質切断である。

【００５２】
別の態様のある一部の実施形態において、本発明は、Ｃ５補体タンパク質切断をインビボでブロックする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され得る担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。
【００５３】
ある一部の実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列と８０％同一である、好ましくは９０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーまたはその塩の治療有効量を含む医薬組成物が提供される。ある一部の実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列の特有の領域と８０％同一である、好ましくは９０％同一であるヌクレオチド配列を含むアプタマーの治療有効量を含む医薬組成物またはその塩が提供される。他の実施形態において、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列の４０、３０または１０個のヌクレオチドが同一である、それぞれ４０、３０または１０個の連続するヌクレオチドを有するアプタマーの治療有効量を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体または希釈剤を含むものであり得る。本発明のこの態様において、インビボでの疾患の処置、予防または改善における使用のための配列番号：３～４、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するアプタマーまたはその塩を含む医薬組成物が提供される。この態様において、医薬組成物の調製における使用のための、配列番号：３～４、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するアプタマーが提供される。この態様において、本発明は、Ｃ５補体タンパク質切断をインビボで阻害する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され得る担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。　ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、急性虚血性疾患（心筋梗塞、脳卒中、虚血性／再灌流障害）；急性炎症性疾患（感染性疾患、敗血症、ショック、急性／超急性移植拒絶）；慢性炎症性および／または免疫媒介性疾患（アレルギー、喘息、関節リウマチ，および他のリウマチ系疾患、多発性硬化症および他の神経系疾患、乾癬および他の皮膚科系疾患、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、亜急性／慢性移植拒絶、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患）である。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患としては、透析あるいは血液が合成チュービングおよび／または異物上および／またはその内部を通過する環境と関連する補体活性化が挙げられる。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷および再狭窄に関連する心筋損傷からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質、Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性障害は、ＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷、バルーン式血管形成術に関連する心筋損傷、再狭窄に関連する心筋損傷、ＣＡＢＧ術に関連する補体タンパク質媒介性合併症、経皮的冠動脈インターベンションに関連する補体タンパク質媒介性合併症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、急性移植拒絶、超急性移植拒絶、亜急性移植拒絶および慢性移植拒絶からなる群より選択される。ある一部の実施形態において、処置対象のＣ５補体タンパク質Ｃ５ａおよび／またはＣ５ｂ－９媒介性疾患は、ＣＡＢＧ術に関連する合併症である。特定の実施形態において、処置対象の疾患はＣＡＢＧ術に関連する心筋損傷である。
【００５４】
ある一部の実施形態において、本発明の方法は、配列番号：３～４、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するアプタマーを含む医薬組成物を、患者に、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．５～約１０倍であるアプタマー血漿濃度が達成されるように投与することを含む。ある

一部の実施形態において、医薬用アプタマー組成物は、内在性Ｃ５補体タンパク質の約．７５～約５倍、．７５～約３倍および１．５～約２倍であるアプタマー血漿濃度が達成されるように投与され、一方、他の実施形態において、アプタマー組成物は、内在性補体タンパク質と同等の濃度が達成されるように投与される。ある一部の実施形態において、本発明の医薬組成物は、約５μＭ、約４μＭ、約３μＭ、約２μＭ、約１．５μＭまたは約５００ｎＭのアプタマー血漿濃度が達成されるように投与される。

【００５５】

本発明のアプタマー血漿濃度が達成されるのに充分な投与の経路、持続時間および速度の任意の組合せが使用され得る。ある一部の実施形態において、医薬組成物は静脈内投与される。ある一部の実施形態において、医薬組成物は、ボーラスとして、および／または連続注入によって投与される。

【００５６】

ＣＡＢＧ術と関連する合併症、特に、ＣＡＢＧ術と関連する心筋損傷を処置、予防および／または改善する特定の実施形態において、本発明の方法は、医薬組成物を外科処置の前に投与すること、投与を少なくとも２４時間、ある一部の実施形態において約４８時間、またはある一部の実施形態において約７２時間継続することを含む。本発明のこの態様の特定の実施形態において、所望のアプタマー血漿濃度、例えば、ある一部の実施形態において内在性補体タンパク質濃度の２倍が、より低用量のアプタマーの静脈内注入より先、同時またはその後に、処置対象の患者への静脈内ボーラスの投与によって達成される。本発明のこの態様のさらに他の実施形態において、アプタマー／結合体が充分に長い半減期を含む場合、アプタマー医薬組成物は、１日１回または２回、静脈内ボーラス投与として投与され得る。

【００５７】

別の実施形態において、Ｃ５補体タンパク質またはそのバリアントを含むことが疑われる組成物を、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーと接触させること、およびＣ５補体タンパク質またはそのバリアント存在または非存在を検出することを含む診断方法が提供される。ある一部の実施形態において、補体タンパク質またはバリアントは、脊椎動物、特に、哺乳動物、より詳しくはヒトである。本発明は、インビトロまたはインビボ診断剤としての使用のための、配列番号：７５～８１、配列番号：８３および配列番号：８８～９８からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むアプタマーを有するアプタマー組成物を提供する。

【００５８】

ある一部の実施形態において、配列番号：６８および６９からなる群より選択されるヌクレオチド配列から本質的になるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。ある一部の実施形態において、配列番号：６８および６９からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるヌクレオチド配列を含むアプタマーが提供される。本発明のこの態様のある一部の実施形態において、アプタマーは診断方法において使用され得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【００５９】

（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、以下の付随の説明に示す。本明細書に記載のものと類似または同等の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され得るが、好ましい方法および材料を後述する。本発明の他の特徴、目的および利点は、該記載から明らかとなろう。本明細書において、文脈から明白にそうでないことが示される場合以外は、単数形は複数も含む。特に記載のない限り、本明細書において用いるすべての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に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、本発明の明細書に支配される。

【００６０】

ＳＥＬＥＸ^{TM}法

アプタマーの作製に適した方法は、一般的に、図２に示す、「試験管内人工進化（Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ Ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ）」（「ＳＥＬＥＸ^{TM}」）と称される方法を用いるものである。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスは、標的分子に対して高度に特異的な結合性を有する核酸分子のインビトロ進化のための方法であり、例えば、米国特許出願第０７／５３６，４２８号（１９９０年6月１１日、現在は放棄されている）、発明の名称が「核酸リガンド」である米国特許第５，４７５，０９６号、および発明の名称が「核酸リガンド」である米国特許第５，２７０，１６３号（また、ＷＯ９１／１９８１３も参照）に記載されている。各ＳＥＬＥＸ^{TM}同定核酸リガンド、すなわち各アプタマーは、所与の標的化合物または分子の特異的リガンドである。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスは、核酸が、さまざまな二次元および三次元構造を形成する充分な能力、およびそのモノマー内で、モノマー系であれポリマー系であれ、事実上あらゆる化学的化合物とのリガンドとして作用する（すなわち、特異的結合対を形成する）充分な化学的万能性を有するという独自の洞察に基づくものである。任意の大きさまたは組成の分子が標的として供され得る。

【００６１】

ＳＥＬＥＸ^{TM}は、出発点として、ランダム化配列を含む単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する。オリゴヌクレオチドは、修飾された、または未修飾のＤＮＡ、ＲＮＡまたはＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドであり得る。ある一部の例において、該プールは、１００％ランダムまたは部分ランダムオリゴヌクレオチドを含む。他の例において、該プールは、少なくとも１つの固定および／または保存配列がランダム化配列内に組み込まれたランダムまたは部分ランダムオリゴヌクレオチドを含む。他の例において、該プールは、少なくとも１つの固定および／または保存配列（該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る配列を含み得る）をその５’および／または３’末端を含有するランダムまたは部分ランダムオリゴヌクレオチドを含む。固定配列は、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配列、触媒性コア、アフィニティカラムへの選択的結合のための部位、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／または配列決定を助長する他の配列などの配列である。保存配列は、前述の固定配列以外の、同じ標的に結合するいくつかのアプタマーによって共有される配列である。

【００６２】

該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。典型的には、出発プールのオリゴヌクレオチドは、５’および３’末端固定配列を含有し、これは、３０～５０個のランダムヌクレオチドの内部領域と隣接している。ランダム化ヌクレオチドは、いくつかの様式、例えば、化学合成およびランダムに切断された細胞内核酸からのサイズ選択にて作製され得る。試験核酸における配列のバリエーションもまた、選択／増幅の反復の前またはその最中での変異誘発によって導入または増大させ得る。

【００６３】

該オリゴヌクレオチドの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むものであり得、修飾された、または非天然のヌクレオチドまたはヌクレオチド類縁体を含むものであり得る。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公開公報ＷＯ９２／０７０６５を参照のこと。ランダムオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル連結ヌクレオチドから、当該技術分野でよく知られた固相オリゴヌクレオチド合成手法を用いて合成され得る。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

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合成装置で行なわれる典型的な合成により、ほとんどのＳＥＬＥＸ^{TM}実験に充分な数の10^{14}～10^{16}個の個々の分子が得られる。配列設計においてランダム配列の領域を充分に大きくすることにより、各合成分子が特有の配列を提示し得る可能性が増大する。

【００６４】

オリゴヌクレオチドの出発ライブラリーは、ＤＮＡ合成装置での自動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、すべての４種類のヌクレオチドの混合物を、合成プロセス中の各ヌクレオチド添加工程で添加し、ヌクレオチドのランダム組込みを行なわせる。上記のように、一実施形態において、ランダムオリゴヌクレオチドは、完全にランダム配列を含む。しかしながら、他の実施形態において、ランダムオリゴヌクレオチドは、非ランダムまたは部分ランダム配列の鎖を含むものであり得る。部分ランダム配列は、４種類のヌクレオチドを異なるモル比で、各添加工程において添加することにより創製され得る。

【００６５】

オリゴヌクレオチドの出発ライブラリーは、ＲＮＡまたはＤＮＡのいずれかであり得る。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では、これは、典型的には、ＤＮＡライブラリーをインビトロで、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼまたは修飾されたＴ７ＲＮＡポリメラーゼを用いて転写することにより作製され、精製される。次いで、ＲＮＡまたはＤＮＡライブラリーを標的と、結合に有利な結合に条件下で混合し、同じ一般的選択スキームを用いて結合、分離および増幅段階的反復に供し、事実上、任意の所望の基準の結合親和性および選択性が得られる。より具体的には、核酸の出発プールを含有する混合物から始めて、ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、（ａ）混合物を標的と、結合に有利な条件下で接触させる工程；（ｂ）非結合核酸を、標的分子に特異的に結合された核酸から分離する工程；（ｃ）核酸－標的複合体を解離する工程；（ｄ）核酸－標的複合体から解離された核酸を増幅して核酸のリガンド富化混合物を得る工程；および（ｅ）結合、分離、解離および増幅の工程を所望されるだけ多くのサイクル反復し、標的分子に対する高度に特異的で高親和性核酸リガンドを得る工程を含む。ＲＮＡアプタマーが選択される場合では、ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、さらに、（ｉ）工程（ｄ）での増幅前に、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（ｉｉ）該プロセスを再度始める前に、工程（ｄ）で増幅された核酸を転写する工程を含む。

【００６６】

多数の可能な配列および構造を含む核酸混合物には、所与の標的に対して広範な結合親和性が存在する。例えば、２０個のヌクレオチドランダム化セグメントを含む核酸混合物は、4^{20}個の候補可能性を有し得る。標的に対してより大きな親和定数を有するものほど、標的に最も結合しやすい。分離、解離および増幅後、第２の核酸混合物を生成させ、より高結合親和性の候補を富化させる。得られる核酸混合物が、主として、唯一または数個の配列で構成されるまで、さらなる回数の選択を進行的に最良のリガンドに有利に行なう。次いで、これらをクローニングし、配列決定し得、純粋なリガンドまたはアプタマーとしての結合親和性について個々に試験し得る。

【００６７】

選択および増幅のサイクルは、所望の目的が達成されるまで反復する。最も一般的な場合では、選択／増幅は、結合強度において有意な改善が、サイクルの反復において得られなくなるまで継続される。該方法は、典型的には、およそ10^{14}の異なる核酸種を試料採取するために使用されるが、約10^{18}の異なる核酸種もの多くの試料採取するためにも使用され得る。一般的に、核酸アプタマー分子は、５～２０サイクルの手順で選択される。一実施形態において、不均一系が、最初の選択段階でのみ導入され、反復工程中では行なわない。

【００６８】

ＳＥＬＥＸ^{TM}の一実施形態では、選択プロセスが、選択された標的に非常に強く結合する核酸リガンドの単離において非常に効率的であるため、必要とされるの選択および増幅のサイクル１回だけである。かかる効率的な選択は、例えば、クロマトグラフィー型プロセスで行なわれ得、この場合、カラムに結合された標的と会合する核酸の能力は、該カラムが充分に最高親和性の核酸リガンドの分離および単離を許容させることができるような様式で作用する。

【００６９】

多くの場合、ＳＥＬＥＸ^{TM}の反復的工程を、単一の核酸リガンドが同定されるまで行なうことは、必ずしも望ましくはない。標的特異的核酸リガンド溶液は、いくつかの保存された配列および標的に対する核酸リガンドの親和性に有意に影響を与えることなく置換または付加されたももであり得るいくつか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むものであり得る。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスを完了前に終了させることにより、核酸リガンド溶液のファミリーのいくつかの構成員の配列を決定することが可能である。

【００７０】

さまざまな核酸の一次、二次および三次構造が存在することがわかっている。最も一般的に非ワトソン－クリック型相互作用に関与することが示されている構造またはモチーフは、ヘアピンループ、対称および非対称突出部、シュードノット（ｐｓｅｕｄｏｋｎｏｔ）およびその無数の組合せで呼ばれる。かかるモチーフのほとんどすべての既知の場合、これらは、３０ヌクレオチド以下の核酸配列に形成されたのもであり得ることが示されている。この理由のため、多くの場合、連続ランダム化セグメントを用いるＳＥＬＥＸ^{TM}手順は、約２０～約５０ヌクレオチド、ある一部の実施形態においては約３０～約４０ヌクレオチドのランダム化セグメントを含有する核酸配列で開始することが好ましい。一例において、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。

【００７１】

中心的なＳＥＬＥＸ^{TM}法は、いくつかの特定の目的が達成されるように変形されている。例えば、米国特許第５，７０７，７９６号には、特定の構造的特性を有する核酸分子、例えば、湾曲ＤＮＡを選択するために、ゲル電気泳動と組み合わせたＳＥＬＥＸ^{TM}の使用が記載されている。米国特許第５，７６３，１７７号には、標的分子と結合および／または光架橋できる、および／または標的分子を光不活化できる光反応性基を含有する核酸リガンドを選択するためのＳＥＬＥＸ^{TM}に基づいた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号には、標的分子に対して高親和性および低親和性を有するオリゴヌクレオチドの、高度に効率的な分離を達成するＳＥＬＥＸ^{TM}に基づいた方法が記載されている。米国特許第５，４９６，９３８号には、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスを行なった後に、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号には、リガンドをその標的に共有結合させる方法が記載されている。

【００７２】

ＳＥＬＥＸ^{TM}はまた、標的分子上の１つより多くの部位に結合する核酸リガンドを得るた、および標的上の特異的部位に結合する非核酸種を含む核酸リガンドを得るために使用され得る。ＳＥＬＥＸ^{TM}は、任意の想定され得る標的、例えば、大小の生体分子、例えば、核酸結合タンパク質および核酸結合することがわかっていないタンパク質（その生物学的機能の一部として）、ならびに補因子および他の小分子に結合する核酸リガンドを単離および同定するための手段を提供する。例えば、米国特許第５，５８０，７３７号には、ＳＥＬＥＸ^{TM}により同定された、カフェインおよびその密接に関連した類縁体であるテオフィリンに高親和性で結合できる核酸配列が開示されている。

【００７３】

逆（ｃｏｕｎｔｅｒ－）ＳＥＬＥＸ^{TM}は、１つ以上の非標的分子に対する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り、標的分子に対する核酸リガンドの特異

性を改善する方法である。逆－ＳＥＬＥＸ^{TM}は、（ａ）核酸の候補混合物を調製する工程；（ｂ）候補混合物を標的と接触させる工程、ここで、候補混合物と比べて標的に対して増大した親和性を有する核酸は、候補混合物の残部から分離され得る；（ｃ）増大した親和性核酸を候補混合物の残部から分離する工程；（ｄ）増大した親和性の核酸を標的から解離する工程；ｅ）増大した親和性の核酸を１種類以上の非標的分子と、非標的分子（１つまたは複数）に対して特異的親和性を有する核酸リガンドが除去されるように接触させる工程；ならびにｆ）標的分子に対してのみ特異的親和性を有する核酸を増幅し、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が富化された核酸の混合物を得る工程で構成される。ＳＥＬＥＸ^{TM}について上記のように、選択および増幅のサイクルは、必要に応じて、所望の目的が達成されるまで反復される。

【００７４】

治療剤およびワクチンとしての核酸の使用において遭遇する潜在的な問題の１つは、ホスホジエステル形態であるオリゴヌクレオチドが、所望の効果が発現される前に、細胞内および細胞外酵素、例えば、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼなどによって体液中で急速に分解され得ることである。したがって、ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、リガンドに対して改善された特性、例えば、改善されたインビボ安定性または改善された送達特性などを付与する修飾ヌクレオチドを含有する高親和性核酸リガンドの同定を包含する。かかる修飾の例としては、リボースおよび／またはリン酸基および／または塩基の位置における化学的置換が挙げられる。ＳＥＬＥＸ^{TM}で同定される修飾ヌクレオチド含有核酸リガンドは、例えば、米国特許第５，６６０，９８５号（これには、リボースの２’位、ピリミジンの５位およびプリンの８位が化学的に修飾されたヌクレオチド誘導体を含有するオリゴヌクレオチドが記載されている）米国特許第５，７５６，７０３号（これには、種々の２’修飾ピリミジンを含有するオリゴヌクレオチドが記載されている）、ならびに米国特許第５，５８０，７３７号（これには、２’－アミノ（２’－NH_2）、２’－フルオロ（２’－Ｆ）および／または２’－ＯＭｅ（２’－ＯＭｅ）置換基で修飾された１つ以上のヌクレオチドを含有する高度に特異的な核酸リガンドが記載されている）に記載されている。

【００７５】

本発明において想定される核酸リガンドの修飾としては、限定されないが、さらなる電荷、分極性、疎水性、水素結合、静電気的相互作用および流動性を、核酸リガンド塩基または核酸リガンド全体に組み込む他の化学的基を提供するものが挙げられる。ヌクレアーゼに抵抗性であるオリゴヌクレオチド集団を作製するための修飾もまた、１つ以上の置換ヌクレオチド間結合、改変糖鎖、改変塩基またはその組合せを含み得る。かかる修飾としては、限定されないが、２’位の糖鎖修飾、５位のピリミジン修飾、８位のプリン修飾、環外アミンの修飾、４－チオウリジンの置換、５－ブロモまたは５－ヨード－ウラシルの置換；主鎖修飾、ホスホロチオエートまたはリン酸アルキル修飾、メチル化および特異な塩基対合組合せ、例えば、イソ塩基（ｉｓｏｂａｓｅ）であるイソシチジンとイソグアニジンが挙げられる。修飾にはまた、キャッピングなどの３’および５’の修飾も含まれ得る。

【００７６】

一実施形態において、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_2（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯもしくはCH_2（「ホルムアセタール」）または３’－アミン（－ＮＨ－CH_2－CH_2－）（式中、各ＲまたはＲ’は独立して、Ｈまたは置換もしくは非置換のアルキルである）で置き換えられたオリゴヌクレオチドが提供される。結合基は隣接するヌクレオチドに、－Ｏ－、－Ｎ－または－Ｓ－結合を介して結合され得る。オリゴヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。本明細書で用いる場合、用語ホスホロチオエートは、１つ以上のイオウ原子で置き換えられたホスホジエステル結合内の１つ以上の非橋絡酸素原子を包含する。

【００７７】

さらなる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾された糖鎖基を含み、例えば、ヒドロキシル基の１つ以上が、ハロゲン、脂肪族基で置き換えられているか、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。一実施形態において、フラノース残基の２’位は、ＯＭｅ、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で置換されている。２’－修飾糖の合成方法は、例えば、Ｓｐｒｏａｔ，ら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１９：７３３－７３８（１９９１）；Ｃｏｔｔｅｎ，ら，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１９：２６２９－２６３５（１９９１）；およびＨｏｂｂｓ，ら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１２：５１３８－５１４５（１９７３）に記載されている。他の修飾は当業者に知られている。かかる修飾は、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前の修飾であってもよく、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後の修飾（以前に同定された非修飾リガンドの修飾）であってもよく、またはＳＥＬＥＸプロセスに組み込んでもよい。

【００７８】

ＳＥＬＥＸプロセス前の修飾またはＳＥＬＥＸプロセスに組み込まれたものにより、そのＳＥＬＥＸ^{TM}標的に対する特異性と、改善された安定性（例えば、インビボ安定性）の両方を有する核酸リガンドがもたらされる。核酸リガンドに行なわれたＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後の修飾により、核酸リガンドの結合能力に悪影響を及ぼすことなく、改善された安定性（例えば、インビボ安定性）がもたらされ得る。

【００７９】

ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、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組み合わせることを包含し、これは、米国特許第５，６３７，４５９号および米国特許第５，６８３，８６７号に記載されている。ＳＥＬＥＸ^{TM}法は、さらに、選択された核酸リガンドを親油性または非免疫原性高分子量化合物と、診断用または治療用複合体に組み合わせることを包含し、これは、例えば、米国特許第６，０１１，０２０号、米国特許第６，０５１，６９８号およびＰＣＴ公開公報ＷＯ　９８／１８４８０に記載されている。これらの特許および出願書類には、広範な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特性ならびに他の分子の望ましい特性との組合せが教示されている。

【００８０】

核酸リガンドを、ＳＥＬＥＸ^{TM}法によってフレキシブル小ペプチドに同定することが探求されている。小ペプチドは柔軟性のある構造を有し、通常、溶液中で多数の配座異性体の平衡状態で存在し、したがって、最初は、結合親和性は、フレキシブルペプチドに結合されると、配座エントロピーの低下によって制限され得ると考えられていた。しかしながら、核酸リガンドを溶液中の小ペプチドに同定することの実現可能性は、米国特許第５，６４８，２１４号に示された。この特許には、１１アミノ酸の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。

【００８１】

本発明の標的（１つまたは複数）に対して特異性および結合親和性を有するアプタマーは、典型的には、本明細書に記載のＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスによって選択される。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスの一部として、標的に結合させるために選択された配列を、次いで、所望の結合親和性を有する最小配列を決定するために、任意選択で最小化する。選択された配列および／または最小化された配列は、任意選択で、結合親和性が増大されるように、あるいはまた該配列内のどの位置が結合活性に不可欠であるかが決定されるように該配列のランダムまたは特異的（ｄｉｒｅｃｔｅｄ）変異誘発を行なうことにより最適化される。さらに、選択は、アプタマー分子をインビボ分解に対して安定化させる修飾ヌクレオチドが組み込まれた配列を用いて行なわれ得る。

【００８２】

２’修飾ＳＥＬＥＸ^{TM}

アプタマーが治療剤としての使用に適するようにするため、インビボで安全で安定に合成することが安価であることが好ましい。野生型ＲＮＡおよびＤＮＡアプタマーは、そのヌクレアーゼによる分解に対する感受性のため、典型的にはインビボで安定ではない。ヌ

クレアーゼ分解に対する抵抗性は、２’位における修飾基の組込みによって大きく増大され得る。

【００８３】

フルオロおよびアミノ基は、オリゴヌクレオチドライブラリー内に成功裏に組み込まれており、続いて、これからアプタマー選択された。しかしながら、このような修飾は、得られるアプタマーの合成のコストを大きく増大させ、場合によっては、修飾されたオリゴヌクレオチドが分解され、続いて該ヌクレオチドがＤＮＡ合成の基質として利用されることによって修飾ヌクレオチドが宿主ＤＮＡ内に再利用され得るという可能性のため、安全性の懸念が誘導され得る。

【００８４】

２’－ＯＭｅ（「２’－ＯＭｅ」）ヌクレオチドを含有するアプタマーは、本明細書のある一部の実施形態において提供しているが、これは、これらの欠点の多くを克服している。Ｔ－ＯＭｅヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ抵抗性であり、安価に合成される。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、生理学的条件下で２’－Ｏ－メチルＮＴＰを基質として受容せず、したがって、宿主ＤＮＡ内への２’－ＯＭｅヌクレオチドの再利用に対する安全性の懸念はない。２’－修飾アプタマーを作製するために使用されるＳＥＬＥＸ^{TM}法は、例えば、米国特許仮出願第６０／４３０，７６１号（２００２年１２月３日出願）、米国特許仮出願第６０／４８７，４７４号（２００３年７月１５日出願）、米国特許仮出願第６０／５１７，０３９号（２００３年１１月４日出願）、米国特許出願第１０／７２９，５８１号（２００３年１２月３日出願）および米国特許出願第１０／８７３，８５６号（２００４年６月２１日出願）、発明の名称「２’－ＯＭｅ置換核酸のインビトロ選択方法」（これらの各々は、引用により、その全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００８５】

本発明は、オリゴヌクレオチドを非修飾オリゴヌクレオチドよりも、酵素的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ために、修飾ヌクレオチド（例えば、２’位に修飾を有するヌクレオチド）を含有する補体タンパク質Ｃ５に結合し、その機能をモジュレートするアプタマーを含む。２’－ＯＭｅ含有アプタマーのいくつかの例が文献にあるが（例えば、Ｇｒｅｅｎら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２，６８３－６９５，１９９５を参照のこと）、これらは、ＣおよびＵ残基が２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換され、ＡおよびＧ残基が２’－ＯＨである修飾転写物のライブラリーのインビトロ選択によって作製されたものである。いったん機能配列を同定したら、次いで、各ＡおよびＧ残基を２’－ＯＭｅ置換に対する許容性について試験され、２’－ＯＭｅ残基として２’－ＯＭｅ置換に許容性であるすべてのＡおよびＧ残基を有するアプタマーが、再合成された。この２工程様式で作製されたアプタマーのＡおよびＧ残基の大部分は、２’－ＯＭｅ残基による置換に許容性であるが、平均およそ２０％はそうでない。その結果、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残基を含む傾向があり、安定性と合成コストが、結果として妥協される。アプタマーが選択され、ＳＥＬＥＸ^{TM}（および／または任意のそのバリエーションおよび改善形、例えば、本明細書に記載のもの）によって富化されるオリゴヌクレオチドプールに使用される安定化されたオリゴヌクレオチドをもたらす修飾ヌクレオチドを転写反応物内に組み込むことにより、本発明の方法は、選択されたアプタマーオリゴヌクレオチドを安定化させる必要性（例えば、修飾ヌクレオチドを有するアプタマーオリゴヌクレオチドを再合成することにより）を排除する。

【００８６】

一実施形態において、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修飾の組合せ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、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_2および２’－メトキシエチル修飾の組合せ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、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_2および２’－メトキシエチル修飾の５^{6}の組合せを含むアプタマーを提供する。

【００８７】

本発明の２’修飾アプタマーは、野生型ポリメラーゼよりも高い組込み比率でバルキー置換基をフラノースの２’位に有する修飾ヌクレオチドをを有する修飾ポリメラーゼ（例えば、修飾されたＴ７ポリメラーゼ）を用いて創製される。例えば、６３９位のチロシン残基がフェニルアラニンに変更された単一変異型Ｔ７ポリメラーゼ（Ｙ６３９Ｆ）は、容易に、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）を基質として利用し、さまざまな適用のための修飾ＲＮＡの合成に広く使用されている。しかしながら、この変異型Ｔ７ポリメラーゼは、報告によれば、２’－ＯＭｅまたは２’－アジド（２’－N_3）置換基などのバルキー２’－置換基を有するＮＴＰを容易に利用　（すなわち、組み込む）することができない。バルキー２’－置換基の組込みのため、Ｙ６３９Ｆ変異に加えて、７８４位のヒスチジンがアラニン残基に変更された二重Ｔ７ポリメラーゼ変異型（Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ）が報告されており、修飾ピリミジンＮＴＰを組み込む限定的な環境で使用されている。Ｐａｄｉｌｌａ，Ｒ．および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更された単一変異型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。Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ二重変異型およびＨ７８４Ａ単一変異型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、よりバルキーなヌクレオチド基質、例えば、２’－Ｏメチル置換ヌクレオチドの組込みが可能になる。

【００８８】

一般的に、本明細書に開示した条件下で、Ｙ６９３Ｆ単一変異型は、ＧＴＰ以外すべての２’－ＯＭｅ置換ＮＴＰの組込みのために使用され得、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ二重変異型は、ＧＴＰを含むすべての２’－ＯＭｅ置換ＮＴＰの組込みのために使用され得ることがわかった。Ｈ７８４Ａ単一変異型は、本明細書に開示した条件下で用いた場合、Ｙ６３９ＦおよびＹ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ変異型と同様の性質を有することが予想される。

【００８９】

２’－修飾オリゴヌクレオチドは、完全に合成された修飾ヌクレオチドであってもよく、修飾ヌクレオチドの一部（サブセット）を有するものであってもよい。修飾は同じであっても異なるものであってもよい。すべてのヌクレオチドが修飾されていてもよく、すべてが同じ修飾を含むものであってもよい。すべてのヌクレオチドが修飾されているが、異なる修飾を含むものであってもよく、例えば、同じ塩基を含有するすべてのヌクレオチドが、１つの型の修飾を有するものであってもよく、一方、違う塩基を含有するヌクレオチドが異なる型の修飾を有するものであってもよい。すべてのプリンヌクレオチドが１つの型の修飾を有する（または非修飾である）ものであってもよく、一方、すべてのピリミジンヌクレオチドが別の異なる型の修飾を有する（または非修飾である）ものであってもよい。このように、転写物または転写物のプールは、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修飾の任意の組合せを用いて作製される。２’－ＯＭｅ　ＣおよびＵならびに２’－ＯＨ　ＡおよびＧを含む転写混合物を「ｒＲｍＹ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｒＲｍＹ」アプタマーと称する。デオキシＡおよびＧならびに２’－ＯＭｅ　ＵおよびＣを含む転写混合物を「ｄＲｍＹ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｄＲｍＹ」アプタマーと称する。２’－ＯＭｅ　Ａ、ＣおよびＵならびに２’－ＯＨ　Ｇを含む転写混合物を「ｒＧｍＨ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｒＧｍＨ」アプタマーと称する。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を択一的に（ａｌｔｅｒｎａｔｅｌｙ）含む転写混合物を「択一的混合物」と称し、これから選択されるアプタマーを「

択一的混合物」アプタマーと称する。２’－ＯＭｅ　Ａ、Ｕ、ＣおよびＧ（ここで、Ｇの１０％までがリボヌクレオチドである）を含む転写混合物を「ｒ／ｍＧｍＨ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｒ／ｍＧｍＨ」アプタマーと称する。２’－ＯＭｅ　Ａ、ＵおよびＣならびに２’－Ｆ　Ｇを含む転写混合物を、「ｆＧｍＨ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｆＧｍＨ」アプタマーと称する。２’－ＯＭｅ　Ａ、ＵおよびＣならびにデオキシＧを含む転写混合物を「ｄＧｍＨ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｄＧｍＨ」アプタマーと称する。デオキシＡならびに２’－ＯＭｅ　Ｃ、ＧおよびＵを含む転写混合物を「ｄＡｍＢ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｄＡｍＢ」アプタマーと称し、すべての２’－ＯＨ　ヌクレオチドを含む転写混合物を「ｒＮ」混合物と称し、これから選択されるアプタマーを「ｒＮ」または「ｒＲｒＹ」アプタマーと称する。「ｍＲｍＹ」アプタマーは、すべての２’－ＯＭｅヌクレオチドを含むものであって、通常、ｒ／ｍＧｍＨオリゴヌクレオチドから、ＳＥＬＥＸ後置換（可能な場合は、２’－ＯＭｅ　Ｇによる任意の２’－ＯＨ　Ｇの置換）によって誘導される。

【００９０】

好ましい実施形態としては、２’－ＯＨ、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの任意の組合せが挙げられる。より好ましい実施形態としては、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの任意の組合せが挙げられる。さらにより好ましい実施形態は、２’－デオキシおよび２’－ＯＭｅヌクレオチドの任意の組合せによるものであって、ピリミジンが２’－ＯＭｅであるもの（例えば、ｄＲｍＹ、ｍＲｍＹまたはｄＧｍＨなど）である。

【００９１】

本発明のアプタマーへの修飾ヌクレオチドの組込みは、選択プロセスの前（ｂｅｆｏｒｅ／ｐｒｅ－））（例えば、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前修飾）になされる。任意選択で、修飾ヌクレオチドがＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前修飾によって組み込まれた本発明のアプタマーは、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後修飾（すなわち、ＳＥＬＥＸ^{TM}前修飾後にＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後修飾）によってさらに修飾され得る。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前修飾により、ＳＥＬＥＸ^{TM}標的に対する特異性、また改善されたインビボ安定性を有する修飾核酸リガンドがもたらされる。ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス後修飾、すなわち、修飾（例えば、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前修飾によってヌクレオチドが組み込まれた先に同定されたリガンドの切断、欠失、置換またはさらなるヌクレオチド修飾）により、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセス前修飾によってヌクレオチドが組み込まれた核酸リガンドの結合能力に悪影響を及ぼすことなく、インビボ安定性のさらなる改善がもたらされ得る。

【００９２】

２’－修飾（例えば、２’－ＯＭｅ）ＲＮＡ転写物のプールをポリメラーゼが２’－修飾ＮＴＰを受容する条件下で作製するための、好ましいポリメラーゼは、Ｙ６９３Ｆ／Ｈ７８４Ａ二重変異型またはＹ６９３Ｆ単一変異型である。他のポリメラーゼ、特に、バルキー２’－置換基に対して高い許容性を示すものもまた本発明において使用され得る。かかるポリメラーゼは、この能力について、本明細書に開示された転写条件下で修飾ヌクレオチドを組み込む能力をアッセイすることによりスクリーニングされ得る。

【００９３】

いくつかの因子が、本明細書に開示された方法に有用な転写条件に重要であることが測定された。例えば、リーダー配列を、ＤＮＡ転写鋳型の５’末端の固定配列の５’末端に、得られる転写物の最初の少なくとも約６個の残基がすべてのプリンとなるように組み込んだ場合、修飾転写物の収率の増加が観察される。

【００９４】

修飾ヌクレオチドが組み込まれた転写物の取得における別の重要な要素は、２’－ＯＨ　ＧＴＰの存在または濃度である。転写は、２つの段階に分けられ得る。第１段階は開始であり、この間に、ＮＴＰがＧＴＰ（または別の置換されたグアノシン）の３’－ヒドロキシル末端に付加され、ジヌクレオチドがもたらされ、これは、次いで、約１０～１２ヌ

クレオチド伸長される。第２段階は伸長であり、この間に、転写が、最初の約１０～１２ヌクレオチドの付加を超えて進行する。過剰の２’－ＯＭｅ　ＧＴＰを含有する転写混合物に付加される少量の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を可能にするのに充分であるが、いったん転写が伸長段階に入ると、２’－ＯＭｅと２’－ＯＨ　ＧＴＰ間の区別が低減し、２’－ＯＨ　ＧＴＰに対して２’－ＯＭｅ　ＧＴＰが過剰となることにより、主として２’－ＯＭｅ　ＧＴＰの組込みが可能になることがわかった。

【００９５】

転写物への２’－ＯＭｅ置換ヌクレオチドの組込みにおける別の重要な因子は、ともに二価のマグネシウムおよびマンガンの転写混合物における使用である。塩化マグネシウムおよび塩化マンガンの濃度の種々の組合せが、２’－ＯＭｅ転写物の収率に影響を及ぼし、マグネシウムとマンガンの塩化物の最適濃度は、二価金属イオンと錯体形成するＮＴＰの転写反応混合物中の濃度に依存することがわかった。最大限に２’置換されたＯＭｅ転写物（すなわち、すべてのＡ、ＣおよびＵならびにＧヌクレオチドの約９０％）の最大収率を得るためには、各ＮＴＰが０．５ｍＭの濃度で存在する場合、およそ５ｍＭ塩化マグネシウムおよび１．５ｍＭ塩化マンガンの濃度が好ましい。各ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭである場合、およそ６．５ｍＭ塩化マグネシウムおよび２．０ｍＭ塩化マンガンの濃度が好ましい。各ＮＴＰの濃度が２．０ｍＭである場合、およそ９．６ｍＭ塩化マグネシウムおよび２．９ｍＭ塩化マンガンの濃度が好ましい。いずれの場合でも、これらの濃度から２倍まで逸脱しても、なお有意な量の修飾転写物が得られる。

【００９６】

転写をＧＭＰまたはグアノシンで初回刺激すること（ｐｒｉｍｉｎｇ）もまた重要である。この効果は、最初のヌクレオチドに対するポリメラーゼの特異性に起因する。その結果、この様式で作製された任意の転写物の５’末端ヌクレオチドは、おそらく２’－ＯＨ　Ｇとなる。ＧＭＰ（またはグアノシン）の好ましい濃度は０．５ｍＭであり、さらにより好ましくは１ｍＭである。また、ＰＥＧ、好ましくはＰＥＧ－８０００を転写反応物中に含めることは、修飾ヌクレオチドの組込みを最大限にするのに有用であることがわかった。

【００９７】

転写物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ（１００％）、ＵＴＰ（１００％）、ＣＴＰ（１００％）およびＧＴＰ（約９０％）（「ｒ／ｍＧｍＨ」）の最大限の組込みのためには、下記の条件：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭである場合は６．５ｍＭ）、$MnCl_2$　１．５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度が１．０ｍＭである場合は２．０ｍＭ）、２’－ＯＭｅ　ＮＴＰ（各々）５００μＭ　（より好ましくは、１．０ｍＭ）、２’－ＯＨ　ＧＴＰ　３０μＭ、２’－ＯＨ　ＧＭＰ　５００μＭ、ｐＨ７．５、Ｙ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。本明細書で用いる場合、１単位のＹ６３９Ｆ／Ｈ７８４Ａ変異型Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ（または本明細書において特定される任意の他の変異型Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ）は、ｒ／ｍＧｍＨ条件下で１ｎｍｏｌの２’－ＯＭｅ　ＮＴＰを転写物中に組み込むのに必要とされる酵素の量と規定する。本明細書で用いる場合、１単位の無機ピロホスファターゼは、ｐＨ７．２および２５℃で１分あたり１．０モルの無機オルトホスフェートを遊離させる酵素の量と規定する。

【００９８】

転写物への２’－ＯＭｅ　ＡＴＰ、ＵＴＰおよびＣＴＰ（「ｒＧｍＨ」）の最大限の組込み（１００％）のためには、下記の条件：ＨＥＰＥＳバッファー２００ｍＭ、ＤＴＴ　４０ｍＭ、スペルミジン２ｍＭ、ＰＥＧ－８０００　１０％（ｗ／ｖ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．０１％（ｗ／ｖ）、$MgCl_2$　５ｍＭ（各２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃

度が２．０mMである場合は９．６mM）、$MnCl_2$　１．５mM（各２’－OMe　NTPの濃度が２．０mMである場合は２．９mM）、２’－OMe　NTP（各々）５００μM　（より好ましくは、２．０mM）、pH７．５、Y６３９F　T７　RNAポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。

【００９９】

転写物への２’－OMe　UTPおよびCTP（「ｒRmY」）の最大限の組込み（１００％）のためには、下記の条件：HEPESバッファー２００mM、DTT　４０mM、スペルミジン２mM、PEG－８０００　１０％（w／v）、Triton　X－１００　０．０１％（w／v）、$MgCl_2$　５mM（各２’－OMe　NTPの濃度が２．０mMである場合は９．６mM）、$MnCl_2$　１．５mM（各２’－OMe　NTPの濃度が２．０mMである場合は２．９mM）、２’－OMe　NTP（各々）５００μM　（より好ましくは、２．０mM）、pH７．５、Y６３９F／H７８４A　T７　RNAポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。

【０１００】

転写物へのデオキシATPおよびGTPならびに２’－OMe　UTPおよびCTP（「ｄRmY」）の最大限の組込み（１００％）のためには、下記の条件：HEPESバッファー２００mM、DTT　４０mM、スペルミン２mM、スペルミジン２mM、PEG－８０００　１０％（w／v）、Triton　X－１００　０．０１％（w／v）、$MgCl_2$　９．６mM、$MnCl_2$　２．９mM、２’－OMe　NTP（各々）２．０mM、pH７．５、Y６３９F　T７RNAポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。

【０１０１】

転写物への２’－OMe　ATP、UTPおよびCTPならびに２’－F　GTP（「ｆGmH」）の最大限の組込み（１００％）のためには、下記の条件：HEPESバッファー２００mM、DTT　４０mM、スペルミジン２mM、PEG－８０００　１０％（w／v）、Triton　X－１００　０．０１％（w／v）、$MgCl_2$　９．６mM、$MnCl_2$　２．９mM、２’－OMe　NTP（各々）２．０mM、pH７．５、Y６３９F　T７RNAポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。

【０１０２】

転写物へのデオキシATPならびに２’－OMeUTP、GTPおよびCTP（「ｄAmB」）の最大限の組込み（１００％）のためには、下記の条件：HEPESバッファー２００mM、DTT　４０mM、スペルミジン２mM、PEG－８０００　１０％（w／v）、Triton　X－１００　０．０１％（w／v）、$MgCl_2$　９．６mM、$MnCl_2$　２．９mM、２’－OMe　NTP（各々）２．０mM、pH７．５、Y６３９F　T７RNAポリメラーゼ１５単位／ｍｌ、無機ピロホスファターゼ５単位／ｍｌ、および少なくとも８ヌクレオチド長の全プリンリーダー配列が好ましい。

【０１０３】

上記（ａ）の各々について、転写は、好ましくは、約２０℃～約５０℃、好ましくは約３０℃～４５℃の温度、より好ましくは約３７℃で、少なくとも２時間の間行なわれ、（ｂ）では、５０～３００nMの二本鎖DNA転写鋳型が使用され（２００nMの鋳型は、第１回目に多様性を増大させるために使用される（３００nMの鋳型はｄRmY転写において使用される））、後続の回では、およそ５０nM（最適化PCR反応物の１／１０希釈度）が、本明細書に記載の条件を用いて使用される）。好ましいDNA転写鋳型を後述する（ここで、ARC２５４およびARC２５６は、すべての２’－OMe条件下で転写を行ない、ARC２５５は、ｒRmY条件下で転写を行なう）。

【０１０４】

【化７】

ARC254 (配列番号 99):

5'-CATCGATGCTAGTCGTAACGATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCGAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ARC255 (配列番号 100):

5'-CATGCATCGCGACTGACTAGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

ARC256 (配列番号 101):

5'-CATCGATCGATCGATCGACAGCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTAGAACGTTCTCTCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA--3'

本発明のｒＮ転写条件下では、転写反応混合物は、２'－ＯＨアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）、２'－ＯＨグアノシン三リン酸（ＧＴＰ）、２'－ＯＨシチジン三リン酸（ＣＴＰ）および２'－ＯＨウリジン三リン酸（ＵＴＰ）を含む。本発明のｒＮ転写混合物を用いて作製される修飾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'－ＯＨシチジンおよび２'－ＯＨウリジンを含む。ｒＮ転写の好ましい実施形態において、得られる修飾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'－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では、得られる本発明の修飾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では、本発明の修飾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。

【０１０５】

本発明のｒＲｍＹ転写条件下では、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'－ＯＭｅシチジン三リン酸および２'－ＯＭｅ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作製される修飾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'－ＯＭｅシチジンおよび２'－ＯＭｅウリジンを含む。好ましい実施形態では、得られる修飾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'－ＯＭｅ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'－ＯＭｅウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態では、得られる修飾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'－ＯＭｅシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチド少なくとも９０％が２'－ＯＭｅウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。

【０１０６】

本発明のｄＲｍＹ転写条件下では、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転写条件を用いて作製される修飾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。好ましい実施形態では、得られる本発明の修飾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では、得られる本発明の修飾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では、得られる本発明の修飾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。

【０１０７】

本発明のｒＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＨグアノシン三リン酸、２’－ＯＭｅシチジン三リン酸、２’－ＯＭｅウリジン三リン酸および２’－ＯＭｅ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作製される修飾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’－ＯＭｅシチジン、２’－ＯＭｅウリジンおよび２’－ＯＭｅアデノシンを含む。好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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、得られる修飾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’－ＯＭｅシチジンであり、すべてのウリジンヌクレオチド少なくとも９０％が２’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅアデノシンである配列を含む。

【０１０８】

本発明のｒ／ｍＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＭｅアデノシン三リン酸、２’－ＯＭｅシチジン三リン酸、２’－ＯＭｅグアノシン三リン酸、２’－ＯＭｅ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作製して得られる修飾オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての２’

－ＯＭｅアデノシン、２’－ＯＭｅシチジン、２’－ＯＭｅグアノシンおよび２’－ＯＭｅ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、最大約１０％の２’－ＯＨグアノシンを有する。好ましい実施形態では、得られる本発明のｒ／ｍＧｍＨ修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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。より好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチド少なくとも９０％が２’－ＯＭｅ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グアノシンであるである配列を含む。最も好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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。

【０１０９】

本発明のｆＧｍＨ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－ＯＭｅアデノシン三リン酸、２’－ＯＭｅウリジン三リン酸、２’－ＯＭｅ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転写条件を用いて作製される修飾オリゴヌクレオチドは、実質的にすべての２’－ＯＭｅアデノシン、２’－ＯＭｅウリジン、２’－ＯＭｅシチジンおよび２’－Ｆグアノシンを含む。好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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。

【０１１０】

本発明のｄＡｍＢ転写条件下では、転写反応混合物は、２’－デオキシアデノシン三リン酸、２’－ＯＭｅシチジン三リン酸、２’－ＯＭｅグアノシン三リン酸および２’－ＯＭｅ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作製される修飾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’－ＯＭｅシチジン、２’－ＯＭｅグアノシンおよび２’－ＯＭｅウリジンを含む。好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。より好ましい実施形態では、得られる修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅグアノシンであり、すべてのウリジンヌクレオチド少なくとも９０％が２’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。最も好ましい実施形態では、得られる本発明の修飾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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅ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’－ＯＭｅウリジンである配列を含む。

【０１１１】

各場合において、転写産物は、次いで、アプタマーを同定するため、および／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されたモチーフを決定するために、ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスにおけるライブラリーとして使用され得る。得られる配列は既に安定化されており、この工程は安定化されたアプタマー配列に達するプロセスから排除され、より高度に安定化されたアプタマーが結果として得られる。２’－ＯＭｅ　ＳＥＬＥＸ^{TM}プロセスの別の利点は、得られる配列が、配列に必要とされる２’－ＯＨヌクレオチドを有することがより少ないこと、おそらくない可能性が高いことである。２’ＯＨヌクレオチドは、残留する範囲内で、ＳＥＬＥＸ後修飾を行なうことにより除去してもよい。

【０１１２】

後述するように、２’置換ヌクレオチドが充分に組み込まれた、少量だがなお有用な収率の転写物は、上記の最適化された条件以外の条件下で得られ得る。例えば、上記の転写条件に対するバリエーションとしては、以下のものが挙げられる。

【０１１３】

ＨＥＰＥＳバッファー濃度は０～１Ｍの範囲であり得る。本発明ではまた、５～１０のｐＫａを有する他の緩衝剤、例えば、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなどの使用が想定される。

【０１１４】

ＤＴＴの濃度は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などの使用を提供する。

【０１１５】

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。

【０１１６】

ＰＥＧ－８０００の濃度は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などの使用を提供する。

【０１１７】

Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００の濃度は０～０．１％（ｗ／ｖ）の範囲であり得る。本発明の方法はまた、他の非イオン系デタージェント、例えば、他のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　デタージェントなどの他のデタージェントの使用を提供する。

【０１１８】

$MgCl_2$の濃度は０．５ｍＭ～５０ｍＭの範囲であり得る。$MnCl_2$の濃度は０．１５ｍＭ～１５ｍＭの範囲であり得る。$MgCl_2$および$MnCl_2$の両方が記載の範囲内で存在しなければならず、好ましい実施形態では、約１０～約３の比の$MgCl_2$：$MnCl_2$が存在し、好ましくは、該比は約３～５：１であり、より好ましくは、該比は約３～４：１である。

【０１１９】

２’－ＯＭｅ　ＮＴＰの濃度（各ＮＴＰ）は、５μＭ～５ｍＭの範囲であり得る。

【０１２０】

２’－ＯＨ　ＧＴＰの濃度は、０μＭ～３００μＭの範囲であり得る。

【０１２１】
２’－ＯＨ　ＧＭＰの濃度は、０～５ｍＭの範囲であり得る。
【０１２２】
ｐＨはｐＨ６～ｐＨ９の範囲であり得る。本発明の方法は、修飾ヌクレオチドが組み込まれた大部分のポリメラーゼが活性なｐＨ範囲内で行なわれ得る。また、本発明の方法は、転写反応条件におけるキレート化剤、例えば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡおよびＤＴＴなどの任意選択的使用を提供する。
【０１２３】
下記の実施例で記載するような生物学的アッセイによって示される最も高い親和性および特異的結合性を有する選択されたアプタマーは、Ｃ５補体タンパク質が病因に関与している状態を処置するのに好適な治療剤である。
【０１２４】
補体系タンパク質Ｃ５に対する結合親和性を有するアプタマー
補体系は、健康の維持において重要な役割を有するが、疾患を引き起こすか、または疾患に寄与する可能性を有する。したがって、治療剤用途のための補体系のインヒビター開発することが望ましい。補体タンパク質Ｃ５のインヒビターを開発することは、これが、補体活性化カスケードの古典的経路および第二経路の両方の成分であるため（ＭａｔｉｓおよびＲｏｌｌｉｎｓ（１９９５）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　１（８）：８３９－８４２）、特に望ましい。したがって、Ｃ５の阻害により、いずれかの経路によって引き起こされる補体媒介性損傷が予防され得る。一部の補体系タンパク質、例えば、Ｃ１ｑおよびＣ３などは、微生物に対する正常な防御機構ならびに免疫成分および損傷組織のクリアランスにおいて重要である。しかしながら、Ｃ５は、これらの機能に対して相対的に重要性が低い。したがって、Ｃ５機能は、短期間または長期間、補体系の保護的役割を損なうことなく阻害され得る。
【０１２５】
治療用Ｃ５インヒビターはまた、Ｃ５の切断を阻害することにより、２種類の潜在的に障害性の補体活性の生成が抑制されるため、望ましい。第１に、Ｃ５の切断によるＣ５ａの生成を阻害することにより、主要な補体化学走化性および血管作用性活性が排除される。第２に、Ｃ５の切断によるＣ５ｂの生成を阻害することにより、細胞溶解性Ｃ５ｂ－９膜攻撃複合体（「ＭＡＣ」）の合成がブロックされる。Ｃ５切断の阻害により、白血球および組織（例えば、内皮細胞など）に対するＣ５ａおよびＣ５ｂ両方の効果がブロックされる（Ｗａｒｄ（１９９６）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１４９：１０７９）。
【０１２６】
Ｃ５ａおよびＭＡＣはともに、ヒト疾患と関連する急性および慢性の炎症に関与しており、疾患状態におけるその役割は、動物モデルで確認されている。Ｃ５ａは、補体および好中球依存性肺血管外傷に必要とされ（Ｗａｒｄ（１９９７）Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２９：４００；Ｍｕｌｌｉｇａｎら，（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９８：５０３）、ショックおよび火傷における好中球および血小板活性化と関連している（Ｓｃｈｍｉｄら，（１９９７）Ｓｈｏｃｋ　８：１１９）。ＭＡＣは、急性自己免疫重症筋無力症における筋肉損傷（Ｂｉｅｓｅｃｋｅｒ　ａｎｄ　Ｇｏｍｅｚ（１９８９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４２：２６５４）、移植における臓器拒絶（Ｂａｌｄｗｉｎら，（１９９５）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ　５９：７９７；Ｂｒａｕｅｒら，（１９９５）Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ　５９：２８８；Ｔａｋａｈａｓｈｉら，（１９９７）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．１６：２７３）、および自己免疫糸球体腎炎における腎臓系の損傷（Ｂｉｅｓｅｃｋｅｒ（１９８１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．３９：１７７９；Ｎａｎｇａｋｕ（１９９７）Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔ．５２：１５７０）を媒介する。Ｃ５ａおよびＭＡＣはともに、急性心筋虚血（ＨｏｍｅｉｓｔｅｒおよびＬｕｃｃｈｅｓｉ（１９９４）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３４：１７）、急性（Ｂｅｄｎａｒら，（１９９７）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．８６：１３９）および慢性のＣＮＳ損傷（Ｍｏｒｇａｎ（１９９７）Ｅｘｐ．Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．１

４：１９）、体外循環中の白血球活性化（Ｓｕｎら，（１９９５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２３：２９０９；ＳｐｙｃｈｅｒおよびＮｙｄｅｇｇｅｒ（１９９５）Ｉｎｆｕｓｈｉｏｎｓｔｈｅｒ．Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎｓｍｅｄ．２２：３６）ならびに自己免疫疾患、例えば、関節炎および狼瘡と関連する組織損傷（Ｗａｎｇら，（１９９６）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ９３：８５６３）に関与している。

【０１２７】

補体活性化はまた、糖尿病性網膜症に関与しており、網膜血管損傷を悪化または刺激し得る（Ｚｈａｎｇら，（２００２）Ｄｉａｂｅｔｅｓ ５１：３４９９）。低レベルの恒常的補体活性化は、非糖尿病の目において普通に起こり、非糖尿病ラットの目においてＭＡＣおよび補体調節タンパク質の存在によって証明されており、補体調節不全は糖尿病患者において起こることを示す（Ｓｏｈｎら，（２０００）ＩＯＶＳ ４１：３４９２）。また、Ｃ５ｂ－９沈着が糖尿病ヒトドナー由来の網膜血管において検出されているが、非糖尿病ヒトドナーには非存在であり（Ｚｈａｎｇら）、ＣＤ５５およびＣＤ５９の発現低下が糖尿病患者の網膜において示されており（Ｚｈａｎｇら）、グリコシル化されたＣＤ５９が、糖尿病患者由来の尿中に存在するが、非糖尿病患者には存在しない（Ａｃｏｓｔａら，（２００２）ＰＮＡＳ ９７，５４５０－５４５５）。さらに、補体および脈管系は、Ｉ型糖尿病において活性化されていることが知られている。例えば、Ｈａｎｓｅｎ，Ｔ．Ｋ．ら，Ｄｉａｂｅｔｅｓ，５３：１５７０－１５７６（２００４）を参照のこと。Ｃ５ａは内皮細胞を、免疫系および補体系との相互作用により活性化する。例えば、Ａｌｂｒｅｃｈｔ，Ｅ．Ａ．ら，Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ，１６４：８４９－８５９（２００４）を参照のこと。脈管系は、糖尿病性網膜症などの眼疾患において活性化されている。例えば、Ｇｅｒｔ，Ｖ．Ｂ．ら，Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ，４３：１１０４－１１０８（２００２）を参照のこと。補体系はまた、糖尿病性網膜症において活性化されている。例えば、Ｇｅｒｔ，Ｖ．Ｂ．ら，Ｉｎｖｅｓｔ Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ Ｖｉｓ Ｓｃｉ，４３：１１０４－１１０８（２００２）およびＢａｄｏｕｉｎ，Ｃら，Ａｍ Ｊ Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ，１０５：３８３－３８８（１９８８）を参照のこと。

【０１２８】

ある一部の実施形態において、本発明の材料は、インビボおよび／または細胞系アッセイにおいて、補体タンパク質Ｃ５に特異的に結合し、補体タンパク質Ｃ５の活性を機能的にモジュレートする約１５～約６０ヌクレオチド長の一連の核酸アプタマーを含む。

【０１２９】

補体タンパク質Ｃ５に特異的に結合でき、モジュレートすることができるアプタマーを本明細書に記載する。このようなアプタマーは、低毒性、安全性、ならびにさまざまな補体関連疾患または障害、例えば、補体関連心臓障害（例えば、心筋損傷；冠動脈バイパス移植（ＣＡＢＧ）術に関連するＣ５媒介性補体合併症（例えば、術後出血など）、全身性好中球および白血球活性化、心筋梗塞のリスク増大、ならびに認知機能不全の増大；再狭窄；ならびに経皮的冠動脈インターベンションに関連するＣ５媒介性補体合併症）、虚血－再灌流障害（例えば、心筋梗塞、脳卒中、凍傷）、補体関連炎症性障害（例えば、喘息、関節炎、敗血症および器官移植後の拒絶）、ならびに補体関連自己免疫障害（例えば、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ））などの処置、改善および／または予防の有効なモダリティを提供する。Ｃ５阻害が望ましい他の適応症としては、例えば、肺の炎症 （Ｍｕｌｌｉｇａｎら（１９９８）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９８：５０３）、体外補体活性化（Ｒｉｎｄｅｒら（１９９５）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９６：１５６４）、抗体媒介性補体活性化（Ｂｉｅｓｅｃｋｅｒら（１９８９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４２：２６５４）、糸球体腎炎および他の腎臓系疾患、眼適応症、例えば、Ｃ５媒介性眼組織損傷、例えば、糖尿病性網膜症、ならびに発作性夜間ヘモグロビン尿症が挙げられる。これらのアプタマーはまた、診断剤においても使用され得る。

【０１３０】

このようなアプタマーは、本明細書に記載の修飾、例えば、親油性または高分子量化合

物（例えば、ＰＥＧ）へのコンジュゲーション、キャッピング部分の組込み、修飾ヌクレオチドの組込み、およびリン酸主鎖に対する修飾などを含むものであってもよい。

【０１３１】

本発明の一実施形態において、Ｃ５補体タンパク質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。ある一部の実施形態において、該単離された天然に存在しないアプタマーは、１００μＭ未満、１μＭ未満、５００ｎＭ未満、１００ｎＭ未満、５０ｎＭ 、１ｎＭ未満、５００ｐＭ未満、１００ｐＭ未満、５０ｐＭ未満のＣ５補体タンパク質に対する解離定数（「$Ｋ_d$」）を有する。本発明のある一部の実施形態において、解離定数は、以下の実施例１に記載のようなドットブロット滴定によって決定される。

【０１３２】

別の実施形態において、本発明のアプタマーは、Ｃ５補体タンパク質の機能をモジュレートする。別の実施形態において、本発明のアプタマーはＣ５機能を阻害し、一方、別の実施形態では、アプタマーはＣ５の機能を活性化する。Ｃ５補体タンパク質バリアントは、本明細書で用いる場合、Ｃ５補体タンパク質機能と本質的に同じ機能を果たすバリアントを包含する。Ｃ５補体タンパク質バリアントは、好ましくは、実質的に同じ構造を含むものであり、ある一部の実施形態では、以下のアミノ酸配列（配列番号：１０２）（Ｈａｖｉｌａｎｄら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９１ Ｊａｎ ｌ；１４６（ｌ）：３６２－８に示されている）を含むＣ５補体タンパク質のアミノ酸配列と、８０％配列同一性、より好ましくは９０％配列同一性、より好ましくは９５％配列同一性を含むものである。

【０１３３】

【化８】

```
   1 mgllgilcfl iflgktwgqe qtyvisapki frvgaseniv iqvygyteaf datisiksyp
  61 dkkfsyssgh vhlssenkfq nsailtiqpk qlpggqnpvs yvylevvskh fskskrmpit
 121 ydngflfiht dkpvytpdqs vkvrvyslnd dlkpakretv ltfidpegse vdmveeidhi
 181 giisfpdfki psnprygmwt ikakykedfs ttgtayfevk eyvlphfsvs iepeynfigy
 241 knfknfeiti karyfynkvv teadvyitfg iredlkddqk emmqtamqnt mlingiaqvt
 301 fdsetavkel syysledlnn kylyiavtvi estggfseea eipgikyvls pyklnlvatp
 361 lflkpgipyp ikvqvkdsld qlvggvpvtl naqtidvnqe tsdldpsksv trvddgvasf
 421 vlnlpsgvtv lefnvktdap dlpeenqare gyraiayssl sqsylyidwt dnhkallvge
 481 hlniivtpks pyidkithyn ylilskgkii hfgtrekfsd asyqsinipv tqnmvpssrl
 541 lvyyivtgeq taelvsdsvw lnieekcgnq lqvhlspdad ayspgqtvsl nmatgmdswv
 601 alaavdsavy gvqrgakkpl ervfqfleks dlgcgagggl nnanvfhlag ltfltnanad
 661 dsqendepck eilrprrtlq kkieeiaaky khsvvkkccy dgacvnndet ceqraarisl
 721 gprcikafte ccvvasqlra nishkdmqlg rlhmktllpv skpeirsyfp eswlwevhlv
 781 prrkqlqfal pdslttweiq gvgisntgic vadtvkakvf kdvflemnip ysvvrgeqiq
 841 lkgtvynyrt sgmqfcvkms avegictses pvidhqgtks skcvrqkveg ssshlvtftv
 901 lpleiglhni nfsletwfgk eilvktlrvv pegvkresys gvtldprgiy gtisrrkefp
 961 yripldlvpk teikrilsvk gllvgeilsa vlsqeginil thlpkgsaea elmsvvpvfy
1021 vfhyletgnh wnifhsdpli ekqklkkklk egmlsimsyr nadysysvwk ggsastwlta
1081 falrvlgqvn kyveqnqnsi cnsllwlven yqldngsfke nsqyqpiklq gtlpvearen
1141 slyltaftvi girkafdicp lvkidtalik adnfllentl paqstftlai sayalslgdk
1201 thpqfrsivs alkrealvkg nppiyrfwkd nlqhkdssvp ntgtarmvet tayalltsln
1261 lkdinyvnpv ikwlseeqry gggfystqdt inaiegltey sllvkqlrls mdidvsykhk
1321 galhnykmtd knflgrpvev llnddlivst gfgsglatvh vttvvhktst seevcsfylk
1381 idtqdieash yrgygnsdyk rivacasykp sreessgss havmdislpt gisaneedlk
1441 alvegvdqlf tdyqikdghv ilqlnsipss dflcvrfrif elfevgflsp atftvyeyhr
1501 pdkqctmfys tsnikiqkvc egaackcvea dcgqmqeeld ltisaetrkq tackpeiaya
1561 ykvsitsitv envfvkykat lldiyktgea vaekdseitf ikkvtctnae lvkgrqylim
1621 gkealqikyn fsfryiypld sltwieywpr dttcsscqaf lanldefaed iflngc
```

本発明のある一部の実施形態において、標的バリアントの配列同一性は、後述するＢＬＡＳＴを用いて決定される。２つ以上の核酸またはタンパク質の配列に関連する用語「配列同一性」は、下記の配列比較アルゴリズムの１つを用いて、または視覚検査によって測定したとき、最大対応で比較し、アラインメントしたとき、同じであるか、または特定パーセントの同じ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をいう。配列比較では、典型的には、１つの配列が、試験配列と比較する参照配列としての機能を果たし得る。配列比較アルゴリズムを用いる場合は、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指定し、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により、指定したプログラムパラメータに基づいて、試験配列（１つまたは複数）について参照配列に対する配列同一性割合を計算する。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Ｓｍｉｔｈ ＆ 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）の類似性検索の方法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実施（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ内のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，Ｗｉｓ．）、または視覚検査（概要はＡｕｓｕｂｅｌら（後掲）を参照）によって行なわれ得る。

【０１３４】

配列同一性割合の決定に適したアルゴリズムの一例は、ベーシック局所（ｂａｓｉｃ ｌｏｃａｌ）アラインメント検索ツール（以下、本明細書において「ＢＬＡＳＴ」）に用いられるアルゴリズムであり、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解析を行なうためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ （以下、本明細書において「ＮＣＢＩ」）から公に入手可能である。ＮＣＢＩから入手可能なソフトウエア、例えば、ＢＬＡＳＴＮ（ヌクレオチド配列用）およびＢＬＡＳＴＰ（アミノ酸配列用）を用いた配列同一性の決定に用いられるデフォルトパラメータは、ＭｃＧｉｎｎｉｓら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，３２：Ｗ２０－Ｗ２５（２００４）に記載されている。

【０１３５】

本発明の別の実施形態において、配列番号１～２、５～６７、７５～８１、８３または８８～９８のいずれか１つを含むアプタマーと実質的に同じＣ５補体タンパク質への結合能力を有するアプタマーが提供される。本発明の別の実施形態において、アプタマーは、配列番号１～２、５～６７、７５～８１、８３または８８～９８のいずれか１つを含むアプタマー実質的に同じ構造およびＣ５補体タンパク質への結合能力を有する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、配列番号：２、５～６７、７５～８１、８３または８８～９８のいずれか１つによる配列（任意の化学的修飾を含む）を有する。別の実施形態において、本発明のアプタマーは、医薬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該アプタマーを含む組成物は、さまざまな補体関連疾患または障害、例えば、補体関連心臓障害（例えば、心筋損傷；冠動脈バイパス移植術（ＣＡＢＧ）に関連するＣ５媒介性補体合併症（例えば、術後出血など）、全身性好中球および白血球活性化、心筋梗塞のリスク増大ならびに認知機能不全の増大；再狭窄；ならびに経皮的冠動脈インターベンションに関連するＣ５媒介性補体合併症、虚血－再灌流障害（例えば、心筋梗塞、脳卒中、凍傷）、補体関連炎症性障害（例えば、喘息、関節炎、敗血症および器官移植後の拒絶）、ならびに補体関連自己免疫障害（例えば、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、肺の炎症、体外補体活性化、抗体媒介性補体活性化、ならびに眼適応症、例えば、補体媒介性眼組織損傷（糖尿病性網膜症など）

からなる群より選択されるいずれか１つを処置するために使用される。

【０１３６】

一実施形態において、本発明の抗Ｃ５アプタマーは、２’－フルオロ修飾ヌクレオチド、２’－ＯＭｅ修飾ヌクレオチド（「２’－ＯＭｅ」）および２’－ＯＨプリン残基の混合物を含むものである。修飾された抗Ｃ５アプタマーの説明的な一般配列（配列番号：１）を、以下に表１に示し、構造を図３Ａに示す。プリン（ＡおよびＧ）の圧倒的多数が、２’－ＯＨのままであるＧ残基の２つだけ（白抜きで示した残基）を除き、２’－ＯＭｅに対して修飾されている。丸で囲まれた残基は、アプタマーの抗Ｃ５活性を実質的に改変することなく、２’－Ｈに対して同時に修飾され得るピリミジンのサブセットを表す（以下の表１ののＡＲＣ３３０（配列番号：２，図３Ｂ）を参照））。図３Ａに示す下線の残基は、２’－フルオロまたは２’－Ｈ修飾（しかし２’－ＯＭｅではない）のいずれかを含有するものであり得るピリミジン残基を表し、一方、四角で囲まれた残基は、２’－フルオロまたは２－ＯＭｅ修飾（しかし２’－Ｈではない）のいずれかを含有するものであり得るピリミジン残基を表す。矢印（→）で示された残基は、２’－フルオロ修飾を含有するものでなければならない。矢印（→）で示された残基に２’－フルオロ修飾がない場合、得られるアプタマーにもたらされる溶血性活性は、実質的に減少する。好ましい実施形態において、本発明の抗Ｃ５アプタマーは、配列番号：１によるヌクレオチド配列を含むものである。

【０１３７】

本発明による抗Ｃ５アプタマーの一例は、図３Ｃに示されたＡＲＣ１８６（配列番号：４）であり、これは、米国特許第６，３９５，８８８（引用により、その全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。ＡＲＣ１８６の２１個のすべてのピリミジン残基が２’－フルオロ修飾を有する。３つの２’－ＯＨプリン残基（図３Ｃにおいて白抜きで示す）を除くプリンの大部分（１４残基）が、２’－ＯＭｅ修飾を有する。本発明の抗Ｃ５アプタマーはまた、２’－フルオロ修飾と２’－Ｈ修飾の異なる混合物を含むものであり得る。例えば、別の本発明の抗Ｃ５アプタマーは、図３Ｂに示すＡＲＣ３３０（配列番号：２）である。ＡＲＣ３３０（配列番号：２）は、７つの２’－Ｈ修飾（図３Ｂにおいて丸で囲まれた残基）、２’－フルオロ修飾を有する１４個のピリミジン残基、２’－ＯＭｅ修飾を有する１４個のプリン残基、および３つの２’－ＯＨプリン残基（図３Ｂにおいて白抜きで示す）を含む。

【０１３８】

２’－フルオロ修飾、２’－ＯＭｅ修飾、２’－ＯＨプリン残基および種々の大きさの非免疫原性高分子量化合物（例えば、ＰＥＧ）へのコンジュゲーション（これらの各々は、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）から誘導されたものである）の混合物を含むアプタマーの他の組合せを、以下の表１に記載する。本発明は、以下の表１に記載のアプタマーを含む。本発明はまた、以下に記載のものであるが、表示された３’キャップ（例えば、逆位デオキシチミジンキャップ）を欠くアプタマーおよび／または以下に表示されたものであるが、３’キャップが表示されていない場合は３’キャップ（例えば、逆位ｄＴ）を含むアプタマーを含む。

【０１３９】

特に記載のない限り、以下の表１のヌクレオチド配列は５’から３’方向に記載している。表１の個々の配列の各々について、すべての２’－ＯＭｅプリンまたはピリミジン修飾には、対応するヌクレオチドの前に「ｍ」を示す；すべての２’－フルオロピリミジン修飾には、対応するヌクレオチドの前に「ｆ」を示す；すべてのプリンまたはピリミジンデオキシ修飾には、対応するヌクレオチドの前に「ｄ」を示す；およびヌクレオチドの前に「ｍ」、「ｆ」または「ｄ」がないプリンまたはピリミジンはいずれも２’－ＯＨ残基を示す。さらに、「３Ｔ」は逆位デオキシチミジンを示し、「ＮＨ」はヘキシルアミンリンカーを示し、「NH_2」はヘキシルアミン末端基を示し、「ＰＥＧ」は、表示された分子量を有するポリエチレングリコール基を示し、「ビオチン」は、５’末端に結合体化されたビオチンを有するアプタマーを示す。

【０１４０】
【化９】

表１：

配列番号 1

X_1X_2fCfCrGfCX_3X_4fU$X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}rGX_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}$fUfU$X_{24}X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}$f
CX_{29}

ここで：
X_1=fC または mC
X_2=rG または gy
X_3=rG または mG
X_4=rG または mG
X_5=fC または dC
X_6=fU または dT
X_7=fC または dC
X_8=rA または mA
X_9=rG または mG
X_{10}=rG または mG
X_{11}= fC または dC
X_{12}=fC または mC
X_{13}=fU または mU
X_{14}=rG または mG
X_{15}=rA または mA
X_{16}=rG または mG
X_{17}=fU または dT
X_{18}=fC または dC
X_{19}=fU または dT
X_{20}=rG または mG
X_{21}=rA または mA
X_{22}=rG または mG
X_{23}=fU または dT
X_{24}=rA または mA
X_{25}=fC または dC
X_{26}=fC または dC
X_{27}=fU または dT
X_{28}=rG または mG
X_{29}=rG または mG

ARC330 (配列番号 2)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC185 (配列番号 3)
GAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC

ARC186 (配列番号 4)
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

ARC187 (配列番号 5)
40kDa PEG-- NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T
ここで、分枝鎖４０ｋＤａ ＰＥＧは、３－ビス (mPEG-[20 kDa]) －プロピル－２－（４’－ブタミド）である。

ARC188 (配列番号 6)
AGGAfCGAfUGfCGGfUfCfUfCAfUGfCGfUfCGAGfUGfUGAGfUfUfUAfCfCfUfUfCGfUfC

【０１４１】

【化１０】

ARC189 (配列番号 7)
AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC250 (配列番号 8)
GGfCGfCfCGfCGGfUfCfUfCAGGfCGfCfUGAGfUfCfUGAGfUfUfUAfCfCfUGfCG

ARC296 (配列番号 9)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGfCmG-3T

ARC297 (配列番号 10)
mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGmCmG-3T

ARC331 (配列番号 11)
dCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG

ARC332 (配列番号 12)
dCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC333 (配列番号 13)
fCmGdCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC334 (配列番号 14)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGdCmG

ARC411 (配列番号 15)
fCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC412 (配列番号 16)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

ARC413 (配列番号 17)
mCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC414 (配列番号 18)
mCmGmCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGmCmG

ARC415 (配列番号 19)
fCmGfCdCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC416 (配列番号 20)
fCmGfCfCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC417 (配列番号 21)
fCmGfCdCGdCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC418 (配列番号 22)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC419 (配列番号 23)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

【０１４２】

【化１１】

ARC420 (配列番号 24)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGdCTmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC421 (配列番号 25)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC422 (配列番号 26)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUTfUAfCfCfUmGfCmG

ARC423 (配列番号 27)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUTAfCfCfUmGfCmG

ARC424 (配列番号 28)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAfCfCfUmGfCmG

ARC425 (配列番号 29)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCTmGfCmG

ARC426 (配列番号 30)
fCmGfCfCGfCmGmGmUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAdCdCfUmGfCm
G

ARC427 (配列番号 31)
fCmGfCmCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G

ARC428 (配列番号 32)
fCmGfCfCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G

ARC429 (配列番号 33)
fCmGfCmCGmCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G

ARC430 (配列番号 34)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCfUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfC
mG

ARC431 (配列番号 35)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGfCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfC
m

ARC432 (配列番号 36)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCfUdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGfUdCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGf
CmG

ARC433 (配列番号 37)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUfUfUAfCfCfUmGfCm
G

ARC434 (配列番号 38)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUmUfUAfCfCfUmGfCm
G

ARC435 (配列番号 39)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUmUAfCfCfUmGfCm
G

【０１４３】

【化１２】

ARC436 (配列番号 40)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGmUmUmUAfCfCfUmGfCmG

ARC437 (配列番号 41)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCmUmGfCmG

ARC438 (配列番号 42)
fCmGfCfCdGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC439 (配列番号 43)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCdGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

ARC440 (配列番号 44)
fCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUdAfCfCfUmGfCmG

ARC457 (配列番号 45)
mGfCmGfUfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmAfCmGmC

ARC458 (配列番号 46)
mGmGmGfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmCmCmC

ARC459 (配列番号 47)
mGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGmC

ARC473 (配列番号 48)
mGmGmAfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmGfUfCfU-3T

ARC522 (配列番号 49)
mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTfUfUAdCdCTmGfCmGmCmC

ARC523 (配列番号 50)
mGmGmCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC524 (配列番号 51)
mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCTdCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGTdCTmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC525 (配列番号 52)
mGmGmCmGdCdCGdCmGmGTdCmUmCmAmGmGdCGmCmUmGmAmGmUmCmUmGmAmGTTTmAdCdCTmGdCmGmCmC

ARC532 (配列番号 53)
ビオチン－
AGfCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCmG

【０１４４】

【化１３】

ARC543 (配列番号 54)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUdCTdCmAmGmGdCGfCfUmGmAmGTdCTmGmAmGfUfUfUAfCfCfUm
GfCmGmCmC

ARC544 (配列番号 55)

mGmGfCmGfCfCGfCmGmGfUmCmUmCmAmGmGmCGfCfUmGmAmGmUmCmUmGmAmGfUfUfUAf
CfCfUmGfCmGmCmC

ARC550 (配列番号 56)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGfC
mG-3T

ARC551 (配列番号 57)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfC
mG-3T

ARC552 (配列番号 58)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUAfCfCfUmGfCmG
-3T

ARC553 (配列番号 59)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUmAfCfCfUmGf
CmG-3T

ARC554 (配列番号 60)

fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGmCmUmGmAmGfUfCfUmGmAmGTfUfUmAfCfCfUmGfC
mG-3T

ARC 657 (配列番号 61)
20 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

ARC 658 (配列番号 : 62)
30 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

ARC 672 (配列番号 63)
NH2-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

ARC706 (配列番号 64)
10 kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

【０１４５】

【化１４】

ARC1537 (配列番号 65)
40kDa PEG-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T

ARC1730) (配列番号 66)
PEG20K-NH-
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-NH-PEG20K

ARC1905 (配列番号 67)
40K PEG-NH- -
fCmGfCfCGfCmGmGfUfCfUfCmAmGmGfCGfCfUmGmAmGfUfCfUmGmAmGfUfUfUAfCfCfUmGfCm
G-3T
ここで、分枝鎖４０ｋＤａ　ＰＥＧは、２，３－ビス (mPEG-[20 kDa]) －プロピル－１－カルバモイルである。

ARC243 (配列番号 68)
GGfCGAfUfUAfCfUGGGAfCGGAfCfUfCGfCGAfUGfUGAGfCfCfCAGAfCGAfCfUfCGfCfC

ARC244 (配列番号 69)
GGfCfUfUfCfUGAAGAfUfUAfUfUfUfCGfCGAfUGfUGAAfCfUfCfCAGAfCfCfCfC

補体タンパク質Ｃ５に結合する本発明の他のアプタマーを、以下に実施例３に記載する。

【０１４６】

ある一部の実施形態において、本発明のアプタマー治療剤は、その標的に対して大きな親和性および特異性を有するとともに、アプタマー治療剤が患者または被験体の体内で分解された場合、天然に存在しないヌクレオチド置換による有害な副作用低減させる。ある一部の実施形態において、本発明のアプタマー治療剤を含有する治療用組成物は、含フッ素ヌクレオチドを含まないか、または低減された量で含む。

【０１４７】

本発明のアプタマーは、当該技術分野で知られた任意のオリゴヌクレオチド合成手法、例えば、当該技術分野でよく知られた固相オリゴヌクレオチド合成手法（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）ならびにトリエステル合成法などの液相法　（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）を用いて合成され得る。

【０１４８】

医薬組成物

本発明はまた、補体タンパク質Ｃ５に結合するアプタマー分子を含有する医薬組成物を含む。ある一部の実施形態において、該組成物は内服に適したものであり、有効量の本発明の薬理学的に活性な化合物を、単独または１つ以上の薬学的に許容され得る担体との組合せで含む。該化合物は、毒性があったとしても非常に低いという点で特に有用である。

【０１４９】

本発明の組成物は、疾患または障害などの病態を処置または予防するため、または患者においてかかる疾患または障害の症状を改善するために使用され得る。例えば、本発明の組成物は、補体関連心臓障害（例えば、心筋損傷；冠動脈バイパス移植（ＣＡＢＧ）術に関連するＣ５媒介性補体合併症（例えば、術後出血など）、全身性好中球および白血球活性化、心筋梗塞のリスク増大ならびに認知機能不全の増大；再狭窄；ならびに経皮的冠動脈インターベンションに関連するＣ５媒介性合併症）；虚血－再灌流障害（例えば、心筋梗塞、脳卒中、凍傷）；補体関連炎症性障害（例えば、喘息、関節炎、敗血症および器官移植後の拒絶）；ならびに補体関連自己免疫障害（例えば、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥまたは狼瘡）；肺の炎症；体外補体活性化；抗体媒介性補体活性化；

ならびに眼適応症、例えば、糖尿病性網膜症などと関連する病態を処置または予防するために使用され得る。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補体タンパク質Ｃ５に関連または起因する疾患または障害に罹患しているか、その素因を有する被験体への投与に有用である。

【０１５０】

本発明の組成物は、病態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され得る。本発明の方法は、患者または被験体に、補体タンパク質Ｃ５に結合するアプタマーまたはアプタマーを含有する組成物を投与することを伴ない、その結果、補体タンパク質Ｃ５へのアプタマーの結合によって、その生物学的機能が改変され、それにより病態が処置される。

【０１５１】

病態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、より詳しくは哺乳動物または、より特別にはヒトであり得る。

【０１５２】

実際には、アプタマーまたは薬学的に許容され得るその塩は、その所望の生物学的活性、例えば、アプタマー標的のその受容体への結合の阻害、標的タンパク質の切断の抑制を発揮させるのに充分な量で投与される。

【０１５３】

本発明の一態様は、Ｃ５媒介性補体障害の他の処置法との組合せでの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、１種類より多くのアプタマーを含有するものであり得る。ある一部の例において、１種類以上の本発明の化合物を含有する本発明のアプタマー組成物は、別の有用な組成物、例えば、抗炎症剤、免疫抑制剤、抗ウイルス剤などとの組合せで投与される。さらにまた、本発明の化合物は、細胞傷害性、細胞増殖抑制性または化学療法剤（例えば、アルキル化剤など）、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤または細胞傷害性抗生物質（上記のものなど）との組合せで投与される。一般に、かかる組合せにおける使用のための既知の治療用薬剤の現在利用可能な投薬形態が適当である。

【０１５４】

「併用療法」（または「共療法」）は、本発明のアプタマー組成物および少なくとも第２の薬剤を、これらの治療用薬剤の共同作用による有益な効果を提供することが意図される特定の処置レジメンの一部として投与することを含む。該組合せの有益な効果としては、限定されないが、治療用薬剤の組合せによりもたらされる薬物動態的または薬力学的共同作用が挙げられる。これらの治療用薬剤の組合せでの投与は、典型的には、規定の期間（選択される組合せに応じて、通常、数分間、数時間、数日間または数週間）にわたって行なわれる。

【０１５５】

「併用療法」は、一般的ではないが、２種類以上のこのような治療用薬剤を、偶発的および随意的に本発明の組合せがもたらされる個々の単独療法レジメンの一部として投与することが包含され得る。「併用療法」は、これらの治療用薬剤の逐次的な投与（すなわち、各治療用薬剤は、異なる時点で投与される）、ならびにこれらの治療用薬剤または該治療用薬剤の少なくとも２種類の実質的に同時の投与を包含することが意図される。実質的に同時の投与は、例えば、被験体に、固定比率の各治療用薬剤を有する単一のカプセルを投与すること、または治療用薬剤の各々の単一のカプセルを多重に投与することによりなされ得る。

【０１５６】

各治療用薬剤の逐次的または実質的に同時の投与は、任意の適切な経路、例えば、限定されないが、局所的（ｔｏｐｉｃａｌ）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する直接吸収によって行なわれ得る。治療用薬剤は、同じ経路または異なる経路で投与され得る。例えば、選択された組合せの第１の治療用薬剤が注射によって投与され得、一方、該組合せの他方の治療用薬剤が局所的に投与され得る。

【０１５７】
あるいはまた、例えば、すべての治療用薬剤を局所的に投与してもよく、またはすべての治療用薬剤を注射によって投与してもよい。治療用薬剤が投与される順序は、特に記載のない限り、偏狭的に不可欠でない。「併用療法」にはまた、他の生物学的に活性な成分とのさらなる組合せでの上記の治療用薬剤の投与が包含され得る。併用療法が非薬物療法をさらに含む場合、該非薬物療法は、治療用薬剤と非薬物療法の組合せの共同作用による有益な効果が得られる限り、任意の適当な時点で行なわれ得る。例えば、適切な場合では、非薬物療法を一時的に治療用薬剤の投与から除いた場合でも、なお、有益な効果が、おそらく数日間または数週間すら得られる。

【０１５８】
本発明の治療用または薬理学的組成物は、一般的に、薬学的に許容され得る媒体中に溶解または分散された治療活性成分（１種類または複数種）の有効量を含む。薬学的に許容され得る媒体または担体としては、任意のあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、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。医薬的に活性な物質用のかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で知られている。また、補助的な活性成分を本発明の治療用組成物中に組み込んでもよい。

【０１５９】
医薬用または薬理学的組成物の調製は、本発明の開示に鑑みると、当業者には充分わかる。典型的には、かかる組成物は、液状の液剤もしくは懸濁剤いずれかとしての注射用剤；注射前に液状にされる液剤もしくは懸濁剤に適した固形形態；錠剤もしくは経口投与用の他の固形剤；時限的カプセル；として、または現在使用されている任意の他の形態、例えば、点眼剤、クリーム剤、ローション剤、軟膏、吸入剤などに調製され得る。手術領域の特定の部分を処置するための、外科医、内科医または医療従事者による滅菌製剤、例えば、生理食塩水系洗浄液の使用は、特に有用であり得る。組成物はまた、微小デバイス、微粒子または海綿状物質によって送達され得る。

【０１６０】
配合されたら、治療剤は、投薬製剤と適合する様式で、薬理学的に有効な量などで投与される。製剤は、上記の注射用溶液型などのさまざまな投薬形態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され得る。

【０１６１】
この状況において、投与される活性成分の量および組成物の容量は、処置対象の宿主動物に依存する。投与に必要とされる活性化合物の正確な量は、担当医師判断に依存し、各個体に対して特有である。

【０１６２】
典型的には、活性化合物を分散させるのに必要とされる最小容量の組成物が使用される。また、投与に好適なレジメンは種々であり得るが、最初に該化合物を投与し、その結果をモニタリングし、次いで、さらに間隔をあけてさらに制御された用量を得ることが典型であり得る。

【０１６３】
例えば、錠剤またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態の経口投与、活性な薬物成分は、経口用の非毒性の薬学的に許容され得る不活性な担体、例えば、エタノール、グリセロール、水などと合わせられ得る。さらに、所望または必要な場合は、適当な結合剤、滑沢剤、崩壊剤および着色剤もまた、混合物中に組み込まれ得る。好適な結合剤としては、デンプン、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、デンプンペースト、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび／またはポリビニルピロリドン、天然の糖類（例えば、グルコースまたはβ－ラクトースなど）、コーン甘味料、天然および合成のゴム（例えば、アカシア、トラガカントまたはアルギン酸ナトリウムなど）、ポリエチレングリコール、ワックスなどが挙げられる。これらの投薬形態に使用される滑沢剤としては、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、そのマグネシウムもしくはカルシウムの塩および／またはポリエチレングリコールなどが挙げられる。崩壊剤としては、限定されないが、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガムデンプン、寒天、アルギン酸もしくはそのナトリウム塩、または発泡性混合物などが挙げられる。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。

【０１６４】

注射用組成物は、好ましくは、水性等張性の溶液または懸濁液であり、坐剤は、脂肪性エマルジョンまたは懸濁液から好都合に調製される。該組成物は、滅菌されたもの、および／またはアジュバント、例えば、保存剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を調節するための塩および／または緩衝剤などを含有するものであり得る。また、該組成物は、他の治療上有益な物質を含有するものであり得る。該組成物は、それぞれ慣用的な混合、増粒またはコーティング方法に従って調製され、典型的には、約０．１～７５％、好ましくは約１～５０％の活性成分を含有する。

【０１６５】

本発明の化合物はまた、時限的放出用および徐放性の錠剤またはカプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁剤、シロップ剤および乳剤などの経口投薬形態で投与され得る。

【０１６６】

液状、特に注射用の組成物は、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、医薬的に純粋な溶媒、例えば、水、生理食塩水、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、またはこれらと混合され、それにより注射用液剤または懸濁剤が形成される。さらに、注射前での液体中への溶解に適した固形形態もまた製剤化され得る。

【０１６７】

本発明の化合物は、静脈内（ボーラスおよび注入の両方）、腹腔内、皮下または筋肉内形態で、すべて、制約技術分野の当業者によく知られた形態を用いて投与され得る。注射用剤は、慣用的な形態で、液状の液剤または懸濁剤のいずれかとして調製され得る。

【０１６８】

非経口的注射可能な投与は、一般的に、皮下、筋肉内または静脈内注射および注入のために使用される。さらに、非経口投与アプローチの一例では、米国特許第３，７１０，７９５号（引用により、本明細書に組み込まれる）による、一定レベルの投薬の維持が確保される低速放出系または徐放系の埋入が用いられる。

【０１６９】

さらにまた、本発明に好ましい化合物は、鼻腔内形態で、適当な鼻腔内ビヒクル、吸入剤の局所的使用によって、または経皮的経路によって、当業者によく知られた経皮的皮膚パッチの形態を用いて投与され得る。経皮的送達系の形態で投与されるためには、投薬量の投与は、もちろん、投薬レジメンの間、断続的ではなく連続的である。他の好ましい局所用調製物としては、クリーム剤、軟膏、ローション剤、エーロゾルスプレー剤およびゲル剤が挙げられ、このとき、活性成分の濃度は、典型的には０．０１％～１５％（ｗ／ｗまたはｗ／ｖ）の範囲であり得る。

【０１７０】

固形組成物用には、賦形剤としては、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられ、使用され得る。上記に規定の活性化合物はまた、担体として例えばポリアルキレングリコール、例えば、プロピレングリコールを用い、坐剤として製剤化され得る。ある一部の実施形態において、坐剤は、脂肪性エマルジョンまたは懸濁液から好都合に調製される。

【０１７１】

本発明の化合物はまた、リポソーム送達系、例えば、小さな単層小胞、大きな単層小胞

および多層小胞の形態で投与され得る。リポソームは、コレステロール、ステアリルアミンまたはホスファチジルコリンを含むさまざまなリン脂質から形成され得る。ある一部の実施形態では、米国特許第５，２６２，５６４号に記載のようにして、脂質成分の膜を薬物の水性溶液で水和させ、該薬物をカプセル封入する脂質層を形成させる。例えば、本明細書に記載のアプタマー分子は、当該技術分野で知られた方法を用いて構築される親油性化合物または非免疫原性高分子量化合物との複合体として提供され得る。核酸会合複合体の一例は、米国特許第６，０１１，０２０号に示されている。

【０１７２】

また、本発明の化合物は、標的化可能な薬物担体としての可溶性ポリマーとカップリングさせ得る。かかるポリマーとしては、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピル－メタクリルアミド－フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミド（ａｓｐａｎａｍｉｄｅ）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。さらにまた、本発明の化合物は、薬物の制御放出を達成するのに有用な類型の生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリεカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレートおよびヒドロゲルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーとカップリングさせ得る。

【０１７３】

所望により、投与される医薬組成物はまた、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤、ならびに他の物質（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など）を含有していてもよい。

【０１７４】

アプタマーを用いる投薬レジメンは、さまざまな要素、例えば、患者の型、種、年齢、体重、性別および病状；処置対象の状態の重篤度；投与経路；患者の腎臓および肝臓の機能；ならびに使用される具体的なアプタマーまたはその塩に従って選択される。当業者である医師または獣医師には、該状態の進行を抑制、対抗または停止するのに必要とされる薬物の有効量を容易に決定および処方することができよう。

【０１７５】

本発明の経口投薬量は、指示される効果のために使用される場合、経口で約０．０５～７５００ｍｇ／日の範囲である。該組成物は、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の活性成分を含有する分割錠の形態で提供される。本発明の化合物は単回日用量で投与されてもよく、全日投薬量を、１日２回、３回または４回の分割用量で投与してもよい。

【０１７６】

注入投薬量、鼻腔内投薬量および経皮的投薬量は、０．０５～７５００ｍｇ／日の範囲である。皮下、静脈内および腹腔内投薬量は、０．０５～３８００ｍｇ／日の範囲である。

【０１７７】

本発明の化合物の有効血漿レベルは、０．００２ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬの範囲である。

【０１７８】

アプタマー治療剤の薬物動態および生体分布のモジュレーション

アプタマーを含むすべてのオリゴヌクレオチド系治療剤の薬物動態特性が所望の医薬適用と適合するように調整することは重要である。細胞外標的に指向されるアプタマーは、細胞内送達に伴う問題点（アンチセンスおよびＲＮＡｉ系治療剤の場合のような）はもたないが、かかるアプタマーは、やはり、標的器官および組織分布され、体内に（非修飾状態で）所望の投与レジメンに整合する期間滞留され得るものでなければならない。

【０１７９】

したがって、本発明は、アプタマー組成物の薬物動態、特に、アプタマー薬物動態の整

調可能性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整調可能性（すなわち、モジュレートできること）は、アプタマーへの修飾性部分（例えば、ＰＥＧポリマー）のコンジュゲーションおよび／または修飾ヌクレオチド（例えば、２’－フルオロもしくは２’－ＯＭｅ）の組込みにより核酸の化学組成を改変することによって達成される。アプタマー薬物動態の整調可能性は、既存の治療適用の改善、あるいはまた、新しい治療適用の開発に用いられる。例えば、ある一部の治療適用、例えば、速やかな薬物クリアランスまたは排出が所望され得る抗新生物形成性または急性医療状況では、血液循環中のアプタマーの滞留時間を低減させることが望ましい。あるいはまた、他の一部の治療適用、例えば、治療剤の全身循環が所望される維持療法では、血液循環中のアプタマーの滞留時間を増大させることが望ましい。

【０１８０】

また、アプタマー薬物動態の整調可能性は、被験体内でのアプタマー治療剤の生体分布を変更するために用いられる。例えば、ある一部の治療適用では、特定の組織型または特定の器官（もしくは１組の器官）を標的化する試みにおいて、アプタマー治療剤の生体分布を改変するのが望ましいことがあり得る。このような適用において、アプタマー治療剤は、優先的に特定の組織または器官（１つまたは複数）内に蓄積される。他の治療適用においては、アプタマー治療剤が優先的に罹患組織内に蓄積されるように、細胞マーカーもしくは所与の疾患と関連する症状、細胞損傷または他の異常な病態を示す組織を標的化するのが望ましいことがあり得る。例えば、継続中の米国特許仮出願第６０／５５０７９０号（２００４年３月５日出願、発明の名称「アプタマー治療剤の薬物動態および生体分布の制御モジュレーション（Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ ｏｆ Ａｐｔａｍｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）」）に記載のように、アプタマー治療剤のＰＥＧ化（例えば、２０ｋＤａ ＰＥＧポリマーを用いたＰＥＧ化）を用い、ＰＥＧ化されたアプタマー治療剤が優先的に炎症組織内に蓄積されるように炎症組織を標的化する。

【０１８１】

アプタマー治療剤（例えば、アプタマー結合体または改変された化学特性（例えば、修飾ヌクレオチドなど）を有するアプタマー）の薬物動態および生体分布プロフィールを調べるため、さまざまなパラメータをモニターする。かかるパラメータとしては、例えば、アプタマー組成物の半減期（$t_{1/2}$）、血漿クリアランス（Ｃｌ）、分布容積（Ｖｓｓ）、濃度時間曲線下面積（ＡＵＣ）、観察された最大血清または血漿濃度（$C_{最大}$）、および平均滞留時間（ＭＲＴ）が挙げられる。本明細書で用いる場合、用語「ＡＵＣ」は、アプタマー投与後のアプタマー治療剤の血漿濃度対時間のプロットの下側の面積をいう。ＡＵＣ値を用いて、所与のアプタマー治療剤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血液循環中の投与されたアプタマー治療剤のパーセント）および／または全クリアランス（Ｃｌ）（すなわち、アプタマー治療剤が血液循環から除去される速度）を推定する。分布容積は、アプタマー治療剤の血漿濃度を、体内に存在するアプタマーの量と関連させる。Ｖｓｓが大きいほど、より多くのアプタマーが血漿外に見られる（すなわち、管外遊出が多い）。

【０１８２】

本発明は、アプタマーをモジュレート性（ｍｏｄｕｌａｔｉｎｇ）部分、例えば、小分子、ペプチドもしくはポリマー末端基に結合体化させること、または修飾ヌクレオチドをアプタマー内に組み込むことにより、インビボで、安定化されたアプタマー組成物の薬物動態および生体分布を制御された様式でモジュレートするための材料および方法を提供する。本明細書に記載のように、モジュレート性部分のコンジュゲーションおよび／またはヌクレオチド（１つまたは複数）の化学組成の改変により、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態様が改変される。

【０１８３】

ヌクレアーゼによるクリアランスに加え、オリゴヌクレオチド治療剤は、腎臓での濾過

による排出に供される。そのため、静脈内投与されたヌクレアーゼ抵抗性オリゴヌクレオチドは、典型的には、濾過が抑止され得ない限り、＜１０分のインビボ半減期を示す。これは、血流から組織内への速やかな分布を助長すること、またはオリゴヌクレオチドの見かけ分子量を糸球体での有効なサイズ排除より上に増大させることのいずれかによってなされ得る。小型治療剤のＰＥＧポリマーへのコンジュゲーション（ＰＥＧ化）により、後述するように、血液循環中のアプタマーの滞留時間が劇的に延長され得、それにより、投与頻度が低減され、血管標的に対する有効性が増強される。

【０１８４】

アプタマーは、さまざまなモジュレート性部分、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アミノ酸断片（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$_7$（ポリアルギニン（Ａｒｇ$_7$）で構成された短鎖の正電荷を有する細胞透過性ペプチド（Ｒｏｔｈｂａｒｄ，ら（２０００），Ｎａｔ．Ｍｅｄ．６（１１）：１２５３－７；Ｒｏｔｈｂａｒｄ，Ｊら（２００２），Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．４５（１７）：３６１２－８））；ならびに小分子、例えば、コレステロールなどの親油性化合物などに結合体化させ得る。本明細書に記載の種々の結合体のうち、アプタマーのインビボ特性は、ＰＥＧ基との複合体化によって非常に顕著に改変される。例えば、２０ｋＤａ　ＰＥＧポリマーとの２’Ｆおよび２’－ＯＭｅの混合修飾アプタマー治療剤の複合体化により、腎臓での濾過が障害され、健常組織および炎症組織の両方へのアプタマー分布が促進される。さらにまた、２０ｋＤａ　ＰＥＧポリマー／アプタマー結合体は、アプタマーの腎臓での濾過の抑制において、４０ｋＤａ　ＰＥＧポリマーとほぼ同程度に有効であることが示されている。ＰＥＧ化の効果の１つはアプタマークリアランスに対するものであるが、２０ｋＤａ部分の存在によってもたらされる長時間の全身曝露によってもまた、組織、特に、高度に灌流された臓器のものおよび炎症部位のものへのアプタマーの分布が助長される。アプタマー／２０ｋＤａ　ＰＥＧポリマー結合体は、炎症部位へのアプタマー分布を指向し、その結果、ＰＥＧ化されたアプタマーが炎症組織内に優先的に蓄積される。ある一部の場合では、２０ｋＤａ　ＰＥＧ化されたアプタマー結合体は、細胞（例えば、腎臓細胞など）の内部に到達することが可能である。

【０１８５】

全般的に、低分子量モジュレート性部分（例えば、コレステロールおよび細胞透過性ペプチド）によってもたらされるアプタマー薬物動態および組織分布に対する効果は、ヌクレオチドのＰＥＧ化または修飾（例えば、化学組成の改変）の結果もたらされるものより顕著でない。理論に拘束されることを意図しないが、血漿リポタンパク質とのコレステロール媒介性会合（アンチセンス結合体の場合に起こることを前提とする）は、アプタマー／コレステロール結合体フォールド構造の特定の状況において妨げられる、および／またはコレステロール基の親油性の性質の態様と関連することが示唆される。コレステロールと同様、Ｔａｔペプチドタグの存在により、血流からのアプタマークリアランスが促進され、４８時間で、比較的高レベルの結合体が腎臓に見られる。当該技術分野において、巨大分子が細胞膜を横切って通過するのをインビトロで媒介することが報告されている他のペプチド（例えば、Ａｎｔ、Ａｒｇ$_7$）は、血液循環からのアプタマークリアランスを促進しないようである。しかしながら、Ｔａｔと同様、Ａｎｔ結合体は、他のアプタマーと比べ、腎臓内に有意に蓄積される。理論に拘束されることを意図しないが、インビボで３次元的にフォールドされたアプタマーの状況において、ＡｎｔおよびＡｒｇ$_7$ペプチドモジュレート性部分の好ましくない提示により、これらのペプチドがアプタマー輸送特性に影響する能力が障害されることが考えられ得る。

【０１８６】

修飾ヌクレオチドはまた、アプタマーの血漿クリアランスをモジュレートするために使

用され得る。例えば、２’－Ｆおよび２’－ＯＭｅの両方の安定化化学基が組み込まれた非結合体アプタマー（これは、インビトロおよびインビボで高度なヌクレアーゼ安定性を示すため、現在のアプタマーの作製に典型的である）は、非修飾アプタマーと比べた場合、血漿からの速やかな損失（すなわち、速やかな血漿クリアランス）および組織内（主に、腎臓内）への速やかな分布を示す。

【０１８７】

ＰＥＧ－誘導体化核酸

上記のように、高分子量非免疫原性ポリマーでの核酸の誘導体化は、核酸の薬物動態および薬力学的特性を改変するより有効な治療用薬剤とする潜在性を有する。活性における好ましい変化は、ヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性の増大、腎臓を介する濾過の低減、免疫系に対する曝露の低減、および身体中への治療剤の分布の改変を誘導し得る。

【０１８８】

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」）部分により誘導体化させ得る。ＰＡＧ－誘導体化核酸の例は、米国特許出願第１０／７１８，８３３号（２００３年１１月２１日出願）（引用により、その全体が本明細書に組み込まれる）に見られる。本発明に使用される典型的なポリマーとしては、ポリ（エチレングリコール）（「ＰＥＧ」）（ポリ（エチレンオキシド）（「ＰＥＯ」）としても知られる）およびポリプロピレングリコール（例えば、ポリイソプロピレングリコール）が挙げられる。さらに、異なるアルキレンオキシド（例えば、エチレンオキシドとプロピレンオキシド）のランダムまたはブロックコポリマーが、多くの適用用途において使用され得る。その最も一般的な形態では、ポリアルキレングリコール（例えば、ＰＥＧなど）は、各末端がヒドロキシル基で終結した線状ポリマー：$HO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$である。このポリマー、α，Ω－ジヒドロキシルポリ（エチレングリコール）はまた、ＨＯ－ＰＥＧ－ＯＨで表されることがあり得、この場合、－ＰＥＧ－記号は、下記の構造的単位：$-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$（式中、ｎは、典型的には約４～約１０，０００の範囲である）を表すことは理解されよう。

【０１８９】

記載のように、ＰＥＧ分子は二官能性であり、場合によっては、「ＰＥＧジオール」とよばれる。ＰＥＧ分子の末端部分は、比較的非反応性のヒドロキシル部分であり、該－ＯＨ基は、ＰＥＧを他の化合物に該化合物の反応性部位において結合させるために活性化され得るか、または官能性部分に変換され得る。かかる活性化されたＰＥＧジオールを、本明細書において二重活性化ＰＥＧという。例えば、ＰＥＧジオールの末端部分は、比較的非反応性のヒドロキシル部分－ＯＨを、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドのスクシンイミジル活性エステル部分と置換することにより、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。

【０１９０】

多くの適用において、一方の末端のＰＥＧ分子を本質的に非反応性部分でキャップし、ＰＥＧ分子を一官能性（単一活性化されたもの）とすることが望ましい。一般的に、活性化ＰＥＧに対して多数の反応部位を示すタンパク質治療剤の場合、二官能性活性化ＰＥＧは、広範な架橋をもたらし、官能性が不充分な凝集体が得られる。単一活性化ＰＥＧを作製するため、典型的には、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$-OCH_3$で置換する。ＰＥＧ分子他方の非キャップ末端は、典型的には、表面またはタンパク質などの分子上の反応性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する。

【０１９１】

ＰＡＧは、典型的には、水および多くの有機溶媒中に可溶性であり、毒性がなく、免疫原性がないという特性を有するポリマーである。ＰＡＧの使用の一例は、ポリマーを不溶性分子に共有結合させ、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にカップリングさせると、水溶性となることが示されている。Ｇｒｅｅｎｗａｌｄら，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，６０：３３

１－３３６（１９９５）。ＰＡＧ結合体は、多くの場合、可溶性および安定性を増強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。

【０１９２】

ポリアルキル化された本発明の化合物は、典型的には、５～８０ｋＤの大きさであるが、任意の大きさが使用され得、選択は、アプタマーおよび適用に依存する。本発明の他のＰＡＧ化合物は１０～８０ｋＤの大きさである。本発明のさらに他のＰＡＧ化合物は１０～６０ｋＤの大きさである。例えば、ＰＡＧポリマーは、少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０または８０ｋＤの大きさであり得る。かかるポリマーは線状または分枝鎖であり得る。

【０１９３】

生物学的に発現されるタンパク質治療剤とは対照的に、核酸治療剤は、典型的には、活性化されたモノマーヌクレオチドから化学的に合成される。ＰＥＧ／核酸結合体は、同じ反復的モノマー合成を用いてＰＥＧを組み込むことにより調製され得る。例えば、ホスホロアミダイト形態への変換によって活性化されたＰＥＧは、固相オリゴヌクレオチド合成に組み込み得る。あるいはまた、オリゴヌクレオチド合成は、反応性ＰＥＧ結合部位の部位特異的組込みにより終了させ得る。最も一般的には、これは、５’末端への遊離第１級アミンの付加によってなされている（固相合成の最後のカップリング工程で、修飾ホスホロアミダイトを用いて組み込まれる）。このアプローチを用い、反応性ＰＥＧ（例えば、アミンと反応して結合を形成するように活性化されたもの）を、精製されたオリゴヌクレオチドと合わせ、カップリング反応を溶液中で行なう。ある一部の実施形態において、ポリマーは分枝鎖ＰＥＧ分子である。さらに他の実施形態において、ポリマーは４０ｋＤａの分枝鎖ＰＥＧであり、例えば、図４に示す（１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）を参照のこと。ある一部の実施形態において、４０ｋＤ分枝鎖ＰＥＧ（１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）は、図５に示すように、アプタマーの５’末端に結合されている。

【０１９４】

ＰＥＧコンジュゲーションが治療剤の生体分布を改変する能力は、いくつかの要素、例えば、結合体の見かけ上の大きさ（例えば、流体力学的半径に関して測定したときの）と関連している。結合体が大きいほど（＞１０ｋＤＡ）、腎臓による濾過より有効に抑止され、その結果、小型の巨大分子（例えば、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の血清半減期が増大すること知られている。ＰＥＧ結合体が濾過を抑止する能力は、およそ５０ｋＤａまでＰＥＧの大きさとともに増大することが示されている（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規定される状態となるため、有益な効果が最小となる）。

【０１９５】

高分子量ＰＥＧ（＞１０ｋＤａ）の作製は、困難、非効率的および高価であり得る。高分子量ＰＥＧ／核酸結合体の合成に対する経路として、これまでの試験は、より高分子量の活性化ＰＥＧの作製に集中されていた。かかる分子を作製するための方法の一例は、２つ以上のＰＥＧが、活性化された基を担持する中心コアに結合された分枝鎖活性化ＰＥＧの形成を伴う。このような高分子量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、１つ以上のＰＥＧを他の化合物に該化合物の反応性部位において結合させるために、活性化され得るか、または官能性部分に変換され得る。分枝鎖の活性化ＰＥＧは２つより多くの末端を有し、２つ以上の末端が活性化されている場合、かかる活性化された高分子量ＰＥＧ分子を、本明細書において多重活性化ＰＥＧという。ある一部の場合では、分枝鎖ＰＥＧ分子内のすべての末端が活性化されているわけではない。分枝鎖ＰＥＧ分子内の任意の２つの末端が活性化されている場合、かかるＰＥＧ分子を二重活性化ＰＥＧという。分枝鎖ＰＥＧ分子の１つの末端だけが活性化されているある一部の場合、かかるＰＥＧ分子を単一活性化されているという。このアプローチの一例として、リシンコアへの２つのモノメトキシＰＥＧの結合によって調製、続いて、反応のために活性化された活性化ＰＥＧが報告されている（Ｈａｒｒｉｓら，Ｎａｔｕｒｅ，ｖ

ｏｌ．２：２１４－２２１，２００３）。

【０１９６】

本発明は、多重にＰＥＧ化された核酸を含む高分子量ＰＥＧ－核酸（好ましくは、アプタマー）結合体の合成の別の費用対効果の大きい経路を提供する。本発明はまた、ＰＥＧ結合多量体オリゴヌクレオチド、例えば、二量体化アプタマーを包含する。本発明はまた、ＰＥＧ安定化部分がアプタマーの種々の部分に分断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、高分子量アプタマー組成物の線状配列が、例えば、核酸－ＰＥＧ－核酸（－ＰＥＧ－核酸）$_n$（式中、ｎは１以上である）とように結合体化された高分子量組成物に関する。

【０１９７】

本発明の高分子量組成物としては、少なくとも１０ｋＤの分子量を有するものが挙げられる。組成物は、典型的には１０～８０ｋＤの大きさの分子量を有する。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８０ｋＤの大きさである。

【０１９８】

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および薬力学的特性を改善する分子または分子の一部分である。ある一部の場合では、安定化部分は、２つ以上のアプタマーもしくはアプタマードメインを近接させるか、または本発明の高分子量アプタマー組成物の全体的な回転自由度の低減をもたらす分子または分子の一部分である。安定化部分は、ポリアルキレングリコール、例えば、ポリエチレングリコールであり得、線状または分枝鎖のホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得る。他の安定化部分としては、ペプチド核酸（ＰＮＡ）などのポリマーが挙げられる。オリゴヌクレオチドもまた安定化部分であり得、かかるオリゴヌクレオチドとしては、修飾ヌクレオチドおよび／または修飾された連結部、例えば、ホスホロチオエートなどが挙げられ得る。安定化部分は、アプタマー組成物に一体化された部分であり得る、すなわち、アプタマーに共有結合されたものであり得る。

【０１９９】

本発明の組成物としては、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により結合体化された高分子量アプタマー組成物が挙げられる。ポリアルキレングリコール部分は安定化部分としての機能を果たす。ポリアルキレングリコール部分がいずれかの末端でアプタマーに、ポリアルキレングリコールが核酸部分を一緒にして１つの分子に連結するように共有結合された組成物では、ポリアルキレングリコールは、連結部分と言える。かかる組成物では、共有結合分子の一次構造は核酸－ＰＡＧ－核酸の線状配列を含む。一例は、核酸－ＰＥＧ－核酸の一次構造を有する組成物である。別の例は、核酸－ＰＥＧ－核酸－ＰＥＧ－核酸の線状配列である。

【０２００】

核酸－ＰＥＧ－核酸結合体を作製するため、最初に核酸を、単一の反応性部位（例えば、単一活性化されたもの）を有するように合成する。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の最後の工程として、修飾ホスホロアミダイトの付加によって５’末端に導入されたアミノ基である。修飾オリゴヌクレオチドの脱保護および精製後、活性化ＰＥＧの自発的加水分解を最小限にする溶液中で、高濃度で再構成する。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１ｍＭであり、再構成された溶液は２００ｍＭ　ＮａＨＣＯ$_3$バッファー（ｐＨ８．３）を含有する。該結合体の合成は、高度に精製された二官能性ＰＥＧの低速の段階的付加によって開始される。好ましい実施形態において、ＰＥＧジオールは、プロピオン酸スクシンイミジルでの誘導体化によって、両方の末端が活性化（二重活性化）されている。反応後、ＰＥＧ／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ーによって精製し、完全結合体種、部分結合体種および非結合体種に分離する。多数のＰＡＧ分子が連結された　（例えば、ランダムまたはブロックコポリマーとして）、またはより小型のＰＡＧ鎖を連結し、種々の長さ（または分子量）が得られ得る。非ＰＡＧリンカーは、種々の長さのＰＡＧ鎖間に使用さ

れ得る。

【０２０１】

２’－ＯＭｅ、２’－フルオロおよび他の修飾ヌクレオチド修飾は、アプタマーをヌクレアーゼに対して安定化させ、インビボでのその半減期を増大させる。３’－３’－ｄＴキャップによってもまた、エキソヌクレアーゼ抵抗性が増大され得る。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（これらの各々は、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【０２０２】

反応性核酸のＰＡＧ誘導体化

高分子量ＰＡＧ－核酸－ＰＡＧ結合体は、一官能性活性化ＰＥＧと、１つより多くの反応性部位を含有する核酸との反応によって調製され得る。一実施形態において、該核酸は二重反応性または二重活性化されたものであり、２つの反応性部位：５’－アミノ基と慣用的なホスホロアミダイト合成によってオリゴヌクレオチド内に導入された３’－アミノ基とを含む（例えば、図６に示す３’－５’－ジ－ＰＥＧ化）。代替的な実施形態において、反応性部位は、例えば、第１級アミンの結合部位としてピリミジンの５位、プリンの８位またはリボースの２’位を用い、内部の位置に導入され得る。かかる実施形態において、核酸は、いくつかの活性化された部位または反応性部位を有し得、多重に活性化されていると言える。合成および精製後、修飾オリゴヌクレオチドを単一活性化ＰＥＧと、自発的加水分解を最小限にしつつ、オリゴヌクレオチド反応性部位との選択的反応が促進される条件下で合わせる。好ましい実施形態において、モノメトキシ－ＰＥＧは、プロピオン酸スクシンイミジルで活性化させ、カップリング反応をｐＨ８．３で行なう。二置換ＰＥＧの合成を推進するため、オリゴヌクレオチドに対して化学量論的過剰のＰＥＧを準備する。反応後、ＰＥＧ－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ーによって精製し、完全結合体種、部分結合体種および非結合体種に分離する。

【０２０３】

また連結性ドメインは、１つ以上のポリアルキレングリコール部分が自身に結合された結合されたものであり得る。かかるＰＡＧは、種々の長さのものであり得、該組成物の所望の分子量を得るための適切な組合せで使用され得る。

【０２０４】

特定のリンカーの効果は、その化学組成および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、または標的と好ましくない立体的および／またはイオン相互作用を形成するリンカーは、アプタマーと標的との複合体の形成を妨げる。核酸間の間隔に延在するのに必要であるより長いリンカーは、リガンドの有効濃度が減少することにより結合安定性が低減され得る。したがって、多くの場合、標的に対するアプタマーの親和性を最大限にするため、リンカーの組成および長さを最適化することが必要である。

【０２０５】

本明細書に挙げたすべての刊行物および特許文献（引用により、本明細書に組み込まれる）は、かかる各刊行物または文献が、引用により具体的かつ個々に本明細書に組み込まれているかのように、本明細書に組み込まれる。刊行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の是認であることは意図されず、その内容および日時に関する是認を構成するものでもない。次に、本発明を書面による記述によって説明するが、当業者には、本発明がさまざまな実施形態で実施され得ること、ならびに前述の記載および以下の実施例は、例示の目的のためであって、以下の特許請求の範囲の限定ではないことが認識されよう。

【実施例】

【０２０６】

（実施例１）

古典的および第二補体経路における抗Ｃ５アプタマー活性

実施例１Ａ：溶血性アッセイ

ＣＨ５０試験により、抗体コートヒツジ赤血球の標準化された懸濁液において、補体系が血清試験試料中において細胞の５０％を溶解する能力が測定される。０．２％ヒト血清の溶液を抗体コートヒツジ赤血球（Ｄｉａｍｅｄｉｘ ＥＺ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ＣＨ５０ Ｋｉｔ，Ｄｉａｍｅｄｉｘ Ｃｏｒｐ．，Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）と、種々の抗Ｃ５アプタマーの存在下または非存在下で混合した。アッセイは、キットプロトコルに従って、カルシウム、マグネシウムおよび１％ゼラチンを含有するベロナール緩衝生理食塩水（ＧＶＢ$^{++}$補体バッファー）中で行ない、３７℃で３０分間インキュベートした。インキュベート後、試料を遠心分離し、インタクトな赤血球をペレット化した。上清みの４１２ｎｍにおける光学密度（ＯＤ$_{412}$）を読み取り、可溶性ヘモグロビンの放出を定量した。これは、溶血の程度に比例する（Ｇｒｅｅｎら，（１９９５）Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：６８３－９５）。アプタマーがＣ５活性化をブロックしたことを確認するため、一部の溶血上清みをＣ５ａおよびＣ５ｂ－９の存在について、ＥＬＩＳＡ（Ｃ５ｂ－９ ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｃ５ａ ＥＬＩＳＡキット，ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によってＥＬＩＳＡキットプロトコルに従って解析した。

【０２０７】

反応混合物への非ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマー（ＡＲＣ１８６）（配列番号：４）の添加により、溶血は、図７Ａのグラフに示されるように用量依存的に阻害され、ＩＣ$_{50}$は０．５±０．１ｎＭ（図７Ｂ参照）であり、値は、ニトロセルロース濾過によって決定されたＫ$_{D}$と整合する。非常に高いアプタマー濃度（＞１０ｎＭ）では、溶血の程度は、本質的にバックグラウンド（血清添加なし）と識別不可能であり、これは、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）が完全に補体活性をブロックできたことを示す。ＡＲＣ１８６（配列番号：４）アプタマーと、２０ｋＤａ（ＡＲＣ６５７；配列番号：６１）、３０ｋＤａ（ＡＲＣ６５８；配列番号：６２）、分枝鎖４０ｋＤａ（１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）（ＡＲＣ１８７；配列番号：５）、分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイル）（ＡＲＣ１９０５；配列番号：６７）、線状４０ｋＤａ（ＡＲＣ１５３７；配列番号：６５）、および線状２×２０ｋＤａ（ＡＲＣ １７３０；配列番号：６６）ＰＥＧ基とのコンジュゲーションは、ＣＨ５０溶血性アッセイにおいて、アプタマー阻害活性に対してほとんど効果を有しなかった（図７Ａ～図７Ｄ）。

【０２０８】

さらなる試験において、ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ１９０５（分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイル）；配列番号：６７）の阻害活性を、その非ＰＥＧ化前駆体ＡＲＣ６７２（配列番号６３）（これは、末端５’－アミンを含有する）と、上記のＣＨ５０溶血性アッセイにおいて比較した。ヒト血清（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｏｕｔｈｆｉｅｌｄ，ＭＩ）の溶液を抗体コートヒツジ赤血球（Ｄｉａｍｅｄｉｘ ＥＺ Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ＣＨ５０ Ｋｉｔ，Ｄｉａｍｅｄｉｘ Ｃｏｒｐ．，Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）と、それぞれ、各アッセイにおける血清の最終濃度が０．１％となるように種々の濃度のＡＲＣ１９０５およびＡＲＣ６２７の存在下または非存在下で混合し、アッセイは、製造業者の推奨するプロトコルに従って行なった。溶血反応物は、１時間３７℃で、細胞が懸濁液中に懸濁状態に維持されるように攪拌しながらインキュベートした。インキュベーションの最後に、インタクトな細胞を遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間、室温）によってペレット化し、２００μＬの上清みを平底ポリスチレンプレート（ＶＷＲ、カタログ番号６２４０９－００３）に移した。上清みの４１５ｎｍにおける光学密度（ＯＤ$_{415}$）を読み、可溶性ヘモグロビンの放出を定量した。測定された各アプタマー濃度における阻害％を、等式 阻害％＝１００－１００×（Ａ$_{試料}$－Ａ$_{血清無し}$）／（Ａ$_{アプタマーなし}$－Ａ$_{血清無し}$）を用いて計算した。式中、Ａ$_{試料}$は、種々のアプタマー濃度における試料の吸光度であり、Ａ$_{血清無し}$は、血清の非存在下におけるバックグラウンド溶血による吸光度（１００％阻害対照）であり、Ａ$_{アプタマーなし}$は、アプタマーの非存在下における基底補体活性によ

る吸光度（０％阻害対照）である。ＩＣ$_{50}$値は、等式　阻害％＝（阻害％）$_{最大}$×［インヒビター］^{n}／（ＩＣ$_{50}{}^{n}$＋［インヒビター］^{n}）＋バックグラウンドを用いて、阻害％対［インヒビター］のプロットから決定した。ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値はＩＣ$_{50}$値から、等式　ＩＣ$_{90}$＝ＩＣ$_{50}$×［９０／（１００－９０］$^{1/n}$およびＩＣ$_{90}$＝ＩＣ$_{50}$×［９９／（１００－９９］$^{1/n}$を用いて算出した。この平行試験におけるＡＲＣ１９０５およびＡＲＣ６２７のＩＣ$_{50}$値は、それぞれ、０．６４８＋／－０．０５２１および０．９１３＋／－０．０６７９であり（図５８もまた参照）、ＰＥＧ化は、アプタマー機能に対する効果が、あったとしてもほとんどないことがさらに確認される。

【０２０９】

溶血上清みのＥＬＩＳＡ解析により、この機能阻害がＣ５ａ放出のブロックと相関することが示された。したがって、溶血データは、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）およびそのＰＥＧ化された結合体が、Ｃ５のコンバターゼ触媒性活性化をブロックすることによって機能を果たす非常に強力な補体インヒビターであることを示す。

【０２１０】

非ＰＥＧ化物質を用いた溶血性アッセイにより、抗Ｃ５アプタマーがいくつかの非霊長類種、例えば、ラット、モルモット、イヌおよびブタ由来のＣ５と交差反応しないことが示された。しかしながら、有意な阻害活性が霊長類血清、例えば、カニクイザル、アカゲザルおよびチンパンジー由来の血清のスクリーニングにおいて観察された。抗Ｃ５アプタマーのインビトロ有効性を、カニクイザル血清において、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の３０ｋＤａ－ＰＥＧ類縁体であるＡＲＣ６５８（配列番号：６２）を用いてさらに調査した。並列比較（ｎ＝３）において、ＡＲＣ６５８は、ヒト補体活性を０．２１±０．０ｎＭのＩＣ$_{50}$で、およびカニクイザル補体活性を１．７±０．４ｎＭのＩＣ$_{50}$で阻害した（図８）。したがって、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）は、この測定によるヒトと比較すると、カニクイザル血清において効力が８±３倍低い。

【０２１１】

関連した試験において、ヒツジ赤血球の溶血によってアッセイした分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイル）ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマーであるＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）の、古典的な補体経路活性化に対するの効果を、ヒト（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｏｕｔｈｆｉｅｌｄ，ＭＩ）、カニクイザル（Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ，Ｈｉｃｋｓｖｉｌｌｅ，ＮＹ）またはラットの血清（Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ，Ｈｉｃｋｓｖｉｌｌｅ，ＮＹ）の存在下で調査した。これらのアッセイは、高度に希釈した血清中で（ヒトおよびカニクイザルでは０．１％、ラットでは０．３％）で、すぐ上に記載したヒツジ赤血球の溶血に対するＡＲＣ１９０５の阻害効果をＡＲＣ６７２との比較に用いたものと同じ条件下で行なった。並列比較では、インビトロ補体活性の完全な阻害（９０～９９％）が、ＡＲＣ１９０５を用いてヒトおよびカニクイザル両方の血清において達成可能であったが、ラット補体試料では、ＡＲＣ１９０５は、特異的阻害活性をほとんどあるいは全く示さなかった（図５９Ａ）。ＡＲＣ６５８と同様、ＡＲＣ１９０５は、該アッセイ条件下で、カニクイザル補体活性に対する効力が約１０倍低く、図５９Ｂに報告しているようにＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値に反映されている。

【０２１２】

ニトロセルロースフィルター結合アッセイ。個々のアプタマーを、γ－^{32}Ｐ－ＡＴＰおよびポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）とのインキュベーションによって、５’末端を^{32}Ｐ標識した。放射能標識アプタマーを遊離ＡＴＰから、ゲル濾過後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製分離した。抗Ｃ５アプタマー親和性を測定するため、放射能標識されたアプタマー（≦１０ｐＭ）を漸増濃度（０．０５～１００ｎＭ）の精製Ｃ５タンパク質（Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）とともに、１ｍＭ　ＭｇＣｌ$_{2}$を含有するリン酸緩衝生理食塩水中、室温（２３℃）および３７℃で１５分間および４時間インキュベートした。結合反応物をニトロセルロース濾過により、Ｍｉｎｉｆｏｌｄ　Ｉドットブロット、９６ウ

ェル真空濾過マニホールド（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ，Ｋｅｅｎｅ，ＮＨ）を用いて解析した。（上から下に向かって）Ｐｒｏｔｒａｎニトロセルロース（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ）、Ｈｙｂｏｎｄ－Ｐナイロン（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）およびＧＢ００２ゲルブロット紙（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ）からなる３層濾過媒体を用いた。ニトロセルロース層は、核酸よりタンパク質に選択的に結合するものであり、タンパク質リガンドとの複合体中の抗Ｃ５アプタマーを優先的に保持したが、非複合体化抗Ｃ５アプタマーはニトロセルロースを通過し、ナイロンに付着した。ゲルブロット紙は、単に他のフィルターの支持媒体として含めた。濾過後、フィルター層を分離し、乾燥し、リン光体スクリーン（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上に露光し、Ｓｔｏｒｍ ８６０ Ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅｒ（登録商標）ブロット画像化システム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて定量した。

【０２１３】

図９および図１０に示されるように、漸増Ｃ５濃度により、ニトロセルロース膜上に捕捉されるＡＲＣ１８６の割合が向上する。結合ＡＲＣ１８６の漸増Ｃ５濃度に対する依存性は、単一部位結合モデル（Ｃ５＋ＡＲＣ１８６←→Ｃ５・ＡＲＣ１８６；結合％＝$C_{最大}$／（１＋K_D／［Ｃ５］）；$C_{最大}$は、飽和性［Ｃ５］における最大結合％である；K_Dは解離定数である）によって充分説明される。１５分間ならびに４時間のいずれかのインキュベーション後での、２つの温度におけるＡＲＣ１８６結合曲線を、それぞれ図９および１０に示す。１５分間のインキュベーション後、２３℃および３７℃でのＡＲＣ１８６結合曲線は、誤差内で本質的に識別不可能であり、０．５～０．６ｎＭのK_D値をフィットさせた（図９）。２３℃および３７℃での結合曲線間の差は、インキュベーション時間を延長すると、より顕著になる。４時間のインキュベーション後（図１０）、２３℃で観察されたK_Dは０．０８±０．０１ｎＭに減少するが、３７℃で観察されたK_Dは、未変化のままである（０．６±０．１ｎＭ）。

【０２１４】

室温で長時間のインキュベーション要件の根拠を示すため、この温度における親和性を、速度論的方法を用いてさらに検討した。Ｃ５・ＡＲＣ１８６の解離を示す逆反応の速度は、$v_{rev}=k_{-1}$［Ｃ５・ＡＲＣ１８６］であり、式中、v_{rev}は反応速度（単位はＭ分$^{-1}$）であり、k_{-1}は、一次解離速度定数（単位は分$^{-1}$）である。Ｃ５・ＡＲＣ１８６複合体の形成を示す順反応の速度は、$v_{for}=k_1$［Ｃ５］［ＡＲＣ１８６］であり、式中、v_{for}は反応速度（単位はＭ分$^{-1}$）であり、k_1は二次会合速度定数（単位はＭ$^{-1}$分$^{-1}$）である。データは、擬一次仮定（一方の反応体（この場合、Ｃ５）の濃度を他方より大過剰に維持し（［Ｃ５］＞＞［ＡＲＣ１８６］、したがって、反応仮定において本質的に未変化に維持されるようにする）を用いて解析した。このような条件下で、順反応は、一次反応の反応速度式$v_{for}=k_1'$［ＡＲＣ１８６］（式中、$k_1'=k_1$［Ｃ５］）によって示される。

【０２１５】

Ｃ５・ＡＲＣ１８６の解離を解析するため、放射能標識ＡＲＣ１８６（＜１０ｐＭ）を、５ｎＭ Ｃ５タンパク質を含む１ｍＭ $MgCl_2$含有リン酸緩衝生理食塩水で、室温（２３℃）で予め平衡化した。解離反応を、遊離Ｃ５を捕捉する機能を果たす非標識ＡＲＣ１８６（１μＭ）の添加によって開始し、ニトロセルロース濾過によって結合および遊離の放射能標識ＡＲＣ１８６を分離することにより停止した。解離反応開始と濾過間の持続時間を変えることにより、ＡＲＣ１８６解離の経時変化を得た。解離の経時変化は、ニトロセルロースフィルター上に捕捉される放射能標識ＡＲＣ１８６のパーセントの減少として観察され（Ｃ５に結合された割合に等しい）、これは、単一指数関数的減衰によって良好に示され、この場合、結合ＡＲＣ１８６％＝

【０２１６】

【数１】

$$100 \times e^{-k_{-1}t}$$

（図１１参照）である。この方法で決定される解離速度定数、k_{-1}の値は０．０１３±０．０２分$^{-1}$であり、５３±８分の半減期（$t_{1/2}$＝Ｉｎ２　k_{-1}）に相当する。

【０２１７】

会合反応を解析するため、Ｃ５・ＡＲＣ１８６の形成の平衡化速度定数（k_{eq}）を、種々の濃度のＣ５タンパク質（１～５ｎＭ）の存在下で測定した。複合体形成は、Ｃ５タンパク質および放射能標識ＡＲＣ１８６を、１ｍＭ　$MgCl_2$を含有するＰＢＳ中で室温（２３℃）にて一緒に混合することにより開始し、ニトロセルロース濾過によって分離することにより停止した。解離反応について記載のように、反応開始と濾過間の持続時間を変えることにより、複合体形成の経時変化を得た。平衡化の経時変化は、ニトロセルロースフィルター上に捕捉される放射能標識ＡＲＣ１８６のパーセント増加として観察され、単一指数関数的減衰によって良好に示され、この場合、結合ＡＲＣ１８６％＝

【０２１８】

【数２】

$$100 \times (1 - e^{-k_{1}t})$$

である。１、２および４ｎＭ　Ｃ５の平衡化の経時変化図１２に示す。予測されたとおり、k_{eq}の値は［Ｃ５］とともに線形的に増加する（k_{eq}（１ｎＭ）＝０．１９±０．０２分$^{-1}$；k_{eq}（２ｎＭ）＝０．３９±０．０３分$^{-1}$；k_{eq}（３ｎＭ）＝０．５９±０．０５分$^{-1}$；k_{eq}（４ｎＭ）＝０．７７±０．０６分$^{-1}$；k_{eq}（５ｎＭ）＝０．８８±０．０６分$^{-1}$）。該実験条件下では、k_{eq}、k_1およびk_{-1}間の関係$k_{eq}=k_1$［Ｃ５］＋k_{-1}である。したがって、k_1の推定値は、k_{eq}対［Ｃ５］のプロットの傾きから誘導され（図１２挿入図参照）、この場合では、０．１８±０．０１ｎＭ$^{-1}$分$^{-1}$である。

【０２１９】

これらのデータは、低Ｃ５濃度（例えば、０．１ｎＭ）条件下では、Ｃ５と放射能標識ＡＲＣ１８６の混合物が平衡に達するために、長時間のインキュベーションが必要とされることを示す。このような条件下では、k_{eq}＝（０．１８±０．０１ｎＭ$^{-1}$分$^{-1}$）（０．１ｎＭ）＋０．０１３分$^{-1}$＝０．０３分$^{-1}$であり、２２分の半減期に相当する。したがって、ほぼ２時間の室温インキュベーション（約５半減期）が、完全な（＞９５％）平衡化に必要とされる。短いインキュベーション時間（例えば、１５分）では、上記の１５分（K_D＝０．５ｎＭ）対４時間（K_D＝０．０８ｎＭ）インキュベーションで観察された親和性の差に示されるように、複合体の実際の親和性が有意に過小評価される。室温K_Dの代替的な推定値は、$K_D=k_{-1}/k_1$の関係に従う速度論データから計算され得る。この場合、算出されるK_Dは０．０７±０．０１ｎＭであり、上記の熱力学的方法によって決定されるK_Dと完全に整合する。

【０２２０】

また、Ｃ５に対するＡＲＣ１８６（配列番号：４）の特異性を、ニトロセルロース濾過アッセイにおいて、補体カスケードでＣ５の上流および下流両方の補体成分との比較によって評価した。精製ヒトタンパク質およびタンパク質複合体は、Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｔｙｌｅｒ，ＴＸ）から、例えば、Ｃ１ｑ（カタログ番号Ａ０９９．１８；２．３μＭ）、Ｃ３（カタログ番号Ａｌ　１３ｃ．８；２７μＭ）、Ｃ５（カタログ番号Ａ１２０．１４；５．４μＭ）、Ｃ５ａ　ｄｅｓ　Ａｒｇ（カタログ番号Ａ１４５．６；６０μＭ），ｓＣ５ｂ－９（カタログ番号Ａ１２７．６；１μＭ），第Ｂ因子（カタログ番号Ａ１３５．１２；１１μＭ）および第Ｈ因子（カタログ番号Ａ１３７．１３Ｐ；６．８μＭ）を購入した。ＰＢＳ＋１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０２ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡおよび０．００２ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡ中でタンパク質の連続希釈を行ない、１～４時間２５℃または３７℃でインキュベートすることにより結合反応を確立させ、次い

で、上記のニトロセルロース濾過装置に適用した。解離定数K_Dを、等式：ニトロセルロース結合％＝大きさ（ａｍｐｌｉｔｕｄｅ）×［Ｃ５］／（K_D＋［Ｃ５］）へのデータのフィットによるニトロセルロース結合％対［Ｃ５］の半対数プロットから決定した。

【０２２１】

図１３に示す結果は、アプタマーは、本質的に、Ｃ５ａを認識しない（K_D＞＞３μＭ）が、おそらくＣ５ｂ成分との相互作用により可溶性Ｃ５ｂ－９（K_D＞０．２μＭ）に対して弱い親和性示すを示す。他の補体成分は、アプタマーに対して中程度から弱い親和性を示す。非活性化Ｃ３は、本質的に、アプタマーに結合しない。しかしながら、第Ｈ因子（K_Dは約１００ｎＭ）および、程度はかなり低いがＣ１ｑ（K_D＞＝０．３μＭ）は結合する。総合すると、データは、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）が、主にＣ５ｂドメインの認識によって、高親和性でヒトＣ５に結合することを示す。したがって、ＡＲＣ１８６およびそのＰＥＧ化誘導体、例えば、ＡＲＣ１９０５は、細菌のオプソニン作用に重要なＣ３ｂの生成または調節因子によるＣ活性化の生得的な制御を妨げないはずである。

【０２２２】

高分子量ＰＥＧ部分とのアプタマーのコンジュゲーションにより、立体障害の可能性が誘導され、親和性の低下がもたらされる。ＰＥＧ修飾されたアプタマーは、このようなアプタマーが標的タンパク質の非存在下であってもニトロセルロースに付着する傾向があるため、直接結合について、ニトロセルロース濾過アッセイによって容易に評価されない。しかしながら、このようなアプタマーの相対親和性は、標的に対する結合（競合結合アッセイとして知られるニトロセルロース濾過によって測定、３７℃で実施）について、放射能標識された非ＰＥＧ化アプタマー（＜１０ｐＭ）と競合する比較能力から評価され得る。コールド（すなわち、非放射能標識）競合体の濃度を増大させるにつれて、標的タンパク質に結合される放射能標識されたアプタマーの割合は減少する。図１４に示されるように、コールドＡＲＣ１８６（配列番号：４）またはＰＥＧ化アプタマー（ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５））（０．０５～１０００ｎＭ）の濃度の増大により、放射能標識ＡＲＣ１８６（配列番号：４）と、２ｎＭ　Ｃ５タンパク質の存在下での結合について容易に競合する。さらに、すべての４種類のアプタマーの滴定曲線はほぼ重複し、これは、ＡＲＣ６５７、ＡＲＣ６５８およびＡＲＣ１８７の場合のＰＥＧ－コンジュゲーションが、Ｃ５に対するアプタマーの親和性に対してほとんど、または全く効果がないことを示す。

【０２２３】

同様の試験において、Ｃ５への結合に対するＰＥＧコンジュゲーションの効果を、ＡＲＣ６７２（５’末端アミンを有するＡＲＣ１８６；配列番号６３）と、ＡＲＣ１９０５（分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイル）ＰＥＧと結合体化されたＡＲＣ６２７）とを、競合結合アッセイを用いて比較することにより試験した。各アプタマーの１０μＭストックをＰＢＳ＋１ｍＭ　$MgCl_2$、０．０１ｍｇ／ｍＬ　ＢＳＡ、０．００２ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡ中にて調製し、連続希釈し、＞１００倍範囲のアプタマー濃度を含む１０×試料列を作製した。次いで、各試料の１２μＬアリコートを９６ウェルプレート内で９６μＬの^{32}Ｐ－放射能標識ＡＲＣ１８６に添加し、標識およびコールド競合体の１．１×溶液を作製した。次いで、９０μＬの標識／競合体溶液を、１０μＬの１０×Ｃ５タンパク質に添加し、反応を開始した。各反応における放射能標識ＡＲＣ１８６の最終濃度を一定に保持した。結合反応を１５～３０分３７℃で平衡化させ、次いで、上記のニトロセルロースフィルター装置にて濾過した。データ解析の目的のため、コールド競合体アプタマーを、ＡＲＣ１８６／Ｃ５相互作用の競合的インヒビターとして扱った；阻害％は、データを、競合体を含まない対照反応物（０％阻害対照）に対して標準化することにより計算した。IC_{50}値は、等式：阻害％＝大きさ×［競合体］^{n}／（$IC_{50}{}^n$＋［競合体］^{n}）へのデータのフィットによる阻害％対［ＡＲＣ６７２］または［ＡＲＣ１９０５］の半対数プロットから決定した。

【０２２４】

図６０に示されるように、分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ

］）－プロピル－１－カルバモイル）ＰＥＧの付加は、競合的結合によって測定したとき、アプタマー親和性に対してほとんど、または全く効果がなかった。図６０のＩＣ$_{50}$対Ｃ５データに対する直線フィットのｙ切片により、ＡＲＣ６７２およびＡＲＣ１９０５について、それぞれ、０．４６＋／－０．１４９ｎＭおよび０．７１＋／－０．１３０ｎＭのＫ$_{D}$値が推定された。値はともに、３７℃でＡＲＣ１８６について決定されたＫ$_{D}$に近い。

【０２２５】

また、ＡＲＣ１９０５とＣ５間の相互作用の温度依存性を、競合アッセイによって推定した。ＡＲＣ１９０５を連続希釈し、上記の１０×試料列を作製した。結合反応を１～４時間２５℃または３７℃で平衡化させ、次いで、ニトロセルロースフィルター装置にて濾過した。阻害割合は、データを、競合体を含まないか対照反応物（０％阻害対照）またはＣ５タンパク質を含まないか対照反応物（１００％阻害対照）に対して標準化することにより計算した。ＩＣ$_{50}$値を、等式：阻害％＝大きさ×［競合体］^{n}／（ＩＣ５０^{n}＋［競合体］^{n}）へのデータのフィットによる阻害％対［ＡＲＣ６７２］または［ＡＲＣ１９０５］の半対数プロットから決定した。図６１に示されるように、ＡＲＣ１９０５は、２５℃および３７℃の両方において、Ｃ５に高親和性で結合する。ＩＣ$_{50}$対Ｃ５データのｙ切片から、２５℃および３７℃において、それぞれ、０．１５±０．０４８ｎＭおよび０．６９±０．１４８ｎＭのＫ$_{D}$値が得られた。値はともに、上記のＡＲＣ１８６／Ｃ５相互作用について決定されたＫ$_{D}$値と整合する。

【０２２６】

実施例１Ｂ：全血アッセイ

補体系の第二経路に対する抗Ｃ５アプタマーの効果を、以下の全血アッセイを用いて解析した。抗凝固剤の非存在下、血液を正常ヒト志願者から採取した。血液のアリコート（抗凝固剤を含有しない）を、漸増濃度のＡＲＣ１８６（配列番号：４）とともに５時間、室温または３７℃でインキュベートした。試料を遠心分離して血清を単離し、血清中のＣ５ｂの存在を、ｓＣ５ｂ－９　ＥＬＩＳＡ（Ｃ５ｂ－９　ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によって検出した。図１５に示されるように、異なる温度でインキュベートされた試料間の抗補体活性（Ｃ５ｂ－９の生成に反映される）は、３μＭで分岐した。室温データにより、定量的阻害に必要とされるアプタマーの濃度は、報告されていたＣ５の濃度はおよそ４００ｎＭであるが、３～６μＭの範囲内であるがことが示された。これらの結果は、１０倍モル過剰より多くの抗Ｃ５アプタマー（ＡＲＣ１８６；配列番号：４）が、完全なＣ５の阻害活性に必要とされ得ることを示す。

【０２２７】

実施例１Ｃ：ザイモサンによる補体活性化

ザイモサンは、酵母細胞壁の多糖成分であり、第二補体カスケードの強力な活性化剤である。血液、血漿または血清のエキソビボ試料へのザイモサンの添加により、補体活性化産物、例えば、Ｃ５ａおよびＣ５ｂ－９の可溶性型（ｓＣ５ｂ－９）の蓄積がもたらされる。非希釈ヒト血清（Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｌｏｏｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）、クエン酸塩加ヒト全血（Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｌｏｏｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）またはカニクイザル血清（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）の試料を、漸増濃度のＡＲＣ６５８（配列番号：６２）（ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の３０Ｋ　ＰＥＧ　類縁体）でスパイク（ｓｐｉｋｅ）した。補体を活性化するため、ザイモサン（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）含有１０×懸濁液を試料に最終濃度５ｍｇ／ｍＬまで添加した。１５分間３７℃でのインキュベーション後、ザイモサン粒子を遠心分離によって除去し、補体活性化の程度をＣ５ａおよび／またはｓＣ５ｂ－９　ＥＬＩＳＡ　（Ｃ５ｂ－９　ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｃ５ａ　ＥＬＩＳＡキット，ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によって測定した。

【０２２８】

アプタマーの非存在下において、ザイモサン処理により、未処理試料では約１％活性化

であるのに比べ、血清または全血Ｃ５の約５０％が活性化される。抗Ｃ５アプタマーの５０ｎＭまで（血中Ｃ５濃度の約１０％）の添加は、ｓＣ５ｂ－９形成に対してほとんど効果がなかった。しかしながら、漸増濃度のＡＲＣ６５８（配列番号：６２）でのＣ５のさらなる滴定によって、Ｃ５活性化は、図１６に示されるように用量依存的に阻害された。ヒト血清または全血において、定量的（約９９％）阻害が、０．８～１μＭ　ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）（Ｃ５に対して約２モル等量に相当するアプタマー）で観察された。カニクイザル血清中に匹敵する阻害を達成するには、より高濃度のアプタマーが必要であった。この場合、９９％阻害は、１０μＭ　アプタマーすなわちＣ５に対して約２０モル等量のアプタマーの存在下でのみ達成された。

【０２２９】

同様の試験において、ＡＲＣ１９０５（ＡＲＣ１８６の分枝鎖４０ｋＤａ（２，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－１－カルバモイル）ＰＥＧ化型）の阻害効果を、ヒトおよびカニクイザル試料において、第二経路により補体活性化するザイモサンを用い、以下のようにして試験した。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ由来のザイモサンＡは、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｉｎｃ．（カタログ番号Ｚ４２５０－１Ｇ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）の製品であった。ザイモサンＡは粉末の製品であり、ダルベッコのＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ，カタログ番号１４１９０－１４４）に再懸濁し、５０ｍｇ／ｍＬの懸濁液を得た。凍結してプールされた正常ヒト血清（カタログ番号ＩＰＬＡ－ＳＥＲ）を、Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｓｏｕｔｈｆｉｅｌｄ，ＭＩ）から購入した。凍結してプールされたカニクイザル血清（カタログ番号ＣＹＮＳＲＭ）を、Ｂｉｏｒｅｃｌａｍａｔｉｏｎ　（Ｈｉｃｋｓｖｉｌｌｅ，ＮＹ）から購入した。該供給元から得た５～１０ｍＬ血清のバイアルを３７℃で解凍し、アリコート（約１ｍＬ）を採取し、－２０℃保存した。アリコートは、必要に応じて、使用直前に３７℃でのインキュベーションによって解凍し、実験中は氷上で保存した。各アッセイでの血清の最終濃度は約１００％であった。ＡＲＣ１９０５の２０μＭストックを０．９％生理食塩水中で調製し、連続希釈し、約９０倍範囲アプタマー濃度を含む１０×試料列を作製した。また、アプタマーなし（生理食塩水のみ）の試料も陰性（０％阻害）対照として含めた。

【０２３０】

９０μＬの血清を９６ウェルＰＣＲプレート（ＶＷＲ，カタログ番号１４４２－９５９６）のウェル内にピペッティングした。１０μＬのアプタマー試料を、室温で、直接血清中に希釈して混合した。８μＬの５０ｍｇ／ｍＬザイモサンを別の９６ウェルＰＣＲプレートのウェル内にピペッティングした。両プレートを同時に３７℃で１５分間プレインキュベートした。プレインキュベーションの直後、８０μＬの血清／アプタマー混合物を８μＬのザイモサンに直接添加して混合し、５ｍｇ／ｍＬのザイモサン最終濃度にした。反応プレートを密閉し、１５分間３７℃でインキュベートした。インキュベーションの最後に、ウェル内への８μＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡのピペッティングおよび混合によって、反応をクエンチした。ザイモサンを遠心分離（３７００ｒｐｍ、５分間、室温）によってペレット化し、約８０ｕＬのクエンチされた上清みを新たな９６ウェルＰＣＲプレートに移し、密閉した。上清みを液体窒素中でフラッシュ凍結し、－２０℃で保存した。ザイモサン非依存性バックグラウンド活性化を制御するため、ザイモサンの代わりに８μＬの生理食塩水を添加したこと以外は、厳密に上記のようにして血清試料を調製および処理した。

【０２３１】

Ｃ５活性化の程度は、Ｃ５ａ　ＥＬＩＳＡ　（ＡＬＰＣＯ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｗｉｎｄｈａｍ，ＮＨ，カタログ番号ＥＩＡ－３３２７）によってＣ５ａ　ＥＬＩＳＡキットプロトコルに従って測定された各ザイモサン活性化試料中に生成されたＣ５ａの相対レベルから決定した。Ｃ５ａ　ＥＬＩＳＡキットはヒト特異的試薬を含み、血漿または血清試料中でのヒトＣ５ａ（ｈＣ５ａ）の解析用に構成されている。したがって、カニクイザル濃度標準を用い、カニクイザルＣ５ａに対するＥＬＩＳＡの応答をキャラクタライズすることが必要であった。１組のカスタム（ｃｕｓｔｏｍ）標準を調製するため、ヒトま

たはカニクイザル血清の０．５ｍＬのアリコートを、５ｍｇ／ｍＬのザイモサンとともに１５分間３７℃でインキュベートし、１２．５μＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡでクエンチし、遠心分離してザイモサンを除去した。ザイモサン活性化ヒト血清試料中のＣ５ａの濃度は、キット内に設けられたｈＣ５ａ標準血漿との比較により、およそ２μｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａであると測定された。カニクイザル試料中のＣ５ａの濃度は、ヒトＣ５ａ当量（ｈＣ５ａ当量）で示すと、およそ０．６μｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａ当量であると測定された。０．４～４００　ｎｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａまたは０．１２～１２０　ｎｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａ当量の範囲を含む標準列を、ラット血清（ＥＬＩＳＡを妨害しない）中への希釈によって調製した。標準を、ＥＬＩＳＡキットプロトコルに指示されたようにしてタンパク質沈降試薬で前処理し、さらに希釈せずにＥＬＩＳＡプレートに適用した。ＥＬＩＳＡプレートを４５０ｎｍの最大吸光度（A_{450}）において、ＶｅｒｓａＭａｘ　ＵＶ／可視光吸光度プレートリーダー　（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）を用いて読み取りを行なった。A_{450}は、低Ｃ５ａでは、０．１～０．２の低値でＣ５ａ濃度により異なり、高Ｃ５ａでは、約３．５で安定状態であった。アッセイ試料中でのＣ５ａの定量の目的のため、定量の上限および下限は、それぞれ、ヒトでは２５および０．７８ｎｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａとし、カニクイザルでは１５および０．９４　ｎｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａ当量とした。A_{450}対ｎｇ／ｍＬ　ｈＣ５ａまたはｈＣ５ａ当量を、図６２に示すようにプロットし、等式$y=((A-D)/(1+(x/C)^{B}))+D$を用いたデータへの４パラメータフィットにより標準曲線を得た。

【０２３２】

Ｃ５ａ解析の直前、アッセイ試料（生理食塩水のみおよびザイモサンなし対照を含む）を、ＥＬＩＳＡキットプロトコルに指示されたようにしてタンパク質沈降試薬で前処理し、次いで、０．９％生理食塩水中で連続希釈した。非希釈アッセイ試料（一部のザイモサンなし対照を含む）中のＣ５ａレベルは、典型的には、定量上限（ＵＬＯＱ）を超えた。したがって、全範囲のアッセイ試料Ｃ５ａ濃度が包含されるように、１／５、１／５０および１／２５０の希釈物を試験した。Ｃ５ａレベルを、適切な（ヒトまたはカニクイザル）標準曲線との比較によって定量し、希釈物に対して補正した。各アプタマー濃度での阻害％を、等式　阻害％＝１００－１００×（$C5a_{試料}-C5a_{ザイモサンなし}$）／（$C5a_{試料のみ}-C5a_{ザイモサンなし}$）を用いて計算した。IC_{50}値を、等式　阻害％＝$(阻害\%)_{最大}\times[ARC1905]^{n}/(IC_{50}^{n}+[ARC1905]^{n})$＋バックグラウンドを用いた阻害％対［ＡＲＣ１９０５］のプロットから決定した。IC_{90}およびIC_{99}値はＩＣ５０値から、等式　$IC_{90}=IC_{50}\times[90/(100-90]^{n}$および$IC_{99}=IC_{50}\times[99/(100-99]^{n}$を用いて算出した。

【０２３３】

Ｃ３活性化（共通の補体経路におけるＣ５のすぐ上流の段階）の程度を、Ｃ３ａ　ＥＬＩＳＡ（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＯｐｔｉＥＩＡ　Ｃ３ａ　ＥＬＩＳＡキット，カタログ番号５５０４９９，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）によってＣ３ａ　ＥＬＩＳＡキットプロトコルに従って測定された各ザイモサン活性化試料中に生成されたＣ３ａの相対レベルから測定した。

【０２３４】

Ｃ３ａ解析の直前、試料（生理食塩水のみおよびザイモサンなし対照を含む）を０．９％生理食塩水中で連続希釈した。Ｃ３ａ　ＥＬＩＳＡは、Ｃ５ａのものより感度が高い；したがって、全範囲の試料Ｃ３ａ濃度が包含されるように、１／５００、１／５０００および１／２５，０００の希釈物が必要であった。Ｃ５ａ解析のために調製したカスタム標準の代わりにヒト血清由来のキット標準を使用した。Ｃ３ａレベルは大きく異ならなかったため、ヒト特異的標準は、その相対レベルの充分な表示を提供した。

【０２３５】

Ｃ５ａおよびＣ３両方のＥＬＩＳＡから得られたデータを、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌを用いて解析し、平均阻害％値を、Ｋａｌｅｉｄａグラフ（バージョン３．５１，Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いてプロットした。IC_{50}、IC_{90}および

ＩＣ$_{99}$値を、ＥｘｃｅｌへのＸＬｆｉｔ　４．１プラグインを用いて決定した。このアプローチによって測定されたヒトおよびカニクイザル補体活性化に対するＡＲＣ１９０５の比較効果を図６３および図６４にまとめる。これらの図からわかるように、第二経路による完全なＣ５活性化の阻害は、インビトロでＡＲＣ１９０５により、ヒトおよびカニクイザル血清の両方において達成可能である。ヒト血清では、非希釈試料中での９０％Ｃ５活性化の阻害に必要とされるＡＲＣ１９０５の濃度は４４２±２３ｎＭであり、Ｃ５の平均モル濃度とほぼ同等であった。しかしながら、ＡＲＣ１９０５は、カニクイザル補体活性に対しては、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値に反映されているように、該アッセイ条件下で効力は４～６倍低かった。

【０２３６】

Ｃ３ａレベルによって測定されたＡＲＣ１９０５　Ｃ３活性化の効果を図６５にまとめる。補体経路の最終段階を特異的に標的化する理論的説明は、Ｃ５ａおよび膜攻撃複合体（ＭＡＣ）の炎症促進機能を、Ｃ３ａおよびＣ３ｂの生成において最高度に達する（ｃｕｌｍｉｎａｔｅ）上流因子の病原体と戦う機能を損なうことなくブロックすることである。図６５のデータは、２μＭまでのＡＲＣ１９０５はＣ３ａ生成を阻害しないことを示し、上流補体の活性化は、ＡＲＣ１９０５によってマイナスの影響を受けないことを示す。第二経路Ｃ５活性化の本質的に完全なブロックは、ヒトおよびカニクイザル血清試料の両方においてＡＲＣ１９０５を用いて達成された。ＡＲＣ１９０５は、このアッセイ条件下では、カニクイザルＣ５活性化の阻害において、ヒトＣ５活性化よりも効力の低い大きさであった。理論に拘束されることを望まないが、補体活性化に対するＡＲＣ１９０５の阻害効果は、Ｃ３の活性化が阻害されなかったため、Ｃ５に特異的である。

【０２３７】

実施例１Ｄ：補体活性化のチュービングループモデル

心肺バイパス回路に見られるような、異物への曝露によって誘発される補体活性化をブロックする抗Ｃ５アプタマーの能力を試験するため、本発明者らは、Ｎｉｌｓｓｏｎおよびｃｏｌｌｅａｇｕｅｓ（Ｇｏｎｇら，（１９９６）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１６，２２２－９；Ｎｉｌｓｓｏｎら，（１９９８）Ｂｌｏｏｄ　９２，１６６１－７）によって記載されたチュービングループモデルを使用した。Ｔｙｇｏｎ　Ｓ－５０－ＨＬ医療用／外科用チュービング（１／４インチ内径）（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｌａｓｔｉｃ　Ｃｏｒｐ．（（Ｌｉｍａ，ＯＨ）、カタログ番号００５４２）を、およそ３００ｍｍ（およそ９ｍＬ容）の長さに切断し、０．４単位／ｍＬのヘパリン（Ｃｅｌｓｕｓ）および種々の濃度のＡＲＣ６５８（配列番号：６２）（０～５μＭ）を含有する５ｍＬのヒトドナー血を充填した。各長さのＴｙｇｏｎチュービングを、短い切片（約５０ｍｍ）の非外科用シリコーン製連結チュービング（３／８インチ内径）（Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｐｌａｓｔｉｃ　Ｃｏｒｐ．（Ｒ－３６０３型、カタログ番号００２７１）により、Ｇｏｎｇらに記載のようにして１つのループに封止した。チュービングループを１時間、およそ３０ｒｐｍで３７℃の水浴中で回転させた。次いで、ループ内容物を、ＥＤＴＡ（１０ｍＭ最終濃度）を入れたポリプロピレン円錐チューブ内に注入し、補体活性化をクエンチした。血小板が不充分な血漿を遠心分離によって単離し、Ｃ５ａおよびＣ３ａについてＥＬＩＳＡ　（Ｃ３ａ　ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｃ５ａ　ＥＬＩＳＡキット，ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）解析した。

【０２３８】

アプタマーの非存在下における全補体活性化は、ザイモサンアッセイと比べて少量であった。典型的には、Ｃ５ａレベルは、１時間のインキュベーション後に、およそ６ｎｇ／ｍＬ増加し、これは、利用可能なＣ５の＜１％の活性化に相当した。それにもかかわらず、この増加は再現可能であり、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）での滴定によって阻害された。図１７に示されるように、３００～４００ｎＭのＡＲＣ６５８（配列番号：６２）は、９９％Ｃ５活性化の阻害を達成するのに充分であり、血中のＣ５のモル濃度とほぼ同等または若干少ないレベルであった。なんら理論に拘束されることを望まないが、Ｃ５活

性化の９９％阻害を得るために必要とされるアプタマーは、このモデルではザイモサンモデルよりも少ないが、この観察結果は、該２つのアッセイで用いた補体活性化刺激の実質的な差を反映するものであり得る。また、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）が、補体カスケードにおいてＣ５より早期に活性化段階をブロックしないことを確認するための対照として、Ｃ３ａ生成をモニターした。Ｃ３ａレベルは、１時間のインキュベーション後におよそ４０００ｎｇ／ｍＬ増加し、これは、利用可能なＣ３のほぼ１０％の活性化に相当した。Ｃ５ａ生成とは対照的に、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）で滴定したとき、Ｃ３ａ生成の用量依存的阻害はほとんど観察されず、これは、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）がＣ５切断を特異的にブロックすることを示す。

【０２３９】

チュービングループモデル試験を、抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ１９０５（配列番号６７）を用いて反復した。ＡＲＣ１９０５を０．９％生理食塩水中で連続希釈し、１００倍倍範囲のアプタマー濃度（該アッセイにおいて最終１０～１０００ｎＭ）を含む２０×試料列を作製した。非特異的オリゴヌクレオチド効果を制御するため、無関連アプタマー（ＡＲＣ１２７）を含有する試料を含めた。また、アプタマーなし（生理食塩水のみ）試料を陰性対照として含めた。単一のドナー血液試料を、標準的な静脈切開法によって内部志願者から採取した。全血を５例の別々のドナーから、直接６０ｍＬ容シリンジ（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，（Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）、カタログ番号３０９６５３）内に採取し、アリコートを直接、ビバリルジン（ｂｉｖａｌｉｒｕｄｉｎ）（最終２０μＭ）（Ｐｒｏｓｐｅｃ－Ｔａｎｙ　Ｔｅｃｈｎｏｇｅｎｅ　Ｌｔｄ．，（イスラエル）、ロット番号１０５ＢＩＶ０１）＋／－アプタマー中に採取した。補体活性化を妨害するヘパリンの代わりに、直接的なトロンビンインヒビターである抗凝固剤ビバリルジンを使用した。

【０２４０】

チュービングループモデルを、本質的にすぐ上に記載のとおりに行なった。チューブの約３００ｍｍ切片（直径１／４インチ、容量約９ｍＬ）に、５ｍＬの血液／アプタマー／ビバリルジン試料を、血液をドナーから採取した直後に充填した。次いで、チューブを短い切片（約５０ｍｍ）のシリコーン製連結チュービングによってループ状に確実に固定し、約４ｍＬのガス容量を得た。インキュベーション中、チュービングループを３７℃の水浴中で１時間、垂直方向に３２ｒｐｍで回転させた。インキュベーション後、５ｍＬの全試料を、１００μＬの０．５ＭのＥＤＴＡを入れた１５ｍＬ容円錐チューブ（Ｃｏｒｎｉｎｇ　（Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）、カタログ番号４３０７６６）に移し、１０ｍＭの最終ＥＤＴＡ濃度とした。１ｍＬの血漿上清みを、４℃（３，３００ｒｐｍ、２０分間）での遠心分離（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ　５８０４）後の各クエンチ試料から回収した。上清みを液体窒素中でフラッシュ凍結し、－２０℃で保存した。バックグラウンド活性化を制御するため、ＣＰＢ前試料を、５ｍＬの新鮮血を、直接、氷上で、１００μＬの０．５Ｍ　ＥＤＴＡを入れた１５ｍＬ容円錐チューブに添加することにより調製した。この試料を血漿に対して加工処置し、上記のようにして保存した。

【０２４１】

Ｃ５活性化の程度を、すぐ上に記載のＣ５ａ　ＥＬＩＳＡによって測定された、各活性化試料で得られたＣ５ａの相対レベルから測定した。Ｃ５ａ　ＥＬＩＳＡは、非希釈血漿試料においてＥＬＩＳＡキットプロトコルに従って行ない、試料Ｃ５ａレベルを、製造業者によって設けられたＣ５ａ標準との比較によって定量した。各アプタマー濃度でのＣ５生成の阻害％を、等式　阻害％＝１００－１００×（$C5a_{試料}$－$C5a_{CPB前}$）／（$C5a_{試料のみ}$-$C5a_{CPB前}$）を用いて計算した。IC_{50}値は、等式　阻害％＝（阻害％）$_{最大}$×［ＡＲＣ１９０５］^{n}／（$IC_{50}{}^{n}$＋［ＡＲＣ１９０５］^{n}）＋バックグラウンドを用いた阻害％対［ＡＲＣ１９０５］のプロットから決定した。IC_{90}およびIC_{99}値は、IC_{50}値から、等式　$IC_{90}=IC_{50}\times[90/(100-90]^{1/n}$および$IC_{99}=IC_{50}\times[99/(100-99]^{1/n}$を用いて算出した。

【０２４２】
Ｃ３活性化の程度を、すぐ上に記載のＣ３ａ　ＥＬＩＳＡによって測定された各活性化試料において得られたＣ３ａの相対レベルから測定した。Ｃ３ａ解析の直前、試料（生理食塩水のみおよびＣＰＢ前対照を含む）を０．９％生理食塩水中で連続希釈した。Ｃ３ａ　ＥＬＩＳＡは、Ｃ５ａのものより感度が高い；したがって、試料Ｃ３ａ濃度が包含されるように、１／５０００の希釈物の希釈物が必要であった。試料Ｃ３ａレベルをキット標準との比較によって定量し、阻害％を、Ｃ５ａで記載のようにして計算した。データを、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌを用いて解析し、平均阻害％値を、Ｋａｌｅｉｄａグラフ（バージョン３．５，Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いてプロットした。ＩＣ$_{50}$、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値を、ＥｘｃｅｌへのＸＬｆｉｔ　４．１プラグインを用いて決定した。

【０２４３】
５例のドナーにおける、補体活性化に対するＡＲＣ１９０５および無関連アプタマーであるＡＲＣ１２７の平均効果を図６６にまとめる。図６７に示されるように、Ｃ５活性化の完全なブロック（Ｃ５ａの生成に反映される）は、＜５００ｎＭのＡＲＣ１９０５で達成されたが、無関連アプタマーは、１μＭまで阻害効果はなかった。平均全血ＩＣ$_{50}$、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値は、それぞれ、１１９±２８．６ｎＭ、２６８±３９．２ｎＭおよび６９４±２４１ｎＭであった（図６６）。理論に拘束されることは望まないが、ＡＲＣ１９０５は細胞血容量から排除され、総量のおよそ４５％を構成していると想定するのが妥当である。したがって、血漿中でのＣ５阻害を反映するように調整されたＩＣ$_{50}$、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値は、２１６±５２．０ｎＭ、４８７±７１ｎＭおよび１２６１±４３８ｎＭであった。これらの値は、血清中でのザイモサン誘導型補体活性化のＡＲＣ１９０５阻害について計算されたパラメータと整合し、これは、細胞血成分がＡＲＣ１９０５抗Ｃ５活性を有意に妨害しないことを示す。Ｃ３ａ生成は、ＡＲＣ１９０５または１μＭまでの無関連アプタマーによって阻害されなかった。理論に拘束されることを望まないが、これは、ＡＲＣ１９０５が、Ｃ３コンバターゼ反応を阻害せず、第二カスケード活性化に寄与する他の段階、例えば、Ｃ３沈着およびコンバターゼ合成などもブロックしないことを示す。

【０２４４】
（実施例２）
デノボ選択および配列
ｄＲｍＹプールによるＣ５選択
ヒト完全長Ｃ５タンパク質に対するｄＲｍＹアプタマーを同定するため、２つの選択法を行なった。Ｃ５タンパク質（Ｑｕｉｄｅｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡまたはＡｄｖａｎｃｅｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）は、完全長（「ＦＬ」）で、部分トリプシン処理（「ＴＰ」）された形態で使用し、選択法はともに、疎水性プレート上に固定化させたタンパク質標的に対する直接的選択法であった。両選択法により、天然非選択プールと比べて完全長Ｃ５結合が有意に富化されたプールを得た。この実施例に示した配列はすべて、５’から３’に示す。

【０２４５】
プールの調製：配列を伴うＤＮＡ鋳型
ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＴＴＣＴＡＣＮ$_{(30)}$ＧＧＴＣＧＡＴＣＧＡＴＣＧＡＴＣＡＴＣＧＡＴＧ（ＡＲＣ５２０；配列番号：７０）の配列を有するＤＮＡ鋳型を、ＡＢＩ　ＥＸＰＥＤＩＴＥ^{TM}　ＤＮＡ合成装置を用いて合成し、標準的な方法によって脱保護した。鋳型を、５’プライマー
ＴＡＡＴＡＣＧＡＣＴＣＡＣＴＡＴＡＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＴＴＣＴＡＣ（配列番号：７１）および３’プライマー　ＣＡＴＣＧＡＴＧＡＴＣＧＡＴＣＧＡＴＣＧＡＣＣ（配列番号：７２）を用いて増幅し、次いで、Ｙ６３９Ｆ単一変異型Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いるインビトロ転写用の鋳型として使用した。転写は、２００ｍＭ　Ｈ

ＥＰＥＳ、４０mM ＤＴＴ、２mMスペルミジン、０．０１％ ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、１０％ＰＥＧ－８０００、９．５mM $MgCl_2$、２．９mM $MnCl_2$、２mM ＮＴＰ、２mM ＧＭＰ、２mMスペルミン、０．０１単位／μｌ 無機ピロホスファターゼ、およびＹ６３９Ｆ単一変異型Ｔ７ポリメラーゼを用いて行なった。

【０２４６】

選択：第１回目において、陽性選択工程を、ニトロセルロースフィルター結合カラムにおいて行なった。簡単には、1×10^{15}分子（０．５nmol）のプールＲＮＡを、３uMの完全長Ｃ５または２．６uMの部分トリプシン処理したＣ５を含む１００μＬの結合バッファー（１×ＤＰＢＳ）中で、１時間室温にてインキュベートした。ＲＮＡ：タンパク質複合体と遊離ＲＮＡ分子を、Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ ＆ Ｓｃｈｕｅｌｌ （Ｋｅｅｎｅ，ＮＨ）製の０．４５umニトロセルローススピンカラムを用いて分離した。カラムを１mＬの１×ＤＰＢＳで予備洗浄し、次いで、ＲＮＡ：タンパク質含有溶液をカラムに添加し、遠心分離機内で１５００ｇにて２分間スピンした。１mＬで３回のバッファー洗浄を行ない、非特異的結合剤をフィルターから除去し、次いで、フィルターに結合されたＲＮＡ：タンパク質複合体を、２００μｌの溶出バッファー洗浄液（７M尿素、１００mM 酢酸ナトリウム、３mM ＥＤＴＡ、９５℃に予備加熱）で２回溶出した。溶出されたＲＮＡを、沈殿させた（２μＬグリコーゲン、１容量のイソプロパノール、１／２容量のエタノール）。ＲＮＡを、ＴｈｅｒｍｏＳｃｒｉｐｔ ＲＴ－ＰＣＲ™系（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）により、製造業者の使用説明書に従って、上記の配列番号：７２の３’プライマーを用いて逆転写した後、ＰＣＲ増幅を行なった（２０mM Ｔｒｉｓ ｐＨ８．４、５０mM ＫＣｌ、２mM $MgCl_2$、０．５uMプライマー配列番号：７１および配列番号：７２、０．５mMの各ｄＮＴＰ、０．０５単位／μＬのＴａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ））。ＰＣＲ鋳型を、Ｃｅｎｔｒｉｃｅｐカラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ）を用いて精製し、次の回のプールを転写するために使用した。

【０２４７】

後続の回の選択では、結合ＲＮＡと遊離ＲＮＡの分離を、Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐ疎水性プレート（Ｎｕｎｃ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）において行った。選択（ｒｏｕｎｄ）は、完全長Ｃ５および部分トリプシン処理Ｃ５の両方２０ｐｍｏｌを、プレートの表面に、１時間室温にて１００μＬの１×ＤＰＢＳ中で固定化することにより開始した。次いで、上清みを除去し、ウェルを１２０μＬの洗浄バッファー（１×ＤＰＢＳ）で４回洗浄した。次いで、タンパク質ウェルを、０．１ｍｇ／ｍＬの酵母ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬのサケ精子ＤＮＡを競合体として含有する１×ＤＰＢＳバッファーでブロックした。使用したプール濃度は、常に、タンパク質濃度の少なくとも５倍過剰とした。また、プールＲＮＡを室温で１時間、空のウェル内でインキュベートしてプラスチック結合配列（あれば）を除去し、次いで、タンパク質を含まないブロックしたウェル内でインキュベートし、陽性選択段階の前に、競合体結合配列（あれば）を該プールから除去した。次いで、プールＲＮＡを室温で１時間、インキュベートし、ＲＴミックス（３’プライマー配列番号：７２およびＴｈｅｒｍｏｓｃｒｉｐｔ ＲＴ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の添加によって、固定化Ｃ５に結合されたＲＮＡを選択プレート内で直接逆転写した後、６５℃で１時間インキュベーションした。得られたｃＤＮＡを、ＰＣＲ（Ｔａｑポリメラーゼ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）のための鋳型として用いた。増幅されたプール鋳型ＤＮＡを、Ｃｅｎｔｒｉｓｅｐカラム（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ）によって製造業者の推奨する条件に従って脱塩し、次の回の選択のためのプールＲＮＡの転写をプログラムするために使用した。転写されたプールは、各回ごとに１０％ポリアクリルアミドゲルにてゲル精製した。

【０２４８】

選択の進行は、サンドイッチフィルター結合（ドットブロット）アッセイを用いてモニターした。５’－^{32}Ｐ標識プールＲＮＡ（わずかな濃度）を、Ｃ５、１×ＤＰＢＳ＋０

．１ｍｇ／ｍＬ　ｔＲＮＡおよび０．１ｍｇ／ｍＬサケ精子ＤＮＡとともに室温で３０分間インキュベートし、次いで、ドットブロット装置（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｕｅｌｌ）内のニトロセルロースおよびナイロンフィルターサンドイッチに適用した。ニトロセルロースに結合されたプールＲＮＡのパーセントを計算し、およそ３回ごとに、シングルポイント（ｓｉｎｇｌｅ　ｐｏｉｎｔ）スクリーニング（＋／－３００ｎＭＣ５）によってモニターした。プールのK_d測定値は、タンパク質の滴定および上記のドットブロット装置を用いて測定した。

【０２４９】

選択データ：両選択法では、天然プールに対して１０回の後、富化された。図１８参照。第１０回目では、プールのK_dは、完全長でおよそ１１５ｎＭおよびトリプシン処理選択で１５０ｎＭであったが、結合度は、両方において安定状態で、わずか約１０％であった。Ｒ１０プールを、ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてクローニングし、配列決定した。

【０２５０】

配列情報：各プール由来の４５個のクローンを配列決定した。Ｒ１０完全長プールは、単一のクローンＡＲＣ９１３（配列番号：７５）によって優位に占められ、これは該プールの２４％を構成し、２組の複製物および単一の配列が残部を構成した。Ｒ１０トリプシン処理プールは、８コピーの同じ配列ＡＲＣ９１３（配列番号：７５）を含んでいたが、該プールは、別の配列（ＡＭＸ２２１．Ａ７；４６％）によって優位に占められていた。クローンＡＲＣ９１３（配列番号：７５）は、約１４０ｎＭのK_dを有し、結合度は２０％となった。図１９参照。

【０２５１】

表５に示された個々の配列は、５’から３’の方向に表示されており、提供されたｄＲｍＹ　ＳＥＬＥＸ^{TM}条件下で選択されたアプタマーのリボヌクレオチド配列を表す。この選択によって誘導される（および配列表に反映された）本発明の実施形態では、プリン（ＡおよびＧ）はデオキシであり、ピリミジン（ＵおよびＣ）は２’－ＯＭｅである。表５に示された配列は、キャッピング（例えば、３’逆位ｄＴ）を含むものであっても、含まないものであってもよい。以下のアプタマーの特有の配列は、固定配列の直後の２３位のヌクレオチドから始まり、

ＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＵＵＣＵＡＣ（配列番号：７３）

３’の固定核酸配列ＧＧＵＣＧＡＵＣＧＡＵＣＧＡＵＣＡＵＣＧＡＵＧ（配列番号：７４）に接するまでに及ぶ。

【０２５２】

表５：Ｃ５　ｄＲｍＹアプタマーのヌクレオチド配列

ＡＲＣ９１３（配列番号：７５）

【０２５３】

【化１４ａ】

GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCGA
UCGAUCAUCGAUG

溶血性アッセイ：補体系の古典的経路に対するＡＲＣ９１３（配列番号：７５）の効果を、前述の溶血性アッセイを用いて解析し、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）（抗Ｃ５アプタマー、陽性対照）および非選択ｄＲｍＹプール（陰性対照）の両方と比較した。溶血性阻害のアッセイでは、０．２％ヒト全血清の溶液を、抗体コートヒツジ赤血球（Ｄｉａｍｅｄｉｘ　ＥＺ　Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ　ＣＨ５０　Ｔｅｓｔ，Ｄｉａｍｅｄｉｘ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｉａｍｉ，ＦＬ）と、滴定されたＡＲＣ９１３（配列番号：７５）の存在下で混合した。該アッセイは、カルシウム、マグネシウムおよび１％ゼラチンを含有するベロナール緩衝生理食塩水（ＧＶＢ　補体バッファー）中で行ない、１時間２５℃でインキュベートした。インキュベーション後、試料を遠心分離した。上清みの４１５ｎｍにおける光学密度（OD_{415}）を読み取った。溶血活性の阻害を対照と比較した溶

血活性％として示す。図２０参照。アプタマーのＩＣ$_{50}$は約３０ｎＭであると算出された。

【０２５４】

（実施例３）

組成および配列最適化

実施例３Ａ：ＡＲＣ９１３の最小化：

ＡＲＣ９１３（配列番号：７５）を基礎とする６種類の構築物を転写し、ゲル精製し、Ｃ５に対する結合についてドットブロットにて試験した。ＡＲＣ９５４は、１３０ｎＭのＫ$_{d}$および２０％の結合度を有する親クローンと類似していたが、ＡＲＣ８７４（配列番号：７６）は、１ｕＭのＫ$_{d}$でＣ５に結合された唯一の他のクローンであった。

【０２５５】

表６に示された個々の配列は、５’から３’の方向に表示されており、提供されたｄＲｍＹ　ＳＥＬＥＸ条件下で選択された選択されたアプタマーから誘導した。この選択によって誘導される（および配列表に反映された）本発明の実施形態では、プリン（ＡおよびＧ）はデオキシであり、ピリミジン（ＵおよびＣ）は２’－ＯＭｅである。表６に示された配列は、キャッピング（例えば、３’逆位ｄＴ）を含むものであっても、含まないものであってもよい。

【０２５６】

表６．ＡＲＣ９１３最小化クローンのヌクレオチド配列

【０２５７】

【化１５】

ARC874 (　配列番号　76)

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGG

ARC875 (　配列番号　77)

CCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAAACGCAGGG

ARC876 (　配列番号　78)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAUACCC

ARC877 (　配列番号　79)

GGGUUUGGCACAGGCAUACAAACCC

ARC878 (　配列番号　80)

GGCGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGCC

ARC954 (　配列番号　81)

CGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCG

実施例３Ｂ：ＡＲＣ９１３の最適化：ドープ（ｄｏｐｅｄ）再選択

Ｃ５結合親和性に対するクローンＡＲＣ９１３（配列番号：７５）の最適化および重要な結合要素の決定の両方を行なうため、ドープ再選択を行なった。ドープ再選択法は、活性なクローンまたはミニマー（ｍｉｎｉｍｅｒ）内での配列要件を検討するために使用される。選択法は、単一の配列を基に設計された合成の縮重したプールを用いて行なわれる。縮重のレベルは、通常、７０％～８５％の野生型ヌクレオチドで異なる。一般に、中立変異が観察されるが、場合によっては、配列変化により、親和性の改善がもたらされ得る。次いで、複合配列情報は、最小結合モチーフを同定するため、および最適化の取り組みを補助するために使用され得る。

【０２５８】

プールの調製：鋳型配列

ｔａａｔａｃｇａｃｔｃａｃｔａｔａＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＴＴＣＴＡＣＮ$_{(30)}$ＧＴＴＡＣＧＡＣＴＡＧＣＡＴＣＧＡＴＧ（配列番号：８２）は、ＡＲＣ９１３（配列番号：７５）を基礎とし、１５％レベルで（すなわち、各ランダム（「Ｎ」）位に

）ドープしたランダム領域由来の各残基を用いて合成し、残基は、野生型配列ＣＴＴＧＧＴＴＴＧＧＣＡＣＡＧＧＣＡＴＡＣＡＴＡＣＧＣＡＧＧＧＧＴＣＧＡＴＣＧ（配列番号：８３）に見られるヌクレオチドである可能性を８５％、その他の３つのヌクレオチドの１つである可能性を１５％有する。

【０２５９】

ドープ再選択用の鋳型およびＲＮＡプールを、本質的に上記のようにして調製した。鋳型は、プライマーｔａａｔａｃｇａｃｔｃａｃｔａｔａＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＴＴＣＴＡＣ（配列番号：８４）およびＣＡＴＣＧＡＴＧＣＴＡＧＴＣＧＴＡＡＣ（配列番号：８５）を用いて増幅した。２つの選択法を、完全長Ｃ５を用いて行ない、一方の選択では、より高濃度の塩を洗浄工程で用いた。選択プロトコルは上記のようにして行なったが、２つの例外を伴った：１）第１回目（およびすべての後続の回）は、疎水性プレートにおいて行ない、陽性段階のみとした；ならびに２）選択中、競合体は全く使用しなかった。Ｃ５濃度およびＲＮＡプール濃度は、それぞれ、２００ｎＭおよび１ｕＭで一定に維持した。

【０２６０】

ドープ再選択データ。通常選択法および高塩選択法の両方により、天然プールに対してに対して５回の後、富化された。第５回でのプールの$Ｋ_d$は、高塩選択でおよそ１６５ｎＭ、および通常塩選択で１７５ｎＭであった。結合度は、両方において安定状態で約２０％であった。Ｒ４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、各プール由来の４８個のクローンを配列決定した。各プール由来の１２個のクローンを転写し、シングルポイントドットブロットアッセイにおいて５００ｎＭ　Ｃ５でアッセイした。解離定数（$Ｋ_d$）を再度、前述のドットブロットアッセイを用いて測定した。$Ｋ_d$を、シングルポイントスクリーニングで同定された最良の１１個のクローンについて、等式：結合したＲＮＡの割合＝大きさ＊$Ｋ_d$／（Ｋｄ＋［Ｃ５］）にデータをフィットさせることにより推定した。最良の３つの$Ｋ_d$を有するクローンは、配列番号：９１（７３ｎＭ）、配列番号：９６（８４ｎＭ）および配列番号：９５（９２ｎＭ）であった。これらの１１個のクローンの配列を以下に表７に示す。

【０２６１】

表７に示された配列は、５’から３’の方向に表示されており、提供されたｄＲｍＹＳＥＬＥＸ条件下で選択されたアプタマーのリボヌクレオチド配列を表す。この選択によって誘導される（および配列表に反映された）本発明の実施形態、本文に示したような残基のｄＲｍＹ組合せを含む対応する配列では、プリン（ＡおよびＧ）はデオキシであり、ピリミジン（ＵおよびＣ）は２’－ＯＭｅである。表７に示された配列の各々は、キャッピング（例えば、３’逆位ｄＴ）を含むものであっても、含まないものであってもよい。以下のアプタマーの各々の特有の配列は、５’固定配列の直後の２３位のヌクレオチドから始まり、

ＧＧＧＡＧＡＧＧＡＧＡＧＡＡＣＧＵＵＣＵＡＣ（配列番号：８６）

３’固定核酸配列ＧＵＵＡＣＧＡＣＵＡＧＣＡＵＣＧＡＵＧ（配列番号：８７）に接するまでに及ぶ。

【０２６２】

【化１６】

表７．ドープ再選択によるクローンのヌクレオチド配列

（配列番号　88）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　89）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUGUCGAUCUGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　90）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUAAAUACGCAGGGCUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　91）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCCCAGGCAUAUAUACGCAGGGAUUGAUCCGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　92）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCGCAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　93）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGUUGUGGCACAGCCAACCCUACGCACGGAUCGCCCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　94）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUACAUACGCAGGUCGAUCGGUUACGACUA

（配列番号　95）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUAGGUUCGCACUGUCAUACAUACACACGGGCAAUCGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　96）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCNCAGGCAUANAUACGCACGGGUCGAUCGGUUACGACUAGCAU

（配列番号　97）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUUCUCUGCCACAAGCAUACCUUCGCGGGGUUCUAUUGGUUACGACUAGCAUCGAUG

（配列番号　98）
GGGAGAGGAGAGAACGUUCUACCUUGGUUUGGCACAGGCAUAUAUACGCAGGGUCGAUCCGUUACGACUAGCAUCGAUG

実施例３Ｃ：ＡＲＣ１８６の４０ｋＤａ分枝鎖ＰＥＧ修飾

オリゴヌクレオチド５’NH_2－ｆＣｍＧｆＣｆＣＧｆＣｍＧｍＧｆＵｆＣｆＵｆＣｍＡｍＧｍＧｆＣＧｆＣｆＵｍＧｍＡｍＧｆＵｆＣｆＵｍＧｍＡｍＧｆＵｆＵｆＵＵＡｆＣｆＣｆＵｍＧｆＣｍＧ－３Ｔ－３’（ＡＲＣ６７２、配列番号：６３）を、Ｅｘｐｅｄｉｔｅ　ＤＮＡ合成装置（ＡＢＩ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）において、推奨された製造業者の手順に従い、標準的な市販の２’－ＯＭｅ　ＲＮＡおよび２’－Ｆ　ＲＮＡおよびＴＢＤＭＳ保護ＲＮＡホスホロアミダイト（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，ＶＡ）ならびに逆位デオキシチミジンＣＰＧ支持体を用いて合成した。末端アミン機能を、５’－アミノ修飾体である６－（トリフルオロアセチルアミノ）ヘキシル－（２－シアノエチル）－（Ｎ，Ｎ－ジイソプロピル）－ホスホロアミダイト、Ｃ６－ＴＦＡ（Ｇｌｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｓｔｅｒｌｉｎｇ，ＶＡ）により結合した。脱保護後、オリゴヌクレオチドを、Ｓｕｐｅｒ　Ｑ　５ＰＷ（３０）樹脂（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上でのイオン交換

クロマトグラフィーによって精製し、エタノール沈殿させた。

【０２６３】

アミン修飾アプタマーを、合成後に異なるＰＥＧ部分に結合体化させた。アプタマーを、１．５～３ｍＭの濃度まで水／ＤＭＳＯ（１：１）溶液に溶解した。炭酸ナトリウムバッファー（ｐＨ８．５）を１００ｍＭの最終濃度まで添加し、オリゴを一晩、等容量のアセトニトリルに溶解した１．７モル過剰の所望のＰＥＧ試薬（例えば、ＡＲＣ１９０５　４０ｋＤａ　Ｓｕｎｂｒｉｇｈｔ　ＧＬ２－４００ＮＰ　ｐ－ニトロフェニル炭酸エステル［ＮＯＦ　Ｃｏｒｐ，Ｊａｐａｎ］またはＡＲＣ１８７　４０ｋＤａ　ｍＰＥＧ２－ＮＨＳエステル［Ｎｅｋｔａｒ，Ｈｕｎｔｓｖｉｌｌｅ　ＡＬ］）と反応させた。得られた生成物を、Ｓｕｐｅｒ　Ｑ　５ＰＷ（３０）樹脂（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上でのイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、Ａｍｂｅｒｃｈｒｏｍ　ＣＧ３００－Ｓ樹脂（Ｒｏｈｍ　ａｎｄ　Ｈａａｓ）上で行なう逆相クロマトグラフィーを用いて脱塩し、凍結乾燥した。ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の構造を図２１に示し、ＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）の構造を図２２に示す。

【０２６４】

（実施例４）

単離された灌流心臓モデル

実施例４Ａ：ＡＲＣ１８６を用いた原理の照明

ヒト血漿中の補体成分Ｃ５の平均濃度は、およそ５００ｎＭである。Ｋｒｅｂｓ　Ｈｅｉｎｓｅｌｅｉｔバッファーで灌流した単離されたマウス心臓を６％ヒト血漿に曝露すると、ヒト補体カスケードが活性化され、Ｃ５のＣ５ａおよびＣ５ｂへの切断がもたらされる。続いて、Ｃ５ｂ成分は補体成分Ｃ６、Ｃ７、Ｃ８およびＣ９と、「膜攻撃複合体」（「ＭＡＣ」またはＣ５ｂ－９）としても知られる複合体を形成し、これは、心臓血管および心筋細胞を損傷し、したがって、心筋機能不全（拡張終期圧の増大、不整脈）および不全収縮に至る（Ｅｖａｎｓら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，３２，１１８３－１１９５（１９９５））。以前に、ヒトＣ５切断をブロックするモノクローナルの単鎖抗体（ＰｅｘｅｌｉｚｕｍａｂまたはＰｅｘｅｌｉｚｕｍａｂの単鎖ｓｃＦｖ型）がこのモデルにおいて試験され、心筋障害および機能不全を抑制することが示された（Ｅｖａｎｓら，１９９５）。

【０２６５】

このモデルを用い、Ｃ５ブロッキングアプタマーＡＲＣ１８６（配列番号：４）が、Ｐｅｘｅｌｕｚｉｍａｂと同様、単離された灌流マウス心臓に対するヒトＣ５媒介性補体損傷を阻害することを確立した。Ｃ５７　Ｂｌ／６マウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，（Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）から購入した。簡単には、深い麻酔の誘導後、各マウスの心臓を取り出し、心臓をＫｒｅｂｓ　Ｈｅｉｎｓｅｌｅｉｔバッファーで連続的に灌流する大動脈内に挿入したブラント針上に置いた。圧力変換器（Ｍｏｕｓｅ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を左心室内に挿入し、心拍数および心室内圧の連続測定を可能にした。１５分間の平衡化（この間、ベースライン測定を行なった）後、続いて、心臓を、バッファーおよび６％ヒト血漿＋／－種々の濃度のアプタマーで灌流した（図２３参照）。この試験中、およびＥｖａｎｓらに記載のように、本発明者らは、Ｋｒｅｂｓ　Ｈｅｉｎｓｅｌｅｉｔバッファー＋６％ヒト血漿で灌流した心臓は、血漿を灌流液に添加して５分以内に機能不全となったが、バッファー単独で連続的に灌流した心臓は、２時間を越えて鼓動が継続されたことを示した。したがって、各実験の長さを、随意裁量で１５分間と規定した。ＡＲＣ１８６を用いた、この試験の概要を図２３に示す。

【０２６６】

心室内圧を連続してモニターおよび記録し、圧力波形を得た（図２４および２５）。最下部の偏向点は拡張終期圧（「ＥＤＰ」）を表し、最も高い偏向点は、収縮期圧（「ＳＰ」）を表す。ベースライン圧力波は、波形上で「０」と表示した黒い垂直線の左側に出現している。既報のように（Ｅｖａｎｓら，１９９５）、６％ヒト血漿で灌流した心臓は、

左心室の拡張終期圧が急速に増大し、５分以内に、最終的に不全収縮が最高度に達した（心臓が停止した）（図２４）。無関連アプタマーをヒト血漿に５０倍モル過剰で添加した場合も、ＥＤＰの増大および不全収縮が観察された（図２４）。

【０２６７】

ＡＲＣ１８６を同等モルで系に添加した場合もまた、ＥＤＰの急激な増大が見られ、不全収縮が最高度に達した（図２５）。補体媒介性損傷、ＥＤＰの増大および不全収縮を受けた心臓のすべての３つの群において、心臓は、実験の最後までに、明らかに浮腫および腫脹していた。ＡＲＣ１８６を血漿に１０倍または５０倍（図２５）モル過剰で添加した場合、心室の圧力波は正常に維持され、不全収縮は観察されなかった。また、前述の浮腫および腫脹は、これらの群において明白ではなかった。

【０２６８】

各実験中、心拍数を５分間のインターバルで記録し、各インターバルでの各群の平均心拍数グラフで示した。図２６に示されるように、アプタマーなし、または無関連アプタマーを伴って灌流した心臓は、通常、５分以内で急速に不全収縮を発現した。系に同等モルで添加されたＡＲＣ１８６は、不全収縮の発生が若干遅かった。しかしながら、この郡の心臓は最終的に機能不全となった。血漿に１０倍または５０倍モル過剰で添加されたＡＲＣ１８６では、各実験の持続時間中、心拍数が保持された。

【０２６９】

ベースラインに対する心臓重量の増加割合を、不全心臓（アプタマーなしまたは５０倍モル過剰の無関連アプタマー）の代表的な試料について計算し、ＡＲＣ１８６保護心臓（１０倍および５０倍モル過剰のＡＲＣ１８６）と比較した。図２７に示されるように、ＡＲＣ１８６保護心臓は、対照群の不全心臓よりも重量増加が有意に少なかった。

【０２７０】

ＡＲＣ１８６は、Ｃ５切断を阻害するがＣ３切断は阻害しないため、Ｃ５切断生成物（Ｃ５ａまたは Ｃ５ｂ）ではなくＣ３切断生成物（Ｃ３ａ）が、ＡＲＣ１８６によって保護された単離された心臓から流出される排出液中に見られるはずである。ＡＲＣ１８６がヒト血漿Ｃ５の切断を阻害したことを直接示すため、ヒト補体タンパク質Ｃ５ａおよびｃ５ｂ （Ｃ５切断生成物）ならびにＣ３ａ（Ｃ３切断生成物）の相対レベルを、種々の群由来のバッファー排出液中で市販のＥＬＩＳＡキット（Ｃ５ｂ－９ ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｃ５ａおよびｃ３ａ ＥＬＩＳＡキット，ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によって測定した。ＡＲＣ１８６は、ヒト血漿Ｃ５切断ならびにＣ５ａ（図２８）およびＣ５ｂ－９（図２９）の生成を用量依存的に阻害した。対照的に、ＡＲＣ１８６は、ヒトＣ３のＣ３ａおよびＣ３ｂ（図３０）の切断に対して効果がなく、該分子のＣ５特異性がさらに示された。

【０２７１】

いったん生成されると、補体Ｃ３ｂおよびｃ５ｂ断片は、補体活性化部位の近傍の組織上に局所的に沈着する。実験終了後、マウス心臓をＯＣＴ培地（Ｓａｋｕｒａ Ｆｉｎｅｔｅｋ，Ｔｏｒｒａｎｃｅ，ＣＡ）中で凍結し、切片化し、次いで標準的な免疫組織化学法を用い、ヒトＣ３ｂ （クローンＨ１１，Ｃｈｅｍｉｃｏｎ，Ｔｅｍｅｃｕｌａ，ＣＡ）、ヒトＣ５ｂ－９（クローンａＥ１１，ＤＡＫＯ，Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ，ＣＡ）または対照マウスＩｇＧ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ，ＣＡ）の存在について染色した。試験の結果を図３１に示す。

【０２７２】

この試験において記載のように、Ｃ５ブロッキングアプタマーＡＲＣ１８６は、補体系に対する抗Ｃ５抗体Ｐｅｘｅｌｕｚｉｍａｂの効果を試験した既報の試験（Ｅｖａｎｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３２：１１８３，（１９９５）において記載されたモデルに基づき、Ｋｒｅｂｓ Ｈｅｉｎｓｅｌｅｉｔバッファーおよび６％ヘパリン化ヒト血漿で灌流した単離されたマウスの心臓を用いる補体成分Ｃ５媒介性組織損傷のエキソビボモデルにおいて試験した。このモデルを用い、Ｃ５ブロッキングアプタマーが、（ａ）ヒト血漿Ｃ５の切断を阻害する（がＣ３の切断は阻害しない）、（ｂ）マウス心臓組

織上へのヒトＣ５ｂの沈着を阻害する（がＣ３ｂの沈着は阻害しない）および（ｃ）臨床的に関連性のある濃度（５μＭ、１０倍モル過剰のアプタマー対Ｃ５）でヒトＣ５ｂ－９媒介性心筋機能不全を阻害することが示された。これらのデータは、ヒト補体カスケードが生理学的に関連性のある様式で活性化された場合、Ｃ５ブロッキングアプタマーは、血漿Ｃ５の切断を阻害でき、心筋障害および機能不全が予防され得ることを示す。

【０２７３】

実施例４Ｂ：ＰＥＧ化されたアプタマーの有効性

この試験に用いた材料および方法は、上記の実施例４Ａに記載のものと厳密に同じであった。実験計画および結果を図３２に示す。実験の前半では、ヒトヘパリン化血漿（Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を補体の供給源として使用し、後半では、ヘパリン化カニクイザル血漿（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）を補体の供給源として使用した。ＰＥＧ化されたアプタマー（ＡＲＣ６５８；配列番号：６２）を系に漸増モル比で添加した。関連性のある心室の圧力追跡はすべて収集したが、表には、拡張終期圧（ＥＤＰ）の増大の存在または非存在、不全収縮が起こったか否か、および心不全（ＥＤＰの上昇および不全収縮の存在として規定）までの時間を示す。

【０２７４】

ヒト血漿を用いた実験では、ＡＲ６５８（配列番号：６２）の最適用量は同等モル（５００ｎＭ）であると決定されたが、非ヒト霊長類血漿を用いた実験では、心臓をＣ５ｂ媒介性損傷から保護するのに５０倍モル過剰（２５μＭ）が必要であった（図３２参照）。

【０２７５】

これらのデータは、インビトロデータによって示されたヒト対非ヒト霊長類のＣ５での抗Ｃ５アプタマーの親和性における差と整合する。なんら理論に拘束されることを望まないが、実施例５に記載した本発明者らのその後のカニクイザルＰＫ／ＰＤ試験において、本発明者らは、ザイモサン媒介性血漿Ｃ５切断を阻害するのに３０倍モル過剰のアプタマーが必要であることをさらに示し、これは、アプタマーは、ヒトＣ５よりも低い親和性で霊長類Ｃ５に結合するという見解をさらに支持する。

【０２７６】

集合的に、これらの試験は、両方のＣ５ブロッキングアプタマーＡＲＣ１８６（配列番号：４）およびＡＲＣ６５８（配列番号：６２）（より高い程度で）が、マウスの単離された灌流心臓モデルにおいて効果的であることを示す。また、このモデルで、カニクイザル血漿Ｃ５媒介性心臓損傷（３０＋モル過剰）を阻害するには、ヒトＣ５媒介性心臓損傷（同等モル）と比べて、有意に多くのＡＲＣ６５８（配列番号：６２）をしなければならないことが示され、これは、アプタマーが霊長類Ｃ５に対して、より低い親和性を有することが示されたインビトロデータことをさらに支持する。最後にこれらのデータにより、ＰＫ／ＰＤ試験においてインビボＣ５ブロックを実証するためには、カニクイザルに、３０倍モル過剰より多くを投与する必要があり得ることが示された。

【０２７７】

（実施例５）

動物における抗Ｃ５アプタマーの薬物代謝および薬物動態

実施例５Ａ～５Ｇにおいて、質量基準の濃度データすべて、ＰＥＧコンジュゲーションによってもたらされる質量とは無関係に、アプタマーのオリゴヌクレオチド部分の分子量のみを示す。

【０２７８】

実施例５Ａ：霊長類およびラット血漿中でのＣ５インヒビターＡＲＣ１８６の代謝安定性

アプタマーの非ＰＥＧ化されたオリゴヌクレオチド前駆体（すなわち、ＡＲＣ１８６；配列番号：４）を、その安定性、反応速度論および分解経路を評価するために、ラットおよびカニクイザル血漿（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ

，ＭＡ）中で試験した。試験は、３７℃で９５％プール血漿（クエン酸塩加）中で５０時間にわたてインキュベートした５’末端放射能標識（^{32}Ｐ）アプタマーを用いて行なった。選択した時点で、アプタマー含有血漿のアリコートを採取し、直ちに液体窒素中でフラッシュ凍結し、－８０℃で保存した。血漿中のアプタマーおよびその代謝産物の検出および解析を、液液（フェノール－クロロホルム）抽出の後、ゲル電気泳動（１０％変性ポリアクリルアミド配列決定用ゲル上）および高分解能オートラジオグラフィーを用いて行なった。

【０２７９】

図３３は、ラットおよびカニクイザル血漿の両方におけるインキュベーション時間の関数としての、完全長アプタマーの残留割合の対数線形プロットを示す。両種における分解プロフィール本質的に一相系のようであり、速度定数はおよそｋ約０．００２時間$^{-1}$である。

【０２８０】

実施例５Ｂ：静脈内投与後のラットにおけるＡＲＣ６５７、ＡＲＣ６５８およびＡＲＣ１８７の薬物動態

ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）の薬物動態プロフィールを評価するため、ならびに霊長類およびヒトに必要とされる投与レベルおよび頻度を推定するため、薬物動態試験を、カテーテル挿入Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）において行なった。アプタマーを、１０ｍｇ／ｍＬ（オリゴ重量）での注射用に標準的な生理食塩水にて製剤化し、予め滅菌した投与バイアル内に無菌的条件下で滅菌濾過（０．２μｍ）した。ラットでの試験に使用した投与経路は、１０ｍｇ／ｋｇの用量での尾静脈を介する静脈内ボーラスであった。試験集団（ａｒｍ）は１群あたり３匹の動物で構成し、該動物から、投与前および４８時間にわたる経過において指定の時点で逐次的採血を行なった。試験計画の概略を図３４に示す。血液試料を、外科的に埋入した頚静脈カテーテルから採取し、ＥＤＴＡコートチューブに直接移し、反転させることによって混合し、血漿の加工処理まで氷上に置いた。

【０２８１】

血漿を、血液／ＥＤＴＡチューブの５０００ｒｐｍで５分間の遠心分離によって回収し、上清み（血漿）を予備標識した新たなチューブに移した。血漿試料を、解析時点まで－８０℃で保存した。ＡＲＣ１８７に関する血漿試料の解析は、市販の蛍光核酸検出試薬Ｏｌｉｇｒｅｅｎ^{TM}（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）を入れたアッセイウェルへの血漿アリコートの直接添加を用いる均一系アッセイ形式を用いて行なった。光から保護して室温で短時間のインキュベーション期間（５分）後、アッセイプレートの読み取りを、蛍光プレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｇｅｍｉｎｉ ＸＳ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）によって行なった。各ウェルからの蛍光シグナルはウェル内のアプタマーの濃度に比例し、試料濃度を、蛍光－濃度標準曲線からの蛍光値（二連または三連の曲線の平均値）の内挿によって計算した。平均血漿濃度は、各時点で各群の３匹の動物から得た。血漿濃度対時間データを、業界標準の薬物動態モデル設計ソフトウエアＷｉｎＮｏｎＬｉｎ^{TM}バージョン４．０（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ Ｃｏｒｐ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を用いたノンコンパートメント解析（ＮＣＡ）に供した。以下の主な薬物動態パラメータ：最大血漿濃度、$C_{最大}$；濃度時間曲線下面積、ＡＵＣ；最終半減期、$t_{1/2}$；末端クリアランス、Ｃｌ；および定常状態の分布容積、V_{ss}について推定値を得た。

【０２８２】

平均血漿濃度対時間データを図３５に示し、図３６にプロットする。濃度対時間データを、ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ^{TM}バージョン４．０を用いたノンコンパートメント解析（ＮＣＡ）に供した。この解析によって、図３７に示す値が得られた。

【０２８３】

予測されたとおり、４０ｋＤａアプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）は、最長の半

減期を有し、２０ｋＤａアプタマーＡＲＣ６５７（配列番号：６１）は最短であった。既知血漿容量（約４０ｍＬ／ｋｇ）に対する観察されたＶｓｓは、血管外空間におけるタンパク質および／または組織マトリックスへのＡＲＣ１８７（配列番号：５）中程度の結合／封鎖を示した。５倍モル過剰のアプタマーの維持の必要性を仮定すると、この試験の結果によって、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）は、所望の血漿レベルを維持するのに必要とされるアプタマーの投与頻度および総量に関して有意な利点を提供することが示された。

【０２８４】

同様の組成のアプタマーを用いた齧歯類および霊長類における以前の試験（データ示さず）では、３０ｍｇ／ｋｇまでの用量において用量比例性／線形性が示されたため、この投与レベルが非線形薬物動態挙動をもたらすことは予測されない。

【０２８５】

実施例５Ｃ：静脈内投与後のマウスにおけるにおけるＡＲＣ１８７およびＡＲＣ１９０５の薬物動態

ＡＲＣ１８７（配列番号：５）と異なる４０ｋＤａの分枝鎖ＰＥＧに結合体化させたＡＲＣ１８６（配列番号：４）オリゴヌクレオチド主鎖の薬物動態プロフィールを評価するため、薬物動態試験を、雌ＣＤ－１マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡから入手）において行なった。アプタマーを、２．５ｍｇ／ｍＬ（オリゴ重量）での注射用に標準的な生理食塩水にて製剤化し、予め滅菌した投与バイアル内に無菌的条件下で滅菌濾過（０．２μｍ）した。マウスでの試験に使用した投与経路は、１０ｍｇ／ｋｇの用量での尾静脈を介する静脈内ボーラスであった。試験集団は１群あたり３匹の動物で構成し、該動物から、投与前（すなわち、非投与対照群）および７２時間にわたる経過において指定の時点で末端採血を行なった。試験計画の概略を図３８Ａに示す。

【０２８６】

血液試料を末端心臓穿刺によって採取し、ＥＤＴＡコートチューブに直接移し、反転させることによって混合し、血漿の加工処理まで氷上に置いた。血漿を、血液／ＥＤＴＡチューブの５０００ｒｐｍで５分間の遠心分離によって回収し、上清み（血漿）を予備標識した新たなチューブに移した。血漿試料を、解析時点まで－８０℃で保存した。ＡＲＣ１８７および１９０５に関する血漿試料の解析は、市販の蛍光核酸検出試薬Ｏｌｉｇｒｅｅｎ^{TM}（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）を入れたアッセイウェルへの血漿アリコートの直接添加を用いる均一系アッセイ形式を用いて行なった。光から保護して室温で短時間のインキュベーション期間（５分）後、アッセイプレートの読み取りを、蛍光プレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｇｅｍｉｎｉ　ＸＳ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）によって行なった。各ウェルからの蛍光シグナルはウェル内のアプタマーの濃度に比例し、試料濃度を、蛍光－濃度標準曲線からの蛍光値（二連または三連の曲線の平均値）の内挿によって計算した。平均血漿濃度は、各時点で各群の３匹の動物から得た。血漿濃度対時間データを、業界標準の薬物動態モデル設計ソフトウエアＷｉｎＮｏｎＬｉｎ^{TM}バージョン４．０（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を用いたノンコンパートメント解析（ＮＣＡ）に供した。以下の主な薬物動態パラメータ：最大血漿濃度、$C_{最大}$；濃度時間曲線下面積、ＡＵＣ；最終半減期、$t_{1/2}$；末端クリアランス、Ｃｌ；および定常状態の分布容積、V_{ss}について推定値を得た。平均血漿濃度対時間データを図３８Ｂにプロットする。

【０２８７】

濃度対時間データを、ＷｉｎＮｏｎＬｉｎ^{TM}バージョン４．０を用いたノンコンパートメント解析（ＮＣＡ）に供した。この解析によって、図３８Ｃに示す値が得られた。予測されたとおり、両社の４０ｋＤａ　ＰＥＧは、マウスにおいて同等の薬物動態を示した。

【０２８８】

すぐ上に記載したＯｌｉｇｒｅｅｎ解析に用いたＡＲＣ１８７および１９０５の同じ血

漿試料を、有効高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）アッセイをＵＶ検出とともに用いて解析した。

【０２８９】

ＡＲＣ１８７およびＡＲＣ１９０５の平均血漿濃度値を、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌ　２００３を用いて計算した。血漿濃度値が、投与前（時間０）において生体解析アッセイのＬＬＯＱ未満であった場合、０の値を割り当てた。投与後に得た試料のＬＬＯＱ未満の値は、平均血漿濃度の計算から除外した。平均血漿濃度データを、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ，バージョン５．１（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｏｕｎｔａｉｎｖｉｅｗ，ＣＡ）を用いたモデル非依存性ＰＫ解析において使用した。血漿濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\sim最後}$）を、線状台形公式を用いて推定した。計算では、投与前試料以外は、以外、アッセイのＬＬＯＱ未満の値はいずれもＰＫパラメータ推定値の計算から除外した。見かけ上の最終半減期を、式　$t_{1/2}=0.693/\lambda_z$（式中、λ_zは濃度対時間曲線の終端の傾きの回帰から推定した消失速度定数である）を用いて計算した。終末期のピーク濃度後の後の少なくとも３つの血漿濃度値を用いてλ_zを決定し、決定係数（r^2）は＞＝０．８５であることが必要であった。

【０２９０】

全般的に、ＨＰＬＣ解析により、すぐ上に記載のＯｌｉｇｒｅｅｎ解析は、ＡＲＣ１９０５およびＡＲＣ１８７が、平均$C_{最大}$、$AUC_{0\sim最後}$および$AUC_{0\sim\infty}$パラメータ推定値の比較に基づいて生物学的に等価であることがわかったことを示すことが確認される。ＡＲＣ１８７に対するＡＲＣ１９０５の$AUC_{0\sim最後}$および$AUC_{0\sim\infty}$の値における差（ＨＰＬＣによって測定）は、充分、生物学的等価性の許容基準の±２０％以内であった。

【０２９１】

実施例５Ｄ：静脈内ボーラス投与後のマウスにおけるＣ５インヒビターＡＲＣ６５７、ＡＲＣ６５８およびＡＲＣ１８７の組織取り込み試験

雌ＣＤ－１マウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓ（Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）から入手した。注射用のＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）の製剤は、生理食塩水中５ｍｇ／ｍｌとした。投与製剤を、無菌的条件下で予め滅菌した投与バイアル内に滅菌濾過（０．２μｍ）し、動物に、静脈内ボーラスで尾静脈を介して２５ｍｇ／ｋｇの用量で与えた。試験は、４つの時間点ｔ＝投与前、３、６、１２時間の各々について３匹の動物の群で構成した。放血後、各動物の血管系を生理食塩水で充分に（Ｖ約３０ｍＬ）フラッシュ洗浄した。血管系内に残留する血液（あれば）を除去した。組織（心臓、肝臓、腎臓）を回収し、重量測定し、次いで、標準的な生理食塩水中５０％ｗ／ｖでホモジナイズし、解析時点までまで－８０℃で保存した。

【０２９２】

ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）に関する組織の解析を、ハイブリダイゼーション系ＥＬＩＳＡ型アッセイを用いて行なった。このアッセイでは、ビオチン化捕捉プローブを、９６ウェルマイクロプレートのウェル内に、結合溶液濃度１２５ｎＭで３時間予備固定化した。プレートウェルを１×ＰＢＳで５回洗浄した。次いで、プレートを、１５０μｌ／ウェルの１×ＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ含有ＴＢＳ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）でブロックした。プレートを再度洗浄し、被覆し、使用まで４℃で保存した。別のチューブ内で、試料（１種類または複数種）を、ＦＡＭ標識（５’－フルオレセイン）試料検出プローブを２００ｎＭで含有するバッファー中、９０℃で１０分間アニーリングさせ、次いで、氷上でクエンチした。また、血漿／組織の濃度標準および対照試料も試料検出プローブ溶液をプレアニーリングさせ、次いで、固定化ビオチン捕捉プローブを入れたアッセイプレートウェル内にピペッティングし、４５℃で２．５時間アニーリングさせた。次いで、プレートを再度洗浄し、１μｇ／ｍＬのホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体化抗フルオレセインモノクローナル抗体（抗ＦＩＴＣ　ＭＡｂ－ＨＲＰ、Ｍｏｌｅ

ｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）を１×ＰＢＳ中に含む１×ＰＢＳを含有する溶液を１００μｌ／ウェルで充填し、およそ１時間インキュベートした。プレートを上記のようにして再度洗浄した。次いで、アッセイプレートェルに蛍光発生ＨＲＰ基質（ＱｕａｎｔａＢｌｕ，Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を含有する溶液１００μｌを充填し、光から保護して２０～３０分インキュベートした。４５分間のインキュベーション後、１００μｌ／ウェルの停止溶液を添加して蛍光沈殿生成反応をクエンチした。プレート読み取りを、直ちに、蛍光マイクロプレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｇｅｍｉｎｉ　ＸＳ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）において、３２５ｎｍでの蛍光励起および４２０ｎｍでの発光検出にて行なった。各ウェルの読み取りは１０回行なった。３種類のすべてのアプタマーが、心臓組織内で３つの時点で検出可能であった（図３９）。

【０２９３】

実施例５Ｅ：静脈内投与後のカニクイザルにおけるＣ５インヒビターＡＲＣ６５７、ＡＲＣ６５８およびＡＲＣ１８７の薬物動態および薬力学　試験１

注射用のＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）の製剤は、標準的な生理食塩水中１０ｍｇ／ｍＬとし、投与製剤を、無菌的条件下で予め滅菌した投与バイアル内に滅菌濾過（０．２μｍ）した。カニクイザルでの試験に使用した投与経路は、３０ｍｇ／ｋｇ（およそ５０倍モル過剰）の用量での外科的に埋入した大腿静脈カテーテルを介した静脈内ボーラスであった。試験計画の概略を図４０に示す。血液試料は、大腿静脈カテーテルから採取し、クエン酸ナトリウムコートチューブに直接移し、反転させることによって混合し、遠心分離して血漿（３０００ｒｐｍで５分間）を分離するまで氷上に置いた。次いで、血漿を２５０μｌのアリコートに分け、これを－８０℃で保存し、各試料のアリコートの１つをアプタマー濃度について、上記のラットＰＫのセクションで前述した蛍光系Ｏｌｉｇｒｅｅｎ™アッセイを用いて評価した。

【０２９４】

主な血漿濃度対時間データを、表形式で図４１に示す。予測されたとおり、４０ｋＤａ　ＰＥＧアプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）は血漿中に最長時間、残存したが、２０ｋＤａ　ＰＥＧアプタマーＡＲＣ６５７（配列番号：６１）は、最短量の時間、残存した。図４１に示すデータの詳しい検討により、このデータは、２コンパートメントモデルによって最良にフィットされたものであり得ることが示された。したがって、図４２に報告した薬物動態パラメータ推定値は、該２コンパートメントモデルから業界標準の薬物動態モデル設計ソフトウエアＷｉｎＮｏｎＬｉｎ™バージョン４．０（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を用いて誘導した。

【０２９５】

図４２に示されるように、すべてのアプタマーは、２３～３０μＭの間の同様のＣ最大値を有し、これは、アプタマー用量（３０ｍｇ／ｋｇ）が、Ｃ５濃度に対して５０倍モル過剰の血漿アプタマー（５０倍モル過剰、約２５μＭ）を達成するのに充分であったことを示す。ＡＲＣ６５７（２０ｋＤａ　ＰＥＧ）（配列番号：６１）およびＡＲＣ６５８（３０ｋＤａ　ＰＥＧ）（配列番号：６２）は分子量が１０，０００異なるが、同様の曝露（ＡＵＣ）、$t_{1/2}$（α）および$t_{1/2}$（β）値を有した。対照的に、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）は、その他の分子よりも有意に高い曝露（ＡＵＣ）値、長い$t_{1/2}$（α）および若干長い$t_{1/2}$（β）を有した。

【０２９６】

続いて、薬物動態試験中に採取した血漿試料のさらなるアリコートをインビトロで解析し、霊長類Ｃ５ブロックの有効性を調べた。ザイモサン活性化アッセイを上記のようにして行ない、それぞれ生成した霊長類Ｃ５ｂ－９およびＣ５ａの量を調べた。データを、いくつかの異なる形式、例えば、Ｃ５ｂ－９濃度対試料時間（図４３ａ）、Ｃ５ｂ－９　濃度対アプタマー濃度（図４３ｂ）、Ｃ５ａ濃度対試料時間（図４３ｃ）、およびＣ５ａ濃度対アプタマー濃度（図４３ｄ）でプロットした。

【０２９７】
４０ｋＤａ　ＰＥＧアプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）は、霊長類Ｃ５切断（Ｃ５ｂ－９およびＣ５ａ濃度）を最長時間阻害した（図４３ａおよび４３ｃ）。Ｃ５ｂ－９およびＣ５ａのデータをアプタマー濃度に対してプロットすると、Ｃ５ブロッキングアプタマーの濃度は、Ｃ５切断が完全に阻害されるためには、ＰＥＧ分子の大きさとは無関係に３０倍モル過剰を超えなければならないことが示された（図４３ｂおよび４３ｄ）。
【０２９８】
要約すると、カニクイザルＰＫ／ＰＤ試験によるデータは、（ａ）予測されたとおり、ＰＥＧ基の大きさとは無関係に、カニクイザルにおいてインビボでＣ５切断を阻害するためには、少なくとも３０倍モル過剰のアプタマー（約１５μＭ血漿アプタマー濃度）が必要であったこと、（ｂ）Ｃ５ブロッキングアプタマーは、この種において顕在的毒性を引き起こさなかったこと、および（ｃ）動物に比較的高レベル（５０倍モル過剰）で投与した場合、血漿アプタマーレベルは、試料採取の期間中、充分、適切なアッセイ範囲内であり、薬物動態パラメータの計算が可能であったことを示す。
【０２９９】
実施例５Ｆ：静脈内投与後のマカク属属サルにおけるＣ５インヒビターＡＲＣ６５８およびＡＲＣ１８７の薬物動態および薬力学－試験２
試験２は、以下のことを除き、上記の試験１と同様の計画であった。ａ）２種類の化合物だけ評価した（ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）；ｂ）動物の数を１群あたり４匹に増やした；およびｃ）１分間血漿試料を除き、代わりに１４４時間試料を用いて最終半減期計算がより多くのデータ点に基づくことを確実にした。製剤およびこれらの２種類のアプタマーの投与、血液試料採取ならびに血漿単離手法は、試験１で上記の方法と同一とした。試験２の計画を図４４にまとめる。
【０３００】
試験２の終了後、血漿アリコートを試験１に記載のようにして解析し、ａ）静脈内投与後、種々の時点での血漿中のアプタマーの濃度、およびｂ）Ｃ５ブロック有効性を測定した。
【０３０１】
血漿アプタマー濃度を時間の関数としてプロットし（図４５）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）の主なデータを表形式で、それぞれ図３９および４０に示す。４０ｋＤａ　ＰＥＧアプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）は血漿中に最長時間、残存した。図４５の詳しい検討により、このデータは、２コンパートメントモデルによって最良にフィットされたものであり得ることが示された。したがって、図４６に報告した薬物動態パラメータ推定値は、該２コンパートメントモデルからＷｉｎＮｏｎＬｉｎ™バージョン４．０（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ　Ｃｏｒｐ．，Ｍｏｕｎｔａｉｎ　Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を用いて誘導した。
【０３０２】
上記のＰＫ／ＰＤ試験１および試験２において得られた薬物動態パラメータを比較すると、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）のデータは、ＡＲＣ１８７の$t_{1/2}$（α）測定値を除き、同様であった。なんら理論に拘束されることを望まないが、２つの試験間でのＡＲＣ１８７の$t_{1/2}$（α）測定値における不一致は、おそらく、予備試験でのサンプルサイズが小さいことによるのもである。
【０３０３】
図４６に示されるように、Ｃ最大の値は、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）で同様であった。対照的に、薬物曝露（ＡＵＣ）は、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）で処置した動物において有意に大きかった。また、ＡＲＣ１８７は、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）と比べて長い$t_{1/2}$（α）および$t_{1/2}$（β）値を有した。これらのデータを、ＰＫ／ＰＤ試験１において得られたデータと合わせると、Ｃ５ブロッキングアプタマーＡＲＣ１８７は、所与の用量で最も有効なインビボＣ５ブロックをもたらし得ることが示される。

【０３０４】
続いて、薬物動態試験において採取した血漿試料のさらなるアリコートをインビトロ解析し、霊長類Ｃ５ブロックの有効性を測定した。前述と同様、ザイモサン活性化アッセイを行ない、それぞれ生成した霊長類Ｃ５ｂ－９およびＣ５ａの量を測定した。データを、Ｃ５ｂ－９濃度対アプタマー濃度（図４７）およびＣ５ａ濃度対アプタマー濃度（図４８）としてプロットした。ＰＫ／ＰＤ試験１において先に示されたように、Ｃ５ブロッキングアプタマーの濃度は、霊長類Ｃ５切断が完全に阻害されるためには、ＰＥＧ分子の大きさとは無関係に３０倍モル過剰（血漿Ｃ５濃度に対するアプタマー）またはおよそ１５μＭを超えなければならない（図４１および４２）。

【０３０５】
図３９および４０表のデータを詳しく検討することにより、３０ｍｇ／ｋｇのＩ．Ｖ．ボーラス後、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）は１５μＭより上でおよそ４時間維持されているが、ＡＲＣ１８７は、１５μＭより上でおよそ８時間維持されていることは明白である。したがって、類似した用量の薬物を与えると、４０ＫアプタマーＡＲＣ１８７は、３０ＫアプタマーＡＲＣ６５８（配列番号：６２）のおよそ２倍長い時間、臨床的有効性をもたらす。

【０３０６】
要約すると、カニクイザルは、インビボでＣ５変換をブロックするためには、血漿Ｃ５に対して少なくとも３０倍モル過剰のアプタマーで処置しなければならない。これらのデータは、Ｃ５結合アプタマーは、ヒトＣ５よりも霊長類Ｃ５に対して低い親和性を有することが示された先のインビトロ（溶血）およびエキソビボ（単離された灌流マウス心臓）試験と整合する。Ｃ５ブロッキングアプタマーは、Ｃ５濃度に対してアプタマーがおよそ５０倍モル過剰と同等である３０ｍｇ／ｋｇまでの用量での静脈内ボーラスとして安全に送達され得ることが示された。

【０３０７】
実施例５Ｇ：ボーラスＩＶ投与後のカニクイザルにおけるＡＲＣ１９０５
Ｃ５インヒビターＡＲＣ１９０５の薬力学を、静脈内投与後のカニクイザルにおいて評価した。注射用のＡＲＣ１９０５の製剤は、標準的な生理食塩水中７．５ｍｇ／ｍＬとし、投与製剤を、無菌的条件下で予め滅菌した投与バイアル内に滅菌濾過（０．２μｍ）した。カニクイザル（ｎ＝４）に、０（生理食塩水対照）または３０ｍｇ／ｋｇを静脈内ボーラス投与によって投薬した。血液試料は、末梢静脈または動脈アクセスポートから採取し、血液試料（０．５ｍＬ）を２カリウム（K_2）ＥＤＴＡチューブ内に移し、溶氷（ｗｅｔ　ｉｃｅ）上に置き、およそ４℃で収集してから３０分以内に遠心分離した。

【０３０８】
血漿試料をインビトロで解析し、霊長類Ｃ５ブロックにおけるＡＲＣ１９０５の有効性を測定した。実施例１ＣにおいてＡＲＣ１９０５に関して前述したザイモサンアッセイを用い、生成した霊長類Ｃ５ａの量を測定した。投与の０．５時間後および２時間後でのザイモサン後のＣ５ａ値の低下は、およそ同じ濃度および同じ投与経路投与された場合、ＡＲＣ１９０５が、カニクイザルにおいてＡＲＣ１８７と同様の様式で、Ｃ５切断をインビボで阻害することを示す（ザイモサン活性化アッセイを用いてインビトロで測定したとき）。

【０３０９】
実施例５Ｈ：ボーラスＩＶ投与および注入後のカニクイザルにおけるＣ５インヒビターＡＲＣ１８７の薬物動態および薬力学
また、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の薬物動態（ＰＫ）および薬力学的（ＰＤ）プロフィールを、静脈内負荷ボーラスの直後に静脈内注入を開始した後のカニクイザルにおいて評価した。この試験計画を図４９に示す。

【０３１０】
１ｕＭの標的定常状態血漿濃度を達成するのに必要な負荷ボーラス投与および注入の速度を、図５０に示すＩＶボーラス単独試験から誘導した薬物動態パラメータを用いて計算

した。

【０３１１】

合計３匹のカニクイザルに、ＩＶボーラスのＡＲＣ１８７を１ｍｇ／ｋｇで投与した直後、０．００１３ｍｇ／ｋｇ／分の速度で４８時間のＩＶ注入を開始した。全血試料を、処置の０～１９２時間後に採取し、溶氷上に保存し、血漿について加工処理し、次いで－８０℃で凍結保存した。血漿試料中のＡＲＣ１８７の濃度を、蛍光核酸染色アッセイ（実施例５Ｂに記載）およびＧＬＰ確認（ｖａｌｉｄａｔｅｄ）高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）アッセイの両方を用いて測定した。サル血漿中のＡＲＣ１８７の測定のためのＨＰＬＣアッセイ法は、ＣｌｉｎＴｒｉａｌｓ Ｂｉｏ－Ｒｅｓｅａｒｃｈ （Ｍｏｎｔｒｅａｌ、Ｃａｎａｄａ）によって確認した。確認試験は、米食品医薬品局（ＦＤＡ）医薬品安全性試験実施基準（ＧＬＰ）の規定（２１ＣＦＲ§５８）に準拠した。ＨＰＬＣアッセイ法は、選択性、線形性、定量下限（ＬＬＯＱ）、キャリーオーバー、アッセイ内の精密さおよび精度、アッセイ間び精密さおよび精度、ストック溶液安定性、注射媒体安定性、短期マトリックス安定性、凍結解凍安定性、長期マトリックス安定性ならびに希釈完全性に関して確認した。アッセイの使用可能な線状動的濃度範囲は、０．０８０～５０．０μＭであると決定された。

【０３１２】

このような条件下で測定されたＡＲＣ１８７のＰＫプロフィールは、ＩＶボーラスＰＫパラメータのみを用いて得られた計算値プロフィールと充分適合した（図５１参照）。１ｕＭの目標血漿濃度は投与後＜５分で確立され、全注入持続時間中、維持された。注入停止後、アプタマーは約４０～６０時間の最終クリアランス半減期$t_{1/2}$（β）を示した。

【０３１３】

カニクイザルにおけるＡＲＣ１８７（配列番号：５）の薬力学的活性を、前述のザイモサン活性化アッセイでのＰＫ試験において採取した血漿試料を用いることによりエキソビボで評価したが、カニクイザル試料血漿を１０％ヒト血漿中に１０倍希釈し、次いで、５ｍｇ／ｍＬザイモサンで処理するという変更を伴った。Ｃ５活性化（Ｃ５ａ切断生成物の出現によって反映される）を、ヒトＣ５ａに特異的なＥＬＩＳＡ（Ｃ５ａ ＥＬＩＳＡキット，ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）によって測定した。次いで、各試料中の活性なＡＲＣ１８７の濃度を、既知ＡＲＣ１８７レベルで調製した試料を用い、ザイモサンアッセイから誘導した標準曲線との比較によって定量した（図５２参照）。この試験は、ＡＲＣ１８７がその抗補体活性を、注入の持続時間中および注入後、上記の薬物動態プロフィールと実質的に整合するレベルで維持することを示す。

【０３１４】

実施例５Ｉ：ヒト投与での必要量の予測

ＣＡＢＧ術と関連する合併症の予防、改善または処置のためのヒト投与での必要量は、以下の仮定に基づく。第１に、ＣＡＢＧ患者には、手術開始前に抗Ｃ５アプタマーの単回静脈内ボーラス投与で投与した後に連続注入を行ない、１．５μＭの定常状態血漿濃度を、ＣＡＢＧ術後２４～４８時間確立および維持する。ボーラス投与および注入速度の推定値は、カニクイザルにおける前述のＩＶボーラス単独およびボーラス＋注入試験から誘導された薬物動態パラメータを用いた計算値に基づく。ボーラス投与ＡＲＣ１８７の推定値は１ｍｇ／ｋｇであり、随伴する注入速度は０．００１３ｍｇ／ｋｇ／分である。このボーラス＋４８時間注入レジメンでは、予測される薬物の全必要量は、ＡＲＣ１８７で０．４ｇであり、ここで質量は、オリゴヌクレオチドの重量のみを示す（図５３の表の第７欄を参照）。図５３に示す表の第２欄は、ＡＲＣ１８７のオリゴヌクレオチド部分に結合体化されたＰＥＧ基の重量を示し、第３欄は、ＡＲＣ１８７のオリゴヌクレオチド部分の分子量を示し（ＡＲＣ１８６（配列番号：４）をそのオリゴヌクレオチド配列として含む本明細書のすべてのアプタマーについても同じである）、第４欄は、上記の実施例３Ｃに記載のようなアミン反応性化学基を介してＡＲＣ１８６（配列番号：４）に結合体化された

４０ｋＤＡ　ＰＥＧの分子量を示し、第５欄は、２コンパートメントモデルにおけるＡＲＣ１８７のα段階の半減期を示し、第６欄は、２コンパートメントモデルにおけるＡＲＣ１８７のβ段階の半減期を示す。

【０３１５】

（実施例６）

抗Ｃ５アプタマーおよびヘパリン／プロタミン相互作用

抗Ｃ５アプタマーの予測される適用の一例は、冠動脈バイパス移植（ＣＡＢＧ）術に伴う炎症性副作用予防または軽減のための予防薬である。ＣＡＢＧ中、血栓症を予防するため、およびバイパスポンプの構成要素内の開通性を維持するために、典型的には、高濃度の抗凝固剤ヘパリン（３～５単位／ｍＬまたは１～２μＭ）が投与される。処置後、ヘパリンの効果の逆転および通常の止血の回復が、同様に高濃度のプロタミン（約５μＭ）の投与によって達成される。患者に対し、これらの薬物のいずれかの有効性が妨害される潜在的な危険性を考慮すると、抗Ｃ５アプタマーは、（１）いずれかの薬物の活性を改変しない、または（２）患者の抗凝固処置を複雑にし得る止血に対する内因性効果を示さないことが必要であった。

【０３１６】

ヘパリンは、正味負の電荷を有し、およそ１５ｋＤａの平均分子量を有する硫酸化多糖であり、凝固カスケード内のいくつかのプロテアーゼに対し、アンチトロンビンとの相互作用を促進することにより阻害効果を奏する。プロタミンは、高度に正の電荷を有するポリペプチドであり、少なくとも一部静電気的性である充分キャラクタライズされていない相互作用によってヘパリン活性をブロックすることができる。ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の機能中心は、ヘパリンと同様、高度にアニオン性である。したがって、ＡＲＣ１８７はヘパリン結合部位またはプロタミンに非特異的に結合し、これらの分子の活性を妨害し得ることが考えられ得る。以下の試験により、ＡＲＣ１８７の内因性（すなわち、ヘパリン様）抗凝固特性、ヘパリン機能に対するＡＲＣ１８７の効果、プロタミンによるヘパリン中和に対するＡＲＣ１８７の効果、およびＡＲＣ１８７の補体阻害特性に対するプロタミンの効果を検討した。

【０３１７】

実施例６Ａ：凝固に対するＡＲＣ１８７のインビトロ効果

血漿凝固能力に対するＡＲＣ１８７（配列番号：５）の内因性効果を、それぞれ、凝固カスケードの外因性および内因性集団、プロトロンビン時間（ＰＴ）ならびに活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）の標準的な臨床試験を用いて検討した。図５４に示されるように、充分過剰の推定（ｐｒｏｊｅｃｔｅｄ）用量（２０μＭまで）の濃度でのクエン酸塩加ヒト血漿の滴定により、ＰＴにおいて変化はもたらされず、ａＰＴＴが若干上昇したにすぎなかった。

【０３１８】

ヘパリンおよびプロタミンの機能に対するＡＲＣ１８７のインビトロ効果を評価するため、３例の固体由来の血液を、ＣＡＢＧ術で用いられるヘパリンレベルと関連する用量である４～５単位／ｍＬのヘパリン中に採取した。これらの試料の凝固能力を、手術中のヘパリン活性をモニターするために常套的に使用される全血凝固試験である活性凝固時間（ＡＣＴ）を用いて評価した。他の添加剤の非存在下におけるこれらのヘパリン濃度では、ＡＣＴが、約１５０秒間のベースライン値から４Ｕ／ｍＬのヘパリンの存在下で約５００秒間に、または５Ｕ／ｍＬのヘパリンの存在下で約８００秒間に有意に延長された。これらの試料への１０μＭ　ＡＲＣ１８７の添加は凝固時間に対してほとんど効果がなく、これは、ＡＲＣ１８７が、ヘパリンの抗凝固剤活性を妨害しないことを示す。

【０３１９】

ヘパリン抗凝固効果は、６～８μＭまで（４Ｕ／ｍＬヘパリン）または１２μＭ（５Ｕ／ｍＬヘパリン）のプロタミンでの滴定によって容易に中和された。ヘパリンおよび中和濃度のプロタミンの存在下でのＡＣＴ値は、本質的にベースラインと識別不可能であった。ＡＲＣ１８７の核酸コア（１２ｋＤａ）はプロタミン（５ｋＤａ）より大きい分子量

であるため、プロタミンへの等モル濃度のＡＲＣ１８７は、プロタミンの中和活性を完全に逆転させるのに充分であり得ることが予測され得る。しかしながら、ほぼ同等濃度のＡＲＣ１８７とのプロタミンのプレインキュベーションは、ＡＣＴに対してほとんど効果がなかった。中和濃度のプロタミンを含有する血液試料は、１０μＭのＡＲＣ１８７の存在下または非存在下で同様のＡＣＴ値を示し、これは、ＡＲＣ１８７がプロタミンの凝固促進活性に対し、あるとしてもわずかしか効果がないことを示す。これらの結果を図５５にまとめる。

【０３２０】

実施例６Ｂ：凝固に対するＡＲＣ１８７のインビボ効果

抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）の同時投与におけるヘパリンをプロタミン間の機能の相互作用を、臨床用量のヘパリンおよび臨床用量／臨床用量以下／臨床用量超過のプロタミンにおいて検討し、臨床血漿濃度以下／臨床血漿濃度超過のＡＲＣ１８７の存在が、プロタミンによるヘパリン抗凝固の逆転を妨害するか否かを調べた。この試験の結果を図５６にまとめる。簡単には、試験したすべてのヘパリン用量において、ベースラインＡＣＴ値は、１０ｕＭ（すなわち、臨床用量の１０倍モル過剰）のＡＲＣ１８７によって影響されなかった。同様に、ヘパリンによる抗凝固の程度は、１０ｕＭのＡＲＣ１８７によって影響されなかった。ＡＲＣ１８７の非存在下では、プロタミンの最小有効用量は約３０％（臨床用量＝１００％）であった。さらにまた、３０％プロタミンによるヘパリン抗凝固の逆転は、臨床用量の１０倍モル過剰（すなわち、１０ｕＭ）のＡＲＣ１８７によって影響されなかった。したがって、臨床状況（例えば、ＣＡＢＧ）における補体阻害のためのＡＲＣ１８７の使用は、典型的な用量でのヘパリンおよびプロタミンとの同時使用によって影響されないはずである。

【０３２１】

実施例６Ｃ：ＡＲＣ１８７抗補体機能に対するヘパリンおよびプロタミンの効果

ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の抗補体活性に対するヘパリンおよびプロタミンの効果を、実施例１に記載のようにしてザイモサンにより活性化したクエン酸塩加全血試料において検討した。ザイモサン活性化の直前、ＡＲＣ１８７を４つ：１）処理なし（ヘパリンまたはプロタミンなし）；２）４Ｕ／ｍＬヘパリン；３）６μＭプロタミン；４）４Ｕ／ｍＬヘパリン＋６μＭプロタミン、の条件下で処理したクエン酸塩加血液試料中に滴定した。ザイモサンでの活性化後、Ｃ５活性化を血漿中のｓＣ５ｂ－９のＥＬＩＳＡ測定によって定量した（Ｃ５ｂ－９　ＥＬＩＳＡキット，Ｑｕｉｄｅｌ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）。各条件について、Ｃ５活性化の阻害割合対ＡＲＣ１８７濃度として示した結果は、誤差内で識別不可能であった（図５７参照）。すべての場合で、完全な阻害が１～２μＭのＡＲＣ１８７により達成された。したがって、ヘパリンおよびプロタミンは別々または組合せで、そのＣＡＢＧ術における使用に関連性のある濃度において、ＡＲＣ１８７の抗補体活性に影響を及ぼさないようである。

【０３２２】

ここに、本発明を書面による記述および実施例によって説明したが、当業者には、本発明がさまざまな実施形態において実施され得ること、および上記の記載および実施例は、例示の目的のためであって、以下の特許請求の範囲の限定のためでないことが認識されよう。

【図面の簡単な説明】

【０３２３】

【図１】図１は、補体系の古典経路および第二経路を示す図解である。

【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選択（ＳＥＬＥＸ^{TM}）プロセスの概略図である。

【図３Ａ】図３Ａは、抗Ｃ５アプタマー（配列番号：１）のヌクレオチド配列および二次構造を示す図解であり、図において、下線の残基は、２’－Ｈピリミジン残基または２’－フルオロピリミジン残基のいずれかであり、四角で囲まれた残基は、Ｔ－フルオロピリミジン残基または２’－ＯＭｅピリミジン残基のいずれかであり、矢印（→）で示された

残基は、２’－フルオロ修飾を含むはずである残基を表す。
【図３Ｂ】図３Ｂは、ＡＲＣ３３０抗Ｃ５アプタマー（配列番号：２）のヌクレオチド配列および二次構造を示す図解であり、図において、丸で囲まれた残基は２’－Ｈ残基であり、ピリミジン残基は２’－フルオロ置換されたものであり、プリン残基の大部分は、白抜きで示した３つの２’－ＯＨプリン残基を除いて２’－ＯＭｅ置換されている。
【図３Ｃ】図３Ｃは、ＡＲＣ１８６抗Ｃ５アプタマー（配列番号：４）のヌクレオチド配列および二次構造を示す図解であり、図において、すべての２１個のピリミジン残基は、２’－フルオロ修飾を有し、プリン（１４残基）の大部分は、白抜きで示した３つの２’－ＯＨプリン残基を除いて２’－ＯＭｅ修飾を有する。
【図４】図４は、４０ｋＤ分枝鎖ＰＥＧ（１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）の図解である。
【図５】図５は、アプタマーの５’末端に結合された４０ｋＤ分枝鎖ＰＥＧ（１，３－ビス（ｍＰＥＧ－［２０ｋＤａ］）－プロピル－２－（４’－ブタミド）の図解である。
【図６】図６は、高分子量ＰＥＧ－核酸結合体合成のための種々のストラテジーを示す図解である。
【図７－１】図７Ａは、ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマー（ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５））による溶血の用量依存的阻害を、非ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマー（ＡＲＣ１８６（配列番号：４））と比較するグラフである；図７Ｂは、図７Ａに示す溶血性アッセイに用いたアプタマーのＩＣ$_{50}$値の表である。
【図７－２】図７Ｃは、ＰＥＧ化抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ１８７（配列番号：５）、ＡＲＣ１５３７（配列番号：６５）、ＡＲＣ１７３０（配列番号：（６６）およびＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）による溶血の用量依存的阻害を比較するグラフである；図７Ｄは、図７Ｃに示す溶血性アッセイに用いたアプタマーのＩＣ$_{50}$値の表である。
【図８】図８は、カニクイザル（ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ）血清の補体対ヒト血清の補体の、抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ６５８（配列番号：６２）による溶血の阻害割合のグラフである。
【図９】図９は、１５分間のインキュベーション後、３７℃および室温（２３℃）の両方での精製Ｃ５タンパク質に対するＡＲＣ１８６（配列番号：４）の結合を示すグラフである。
【図１０】図１０は、４時間のインキュベーション後、３７℃および室温（２３℃）の両方での精製Ｃ５タンパク質に対するＡＲＣ１８６（配列番号：４）の結合を示す別のグラフである。
【図１１】図１１は、２３℃におけるＣ５・ＡＲＣ１８６複合体の解離の経時変化を示すグラフである。
【図１２】図１２は、２３℃でのＣ５・ＡＲＣ１８６複合体の形成における平衡化の経時変化を示すグラフである。
【図１３】図１３は、Ｃ５タンパク質に結合するＡＲＣ１８６（配列番号：４）対補体カスケードの上流および下流タンパク質成分を示すグラフである。
【図１４】図１４は、非標識競合体ＡＲＣ１８６（配列番号：４）、ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の存在下で、Ｃ５に結合した放射能標識ＡＲＣ１８６（配列番号：４）のパーセントを示すグラフである。
【図１５】図１５は、種々の濃度のＡＲＣ１８６（配列番号：４）アプタマーの存在下、２５℃および３７℃で５時間インキュベートされた血液試料中に生成されたＣ５ｂ補体タンパク質の量を示すグラフである。
【図１６】図１６は、非希釈ヒト血清、クエン酸塩加ヒト全血またはカニクイザル血清中、ザイモサンの存在下でのＡＲＣ１８７（配列番号：５）による補体阻害割合を示すグラフである。
【図１７】図１７は、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）が、実施例１Ｄに記載のチュービ

ングループ（ｔｕｂｉｎｇ　ｌｏｏｐ）モデルにおいて、補体活性化（Ｃ５ａ）を充分阻害することを示すグラフである。

【図１８】図１８は、Ｃ５選択プールの第１０回目の解離定数を示すグラフである。解離定数（K_d）は、データを等式：結合したＲＮＡの割合＝大きさ＊K_d／（K_d＋［Ｃ５］）にフィットさせることにより推定した。「ＡＲＣ５２０」（配列番号：７０）は、天然状態の非選択ｄＲｍＹプールを示し、「＋」は、競合体（０．１ｍｇ／ｍｌ　ｔＲＮＡ、０．１ｍｇ／ｍｌサケ精子ＤＮＡ）の存在を示す。

【図１９】図１９は、Ｃ５クローンの解離定数曲線を示すグラフである。解離定数（K_dＳ）は、データを等式：結合したＲＮＡの割合＝大きさ＊K_d／（K_d＋［Ｃ５］）にフィットさせることにより推定した。

【図２０】図２０は、ＡＲＣ１８６（配列番号：４）と比較したときの、種々の濃度の抗Ｃ５アプタマークローンＡＲＣ９１３（配列番号：７５）溶血活性に対する阻害効果を示すIC_{50}曲線を示すグラフである。

【図２１】図２１は、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の構造を示す図解である。

【図２２】図２２は、ＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）構造を示す図解である。

【図２３】図２３は、第１の単離された灌流心臓試験の実験計画の概要を示す表である。

【図２４】図２４は、ヒト血漿に曝露した単離された心臓の左心室（ＬＶ）心室内圧の圧力追跡（Ａ）を、対照アプタマー溶液に曝露した単離された心臓のＬＶＰ圧力追跡（Ｂ）と比較するグラフである。

【図２５】図２５は、アプタマー／Ｃ５溶液（ここで、およそ５００ｎＭの濃度を、正常非希釈ヒト血漿中でのＣ５について測定した）のモル等量１０×および５０×に曝露した単離された心臓の左心室（ＬＶ）内の心室内圧の圧力追跡を比較するグラフである。

【図２６】図２６は、ヒト血漿および種々の血漿／アプタマー溶液に曝露した後の、単離されたマウス心臓の心拍数の変化（１分あたりの鼓動（ｂｐｍ））を比較するグラフである。

【図２７】図２７は、０～１×モル比のＡＲＣ１８６（配列番号：４）（不全心臓）、または１０～５０×モル比（Ｃ５アプタマーで保護された心臓）を含有するヒト血漿への曝露の前後での単離されたマウス心臓の心臓重量の変化を比較するグラフである。

【図２８】図２８は、単離されたマウス心臓の灌流後での、種々のアプタマー濃度を含むヒト血漿中の相対Ｃ５ａ生成を比較するグラフである。相対Ｃ５ａ濃度は、吸光度単位（Ａｂ）としてプロットしており、ここで、読み値が高いほど、より高いＣ５ａレベルの存在を反映する。

【図２９】図２９は、単離されたマウス心臓の灌流後での、種々のアプタマー濃度を含むヒト血漿中の相対可溶性Ｃ５ｂ－９の生成を比較するグラフである。

【図３０】図３０は、マウス心臓排出液中でのＣ３切断に対するＡＲＣ１８６（配列番号：４）の効果を示すグラフである。

【図３１】図３１は、単離された灌流マウス心臓試験での免疫組織化学染色の結果を示す表である。

【図３２】図３２は、ヒトまたは霊長類の血清中において、心臓をＣ５ｂ媒介性損傷から保護するために必要なＡＲＣ６５８（配列番号：６２）のモル比を示す表である。

【図３３】図３３は、ラットおよびカニクイザル（ｃｙｎｏｍｏｌｇｕｓ　ｍａｃａｑｕｅ）両方の血漿中における、インキュベーション時間の関数としての、完全長ＡＲＣ１８６の残留割合の対数線形プロットを示すグラフである。

【図３４】図３４は、実施例５に記載のようにして、Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットで行なった薬物動態試験の実験計画を示す表である。

【図３５】図３５は、Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットにおける、時間に対するＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の平均血漿濃度を示す表である。

【図３６】図３６は、ラットにおいてアプタマーの静脈内投与後の、経時な、ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号

：５）の平均血漿濃度を示すグラフである。
【図３７】図３７は、図３５および３６に示す濃度対時間データのノンコンパートメント解析を示す表である。
【図３８】図３８Ａは、マウスにおけるＡＲＣ１８７（配列番号：５）およびＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）の薬物動態試験の計画を示す表である；図３８Ｂは、単回ＩＶボーラス投与後の、ＣＤ－１マウスにおけるＡＲＣ１８７（配列番号：５）およびＡＲＣ１９０５（配列番号：６７）の薬物動態プロフィールを示すグラフである；図３８Ｃは、図３８Ｂに示す濃度対時間データのノンコンパートメント解析を示す表である。
【図３９】図３９は、静脈内投与後、マウス心臓組織内での列挙したアプタマーの検出を示す表である。
【図４０】図４０は、実施例５Ｅに記載した動物試験１の実験計画を示す表である。
【図４１】図４１は、カニクイザルに対するアプタマーの静脈内ボーラス投与後での、アプタマー血漿濃度対時間を示す表である。
【図４２】図４２は、試験１において、カニクイザルに静脈内投与されたＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）およびＡＲＣ１８７（配列番号：５）の薬物動態パラメータを示す表である。
【図４３－１】図４３（ａ）および４３（ｃ）は、マカク属サルへの抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の静脈内投与後の、経時的なｓＣ５ｂ－９およびＣ５ａの血漿濃度を示すグラフである；図４３（ｂ）および４３（ｄ）は、ｓＣ５ｂ－９およびＣ５ａの血漿濃度対抗Ｃ５アプタマー、ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の濃度を示すグラフである。
【図４３－２】図４３（ａ）および４３（ｃ）は、マカク属サルへの抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の静脈内投与後の、経時的なｓＣ５ｂ－９およびＣ５ａの血漿濃度を示すグラフである；図４３（ｂ）および４３（ｄ）は、ｓＣ５ｂ－９およびＣ５ａの血漿濃度対抗Ｃ５アプタマー、ＡＲＣ６５７（配列番号：６１）、ＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の濃度を示すグラフである。
【図４４】図４４は、実施例５Ｆに記載する試験２の実験計画を示す表である。
【図４５】図４５は、カニクイザルへのＡＲＣ６５８（配列番号：６２）またはＡＲＣ１８７（配列番号：５）の静脈内投与後、種々の時点での平均アプタマー血漿濃度を示すグラフである。
【図４６】図４６は、カニクイザルへの静脈内ボーラスアプタマー投与後での、濃度対時間データの２コンパートメント解析を示す表である。
【図４７】図４７は、カニクイザル血漿中のザイモサンの存在下での、Ｃ５ｂ－９濃度対ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ６５８（配列番号：６２）濃度を示すグラフである。
【図４８】図４８は、カニクイザル血漿中のザイモサンの存在下での、Ｃ５ａ濃度対ＡＲＣ１８７（配列番号：５）またはＡＲＣ６５８（配列番号：６２）濃度を示すグラフである。
【図４９】図４９は、カニクイザルへのＩＶボーラス＋注入投与中およびその後でのＡＲＣ１８７（配列番号：５）のＰＫ－ＰＤ試験をまとめた表である。
【図５０】図５０は、ＩＶボーラス投与後のカニクイザルにおけるＡＲＣ１８７（配列番号：５）の薬物動態パラメータをまとめた表である。
【図５１】図５１は、カニクイザルへのＩＶボーラス＋注入投与中およびその後での、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）の計算値および実際の測定値の薬物動態プロフィールを示すグラフである。
【図５２】図５２は、活性なＡＲＣ１８７（配列番号：５）血漿レベルが、カニクイザルへのＩＶボーラス＋注入投与中およびその後で一定に維持されることを示すグラフである。

【図５３】図５３は、ＣＡＢＧ術における抗Ｃ５アプタマーに対して予測されるヒト投与での必要量を示す表である。
【図５４】図５４は、プロトロンビン時間（ＰＴ）および活性化部分トロンボプラスチン時間（ＡＰＴＴ）によって測定したとき、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）が、凝固に対して相対的にインビトロ効果を有しないことを示すグラフである。
【図５５】図５５は、ヘパリンの抗凝固活性およびプロタミンの凝固促進活性に対するＡＲＣ１８７（配列番号：５）のインビトロ効果をまとめた表である。
【図５６】図５６は、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）が、インビボでヘパリンの抗凝固の逆転に影響を及ぼさないことを示すグラフである。
【図５７】図５７は、ザイモサンの補体活性化の阻害によって測定したとき、ヘパリンおよびプロタミンの両方が、ＡＲＣ１８７（配列番号：５）抗補体機能に対する効果を有しないことを示すグラフである。
【図５８】図５８は、抗Ｃ５アプタマーＡＲＣ１９０５（配列番号６７）またはＡＲＣ６７２（配列番号６３）の濃度の関数としての、ヒト血清の存在下でのヒツジ赤血球の溶血の阻害割合を示すグラフである。
【図５９】図５９Ａは、ヒト、カニクイザルおよびラット血清の存在下での、ＡＲＣ１９０５（配列番号６７）による溶血の阻害割合を示すグラフである；図５９Ｂは、ヒト、カニクイザルおよびラット血清中での、ＡＲＣ１９０５、抗Ｃ５アプタマーまたはＡＲＣ１２７、Ｃ５に結合しない無関連アプタマー（陰性対照）による補体活性化の阻害の平均ＩＣ$_{50}$値をまとめた表である。
【図６０】図６０は、競合結合アッセイにおける、非標識競合体ＡＲＣ１９０５（配列番号６７）またはＡＲＣ６７２（配列番号６３）の濃度（水平軸）の関数としての、放射能標識ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の阻害のＩＣ$_{50}$値（垂直軸）を示すグラフである。
【図６１】図６１は、競合結合アッセイにおける３７℃および２５℃での、非標識競合体ＡＲＣ１９０５（配列番号６７）の濃度（水平軸）の関数としての、放射能標識ＡＲＣ１８６（配列番号：４）の阻害のＩＣ$_{50}$値（垂直軸）を示すグラフである。
【図６２】図６２は、ヒトＣ５ａ（ｈＣ５ａ）およびカニクイザルＣ５ａ（ｈＣ５ａ当量）の標準曲線を示すグラフである。
【図６３】図６３は、ザイモサン誘導型補体活性化アッセイにおいて測定したときの、ヒトおよびカニクイザル血清中での、ＡＲＣ１９０５（配列番号６７）によるＣ５活性化の阻害のＩＣ$_{50}$、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値をまとめた表である。
【図６４】図６４は、ザイモサン誘導型補体活性化アッセイにおいて測定したときの、ヒトおよびカニクイザル血清中での、ＡＲＣ１９０５（配列番号６７）濃度の関数としてのＣ５ａ生成の阻害割合を示すグラフである。
【図６５】図６５は、ザイモサン誘導型補体活性化アッセイにおいて測定したときの、ヒトまたはカニクイザル血清中でのＣ３ａ生成に対するＡＲＣ１９０５（配列番号６７）効果を示すグラフである。
【図６６】図６６は、補体活性化のチュービングループモデルにおいて測定したときの、５例のドナー由来のヒト血清中でのＡＲＣ１９０５補体活性化の阻害（配列番号６７）の平均ＩＣ$_{50}$、ＩＣ$_{90}$およびＩＣ$_{99}$値をまとめた表である。
【図６７】図６７は、補体活性化のチュービングループモデルにおける、ＡＲＣ１９０５、抗Ｃ５アプタマー、またはＡＲＣ１２７、Ｃ５に結合しない無関連アプタマー（陰性対照）の濃度の関数としての、Ｃ５ａおよびＣ３ａの生成の阻害割合を示すグラフである。

【図１】

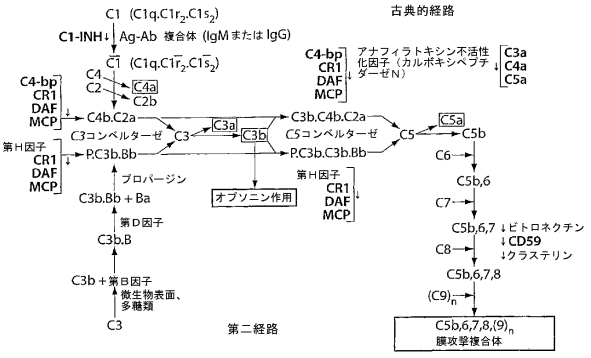


Fig. 1

【図２】

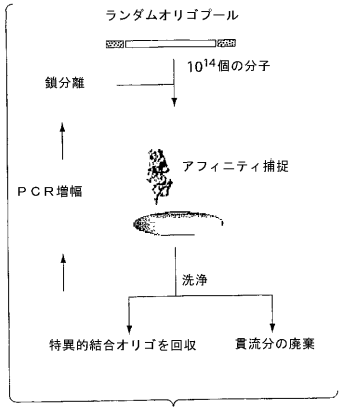


Fig. 2

【図３Ａ】

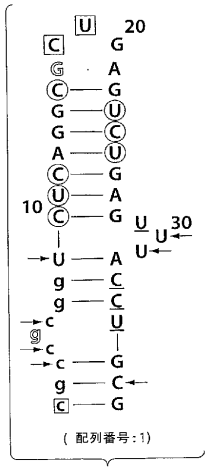


Fig. 3A

【図３Ｂ】

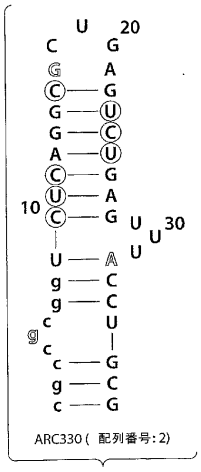


Fig. 3B

【図３Ｃ】

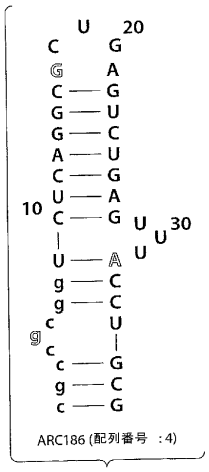


Fig. 3C

【図５】

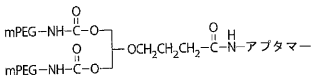


Fig. 5

【図６】

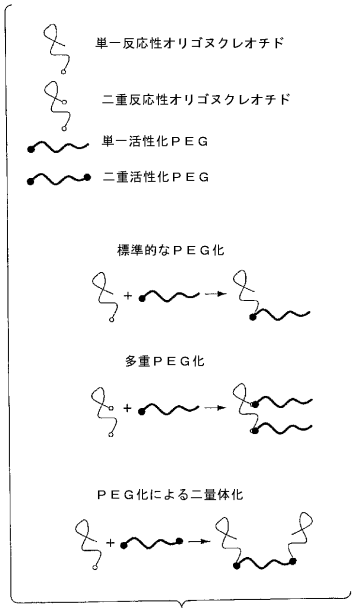


Fig. 6

【図４】

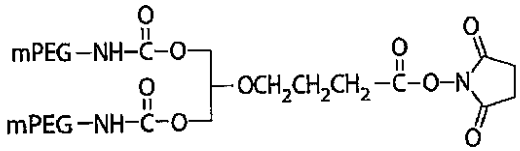


Fig. 4

【図７－１】

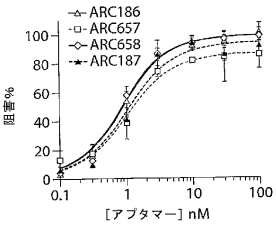


Fig. 7A

【図７－２】

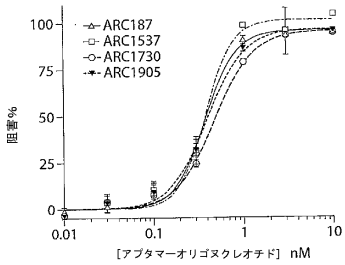


Fig. 7C

ＡＲＣ番号	PEG 修飾	IC50 (nM)
186	PEG なし	0.5±0.1
657	ARC186+20 kDa	0.6±0.1
658	ARC186+30 kDa	0.5±0.1
187	40 kDa 分枝鎖 1,3-ビス (mPEG-[20 kDa])-プロピル−2-(4'-ブタミド)	0.6±0.2

Fig. 7B

ARC番号	PEG 修飾	IC50 (nM)
187	40K 分枝鎖 1,3-ビス (mPEG-[20 kDa])-プロピル-2-(4'-ブタミド)	0.38±0.03
1537	40K DOW 線状	0.39±0.06
1730	2 x 20K 線状	0.48±0.04
1905	40K 分枝鎖 2,3-ビス (mPEG-[20 kDa])-プロピル-1-カルバモイル	0.40±0.03

Fig. 7D

【図８】

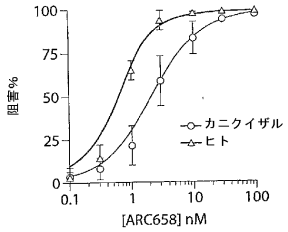


Fig. 8

【図９】

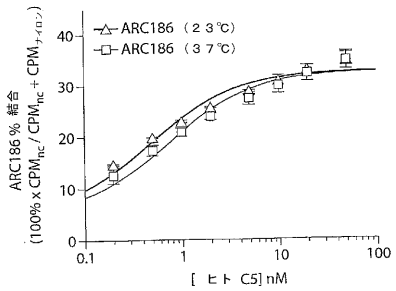


Fig. 9

【図１０】

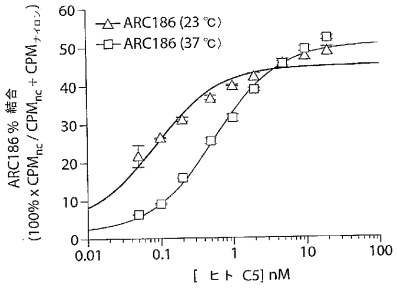


Fig. 10

【図１１】

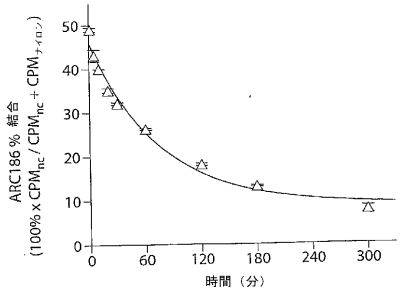


Fig. 11

【図１２】

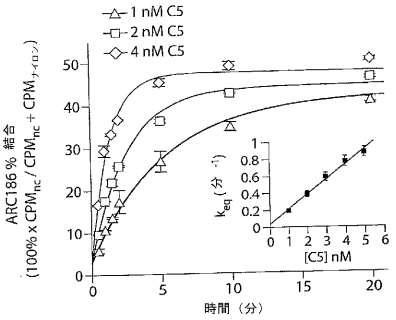


Fig. 12

【図１３】

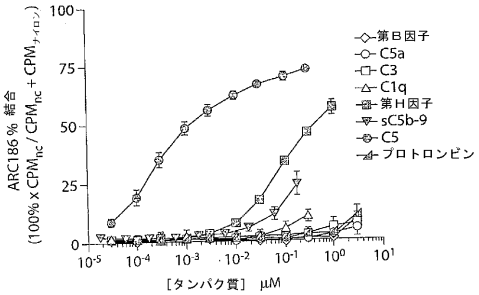


Fig. 13

【図１４】

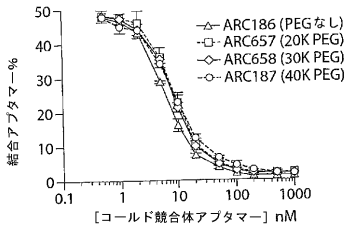


Fig. 14

【図１５】

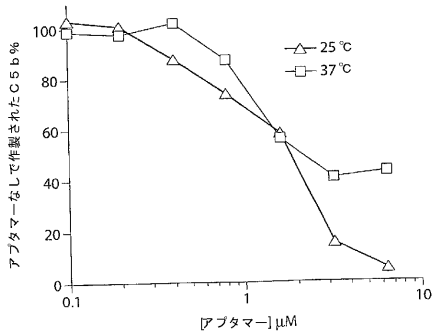


Fig. 15

【図１６】

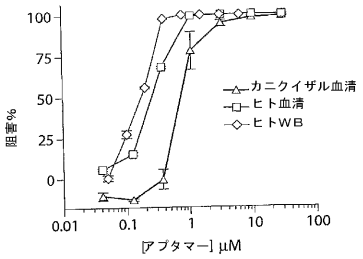


Fig. 16

【図１７】

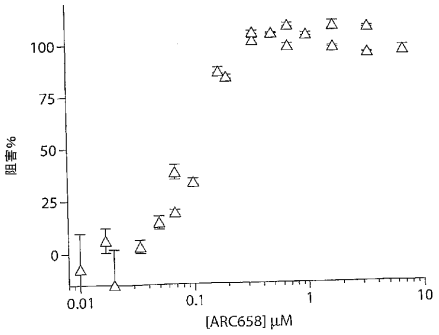


Fig. 17

【図１８】

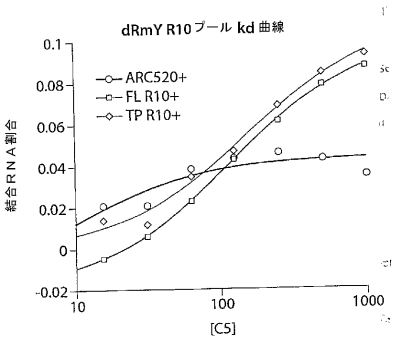


Fig. 18

【図１９】

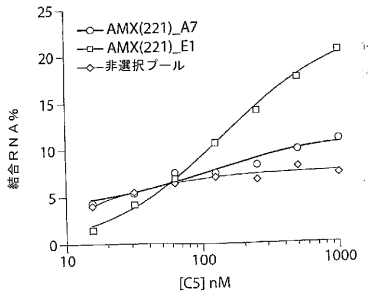


Fig. 19

【図２０】

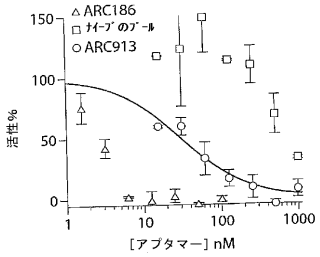


Fig. 20

【図２１】

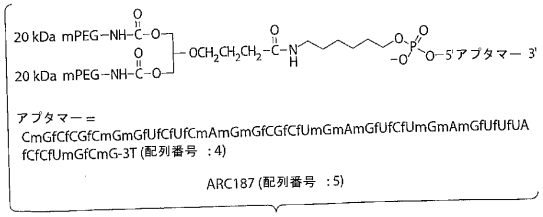


Fig. 21

【図２２】

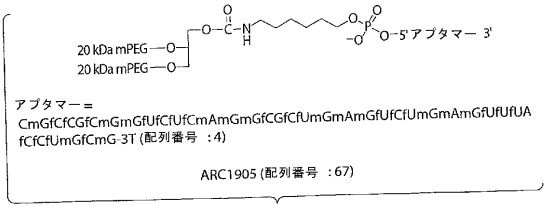


Fig. 22

【図２３】

群	マウス数	被験物質	用量		測定
			濃度 (nM)	灌流速度 mL/分	
1	5	アプタマーなし	0	3	心拍数、律動、左心室圧
3	3	５０×モル比での無関連アプタマー	1500	3	心拍数、律動、左心室圧
4	3	同等モルでのＡＲＣ１８６	30	3	心拍数、律動、左心室圧
5	5	１０×モル比でのＡＲＣ１８６	300	3	心拍数、律動、左心室圧
6	4	５０×モル比でのＡＲＣ１８６	1500	3	心拍数、律動、左心室圧

Fig. 23

【図２４】

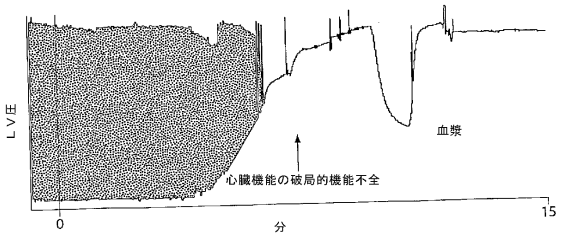


Fig. 24A

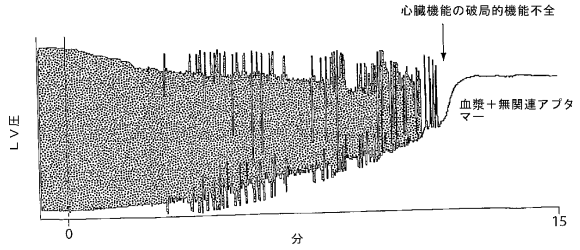


Fig. 24B

【図２５】

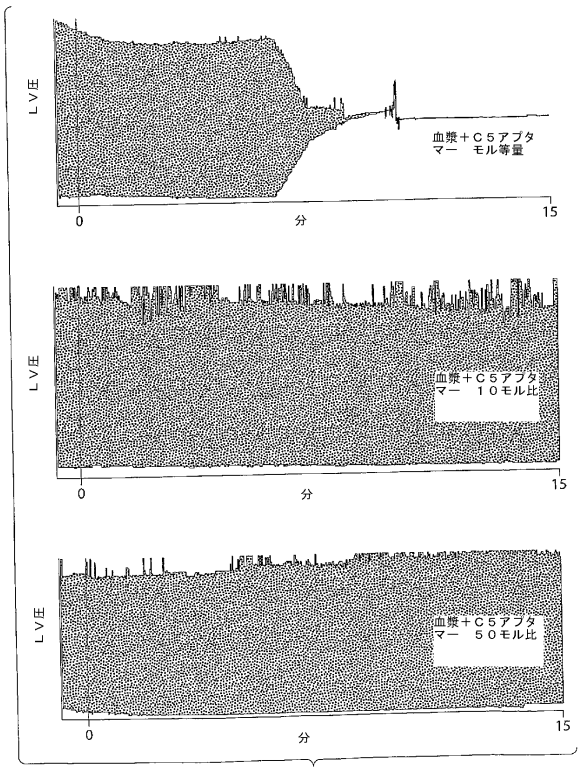


Fig. 25

【図２６】

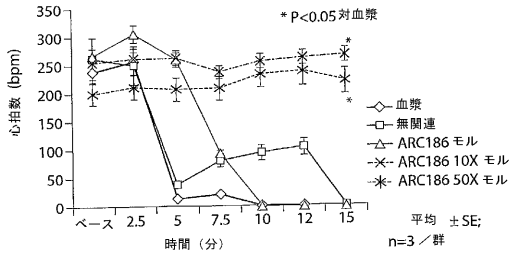


Fig. 26

【図２７】

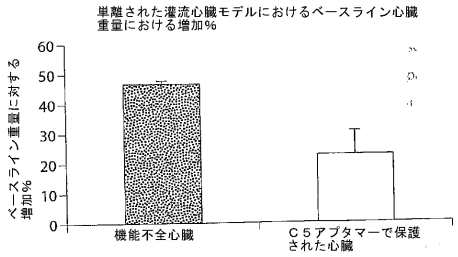


Fig. 27

【図２８】

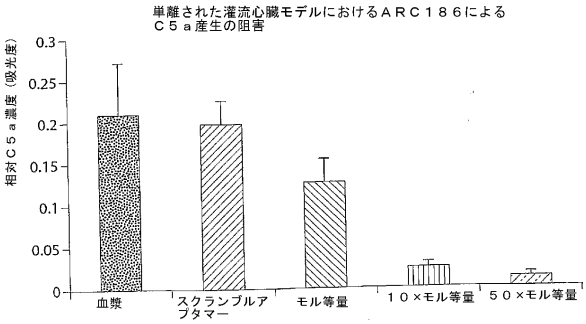


Fig. 28

【図２９】

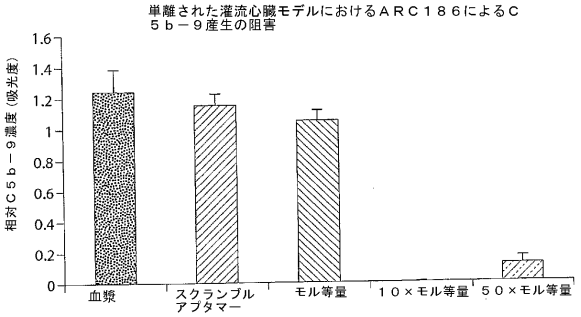


Fig. 29

【図３０】

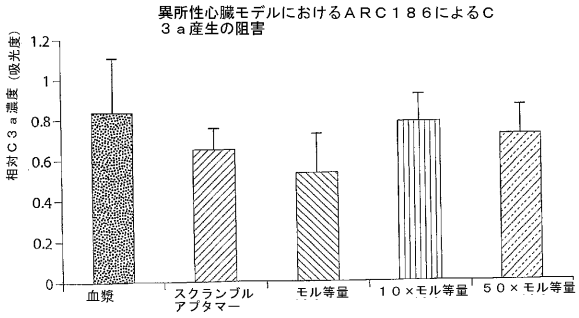


Fig. 30

【図３１】

動物	処置	無関連	C3b	C5b-9
1-001 (1/26)	なし	NEG	POS	POS
1-002 (1-26)	なし	NEG	POS	POS
1-001	なし	NEG	POS	POS
1-002	なし	NEG	POS	POS
1-003	なし	NEG	POS	POS
3-001	無関連アプタマー５０×モル	NEG	POS	POS
3-002	無関連アプタマー５０×モル	NEG	POS	POS
3-003	無関連アプタマー５０×モル	NEG	POS	POS
4-001	Ｃ５アプタマー モル等量	NEG	POS	POS
4-002	Ｃ５アプタマー モル等量	NEG	POS	POS
4-003	Ｃ５アプタマー モル等量	NEG	POS	POS
5-001	Ｃ５アプタマー１０× モル等量	NEG	POS	NEG
5-002	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
5-003	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
5-004	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
5-005	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
6-001	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
6-002	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
6-003	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG
6-004	Ｃ５アプタマー１０×モル等量	NEG	POS	NEG

Fig. 31

【図３２】

動物	化合物	血清	モル比	ＥＤＰ増加	機能不全(YまたはNo)	機能不全までの時間
1-001	ARC658	ヒト	0	Y	Y	4分 30秒
1-002	ARC658	ヒト	0	Y	Y	4分 38秒
1-003	ARC658	ヒト	0	Y	Y	3分 20秒
1-004	ARC658	ヒト	0	Y	Y	12分 24秒
1-005	ARC658	ヒト	0	Y	N	NA
1-006	ARC658	ヒト	0	Y	Y	8分 30秒
1a-001	ARC658	ヒト	0.5	Y	Y	7分 22秒
1a-002	ARC658	ヒト	0.5	Y	Y	7分 30秒
1a-003	ARC658	ヒト	0.5	Y	Y	8分 13秒
2-001	ARC658	ヒト	1	N	N	NA
2-002	ARC658	ヒト	1	N	N	NA
2-003	ARC658	ヒト	1	N	N	NA
2-004	ARC658	ヒト	1	N	N	NA
3-001	ARC658	ヒト	3	N	N	NA
3-002	ARC658	ヒト	3	N	N	NA
3-003	ARC658	ヒト	3	N	N	NA
6-001	ARC658	霊長類	0	Y	Y	2分 30秒
6-002	ARC658	霊長類	0	Y	Y	2分 47秒
6-003	ARC658	霊長類	0	Y	Y	3分 30秒
6-004	ARC658	霊長類	0	Y	Y	1分 28秒
6a-001	ARC658	霊長類	3	Y	Y	5分 2秒
6a-002	ARC658	霊長類	3	Y	Y	4分 30秒
6a-003	ARC658	霊長類	3	Y	Y	3分 43秒
6a-004	ARC658	霊長類	3	Y	Y	8分 0秒
7-001	ARC658	霊長類	10	Y	N	NA
7-002	ARC658	霊長類	10	Y	N	NA
7-003	ARC658	霊長類	10	Y	Y	9分 15秒
7-004	ARC658	霊長類	10	Y	N	NA
9-001	ARC658	霊長類	20	Y	Y	12分 50秒
11-001	ARC658	霊長類	30	Y	N	NA
11-002	ARC658	霊長類	30	Y	Y	10分 0秒
11-003	ARC658	霊長類	30	Y	N	NA
13-001	ARC658	霊長類	50	N	N	NA
13-002	ARC658	霊長類	50	N	N	NA
13-003	ARC658	霊長類	50	N	N	NA

Fig. 32

【図３３】

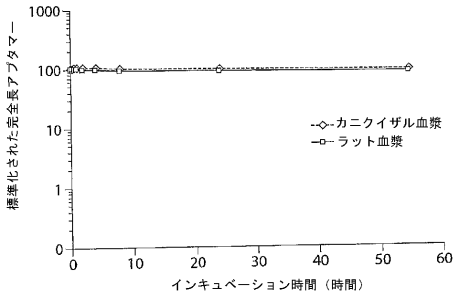


Fig. 33

【図３４】

群番号	動物数	被験物質	投与レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	投与 レジメン	試料回収
1	3	ARC657 20 kDa PEG	10	1	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48時間
2	3	ARC658 30 kDa PEG	10	1	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48時間
3	3	ARC187 40 kDa PEG	10	1	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48時間

Fig. 34

【図３５】

SPRAGUE-DAWLEY ラットにおける抗Ｃ５アプタマー／ＰＥＧコンジュゲートのｐＫ						
アプタマー	ARC657		ARC658		ARC187	
ＰＥＧ基	20 kDa		30 kDa		40 kDa	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
時間（時間）	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	12.77	2.67	2.97	0.62	6.52	1.77
1	13.38	2.08	4.09	1.44	7.94	1.08
2	6.63	1.87	3.40	0.66	6.57	1.56
4	2.38	0.87	2.22	0.39	4.56	0.54
8	0.72	0.18	2.87	1.84	1.53	0.57
12	0.31	0.03	0.60	0.09	1.45	0.17
24	<LLOQ	<LLOQ	0.47	0.17	0.73	0.03
32	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0.49	0.01
48	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	0.27	0.02

Fig. 35

【図３６】

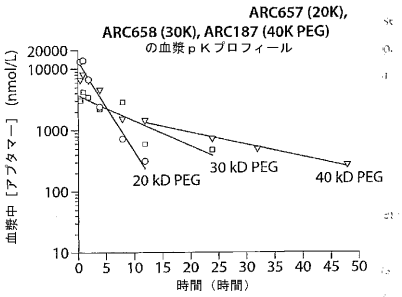


Fig. 36

【図３７】

種	用量 (mg/kg)	投与経路	ＰＥＧ基	C_{max} (μg/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μg_時間/mL)	$t_{1/2}$ (α) (時間)	$t_{1/2}$ (β) (時間)	Cl (mL/分 _kg)	V_{ss} (mL/kg)
ラット	10	IV	20 kD	169.97	458	-	2.05	0.36	65
ラット	10	IV	30 kD	52.00	497	-	7.40	0.34	220
ラット	10	IV	40 kD	100.85	886	-	15.00	0.19	188

Fig. 37

【図３８】

群番号	動物番号	被験物質	用量		投与経路	試料回収
			(mg/kg)	(mL/kg)		
1	33F	ARC187	10	4	IV	t=投与前 ,0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 時間
2	33F	ARC1905	10	4	IV	t=投与前 ,0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72 時間

Fig. 38A

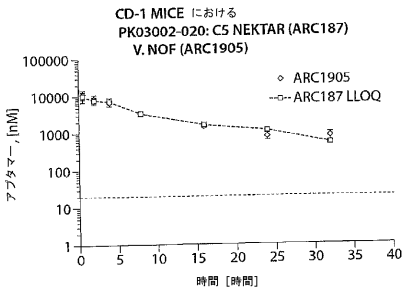


Fig. 38B

ノンコンパートメントｐＫ解析		(NCA)	
属性	単位	ARC1905	ARC187
$C_{最大}$	μM	12	10
$AUC_{0-\infty}$	μM·時間	88	89
$MRT_{0-\infty}$	時間	11	11
CL	mL/分 .kg	0.15	0.15
Vss	mL/kg	95	96
K10	1/時間	0.151	0.121
t1/2 (K10)	時間	5	6

Fig. 38C

【図３９】

アプタマー	前	1時間	3時間	6時間
ARC657	なし	あり	あり	あり
ARC658	なし	あり	あり	あり
ARC187	なし	あり	あり	あり

Fig. 39

【図４０】

群番号	動物数	被験物質	投与レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	投与レジメン	試料回収
1	1	ARC657 20 kDa PEG	30	3	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 1, 5, 10, 15, および30分ならびに 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, および 192 時間
2	1	ARC658 30 kDa PEG	30	3	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 1, 5, 10, 15, および30分ならびに 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, および 192 時間
3	1	ARC187 40 kDa PEG	30	3	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前 , 1, 5, 10, 15, および30分ならびに 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, および192時間

Fig. 40

【図４１】

カニクイザルにおける抗Ｃ５アプタマー／ＰＥＧコンジュゲートのｐＫ			
アプタマー	ARC657	ARC658	ARC187
ＰＥＧ基	20 kDa	30 kDa	40 kDa
	平均	平均	平均
時間（時間）	Cp (μM)	Cp (μM)	Cp (μM)
0	0.00	0.00	0.00
0.08	16.41	21.99	18.00
0.25	16.64	22.67	17.26
0.5	19.38	26.16	24.17
1	19.36	27.08	21.79
4	7.73	14.16	21.69
8	2.03	6.02	16.68
12	1.10	3.04	13.11
24	0.36	0.95	7.24
48	0.15	0.42	2.30
72	0.07	0.25	0.96
96	0.03	0.23	0.54
192	0.01	0.04	0.14

Fig. 41

【図４２】

種	用量 (mg/kg)	投与経路	ＰＥＧ基	$C_{最大}$ (μg/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μg_時間/mL)	$t_{1/2}$ (α) (時間)	$t_{1/2}$ (β) (時間)	Cl (mL/ 分 _kg)	V_{ss} (mL/kg)
霊長類	30	IV	20 kD	293	1191	2.35	31.80	0.41	273
霊長類	30	IV	30 kD	385	2484	3.33	40.08	0.20	233
霊長類	30	IV	40 kD	316	6752	12.38	60.11	0.07	141

Fig. 42

【図４３－１】

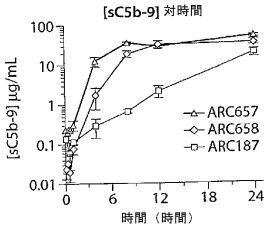


Fig. 43A

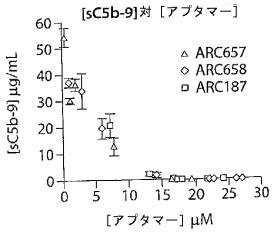


Fig. 43B

【図４３－２】

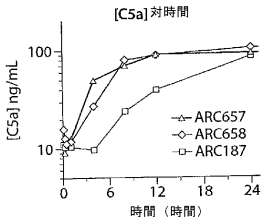


Fig. 43C

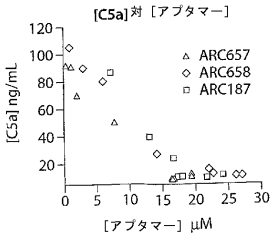


Fig. 43D

【図４４】

群番号	動物数	被験物質	投与レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	投与レジメン	試料回収
1	4	ARC658 30 kDa PEG	30	3	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前，5, 10, 15, および30分ならびに1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144 および192時間
2	4	ARC187 40 kDa PEG	30	3	静脈内ボーラス 第１日目	t=投与前，5, 10, 15, および30分ならびに1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 144 および192時間

Fig. 44

【図４５】

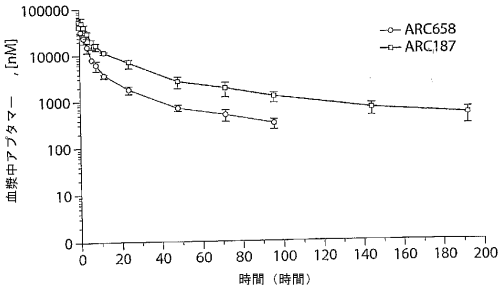


Fig. 45

【図４６】

種	用量 (mg/kg)	投与経路	ＰＥＧ基	$C_{最大}$ (μM)	$AUC_{0-\infty}$ (μg_時間/mL)	$t_{1/2}$ (α) (時間)	$t_{1/2}$ (β) (時間)	Cl (mL/ 分 _kg)	V_{ss} (mL/kg)
霊長類	30	IV	30 kD	519	3059	2.35	30.45	0.16	213
霊長類	30	IV	40 kD	609	8061	4.48	53.13	0.06	168

Fig. 46

【図４７】

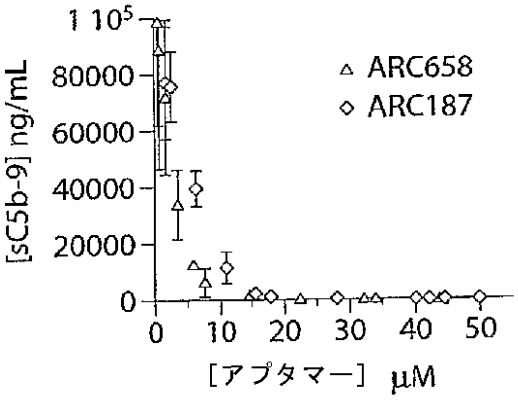


Fig. 47

【図４８】

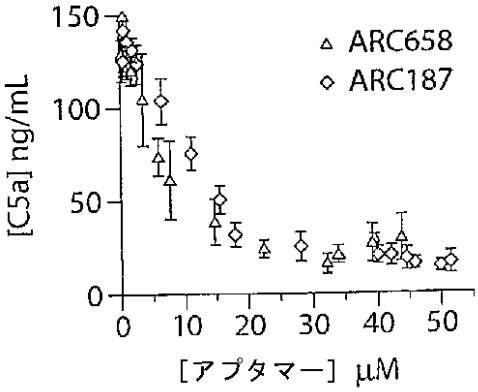


Fig. 48

【図４９】

群番号	動物数	被験物質	投与レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与量 (mL/kg)	投与レジメン	投与レジメン
1	3	ARC187	１ｍｇ／ｋｇ ＩＶボーラスおよび０．００１ ３ｍｇ／ｋｇ／分ＩＶ注入	10	１ｍｇ／ｋｇ ＩＶボーラスおよび０．１８７ ２ｍｇ／ｋｇ／分ＩＶ注入	ＩＶボーラスおよび４８時間注入 第１日目	第８日目

Fig. 49

【図５０】

種	用量 (mg/kg)	投与経路	ＰＥＧ基	$C_{最大}$ (μg/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (μg_時間/mL)	$t_{1/2}$ (α) (時間)	$t_{1/2}$ (β) (時間)	Cl (mL/ 分 _kg)	V_{ss} (mL/kg)
霊長類	30	IV	40 kD	610	8061	4.48	53.13	0.06	168

Fig. 50

【図５１】

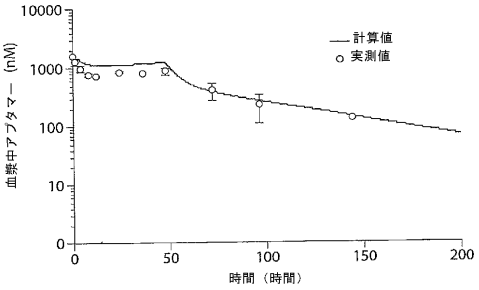


Fig. 51

【図５２】

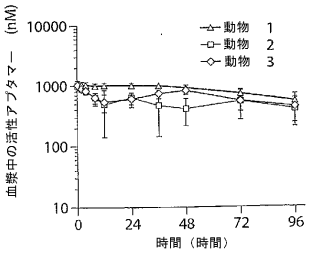


Fig. 52

【図５３】

アプタマー	ＰＥＧ基	分子量（オリゴ）	分子量（総）	$t_{1/2}$(α) (時間)	$t_{1/2}$(β) (時間)	１．５μＭの総（オリゴ）用量（ｇ）
ARC187	40 kDa	12,703	52,703	4.48	53.13	0.40

Fig. 53

【図５４】

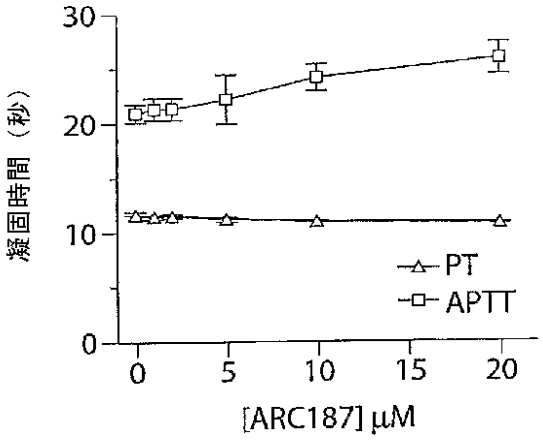


Fig. 54

【図５５】

処置	ACT（秒）		
	ドナー　1[a]	ドナー　2[b]	ドナー　3[b]
ベースライン	133±30	145±12	138±1
+ヘパリン	842±95	519±16	450±15
+ヘパリン＆ARC187	nd	618±55	492±28
+ヘパリン＆プロタミン	160±11	155±6	159±9
+ヘパリン，プロタミン＆ARC187	200±5	172±1	169±8

[a]5 U/mL ヘパリン; [b]4 U/mL ヘパリン; nd, 測定なし

Fig. 55

【図５６】

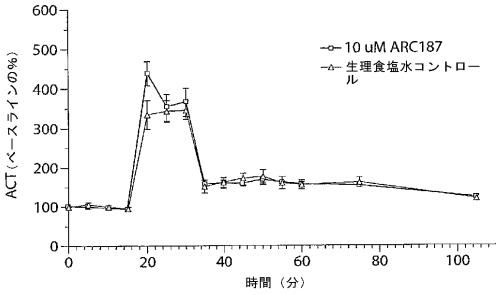


Fig. 56

【図５７】

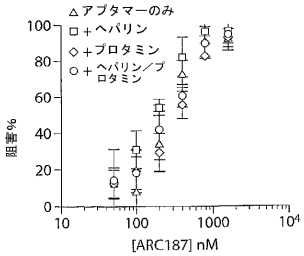


Fig. 57

【図５８】

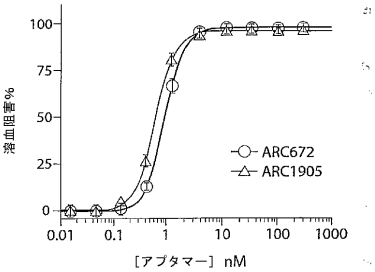


Fig. 58

【図５９】

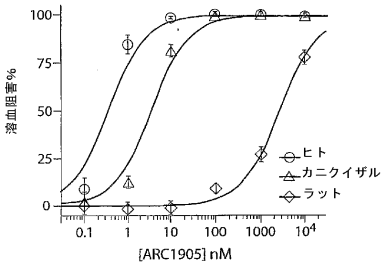


Fig. 59A

血清の種	ARC1905 IC_{50} (nM)	ARC127 IC_{50} (nM)
ヒト	0.349 ±0.0898	>10,000 NA
カニクイザル	3.69 ±0.603	>10,000 NA
ラット	2700 ±470	~10,000 NA

Fig. 59B

【図６０】

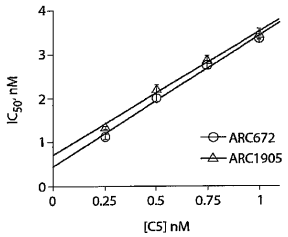


Fig. 60

【図６１】

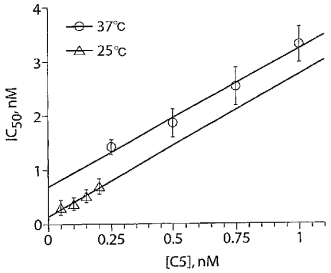


Fig. 61

【図６２】

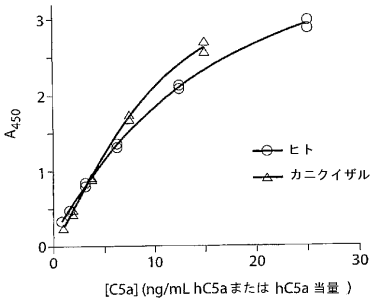


Fig. 62

【図６３】

アプタマー	IC_{50} (nM)	IC_{90} (nM)	IC_{99} (nM)
ヒト	196 ±13.9	442 ±23.2	1090 ±198.0
カニクイザル	536 ±54.7	1810 ±405.8	6900 ±2600
カニクイザル／ヒト比	2.73 ±0.339	4.1 ±0.94	6.4 ±2.65

Fig. 63

【図６４】

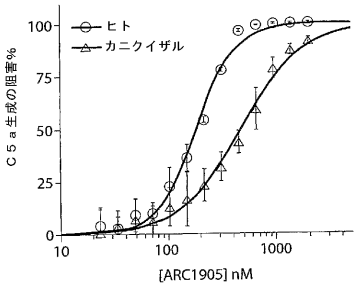


Fig. 64

【図６５】

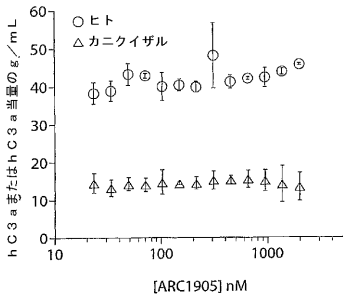


Fig. 65

【図６６】

ドナー	IC_{50} (nM)	IC_{90} (nM)	IC_{99} (nM)
５ドナーの平均	119	268	694
標準偏差	28.6	39.2	240.9

Fig. 66

【図６７】

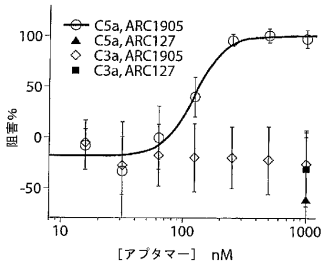


Fig. 67

【配列表】
0005253818000001.app
0005253818000002.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
Ａ６１Ｐ　9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｋ　49/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00	Ａ
Ｇ０１Ｎ　33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｍ

(72)発明者　ベネディクト，　クロード
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４０，　ケンブリッジ，　マサチューセッツ　アベニュー　２１３０，　アパートメント　５エー
(72)発明者　エプステイン，　デイビッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４７８，　ベルモント，　パイン　ストリート　５６
(72)発明者　ウィルソン，　チャールズ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１７４２，　コンコード，　レキシントン　ロード　２２９
(72)発明者　グレイト，　ディララ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４１，　ケンブリッジ，　ゴア　ストリート　１００
(72)発明者　クルツ，　ジェフリー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４７４，　アーリントン，　ブルックス　アベニュー　４８
(72)発明者　クルツ，　マーカス
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４６５，　ニュートン，　パイン　ストリート　４４
(72)発明者　マッコーリー，　トーマス　グリーン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４１，　ケンブリッジ，　ゴア　ストリート　１００
(72)発明者　ロットマン，　ジェームス
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０１７７６，　サドベリー，　ウィリス　ドライブ　６３

審査官　吉田　佳代子

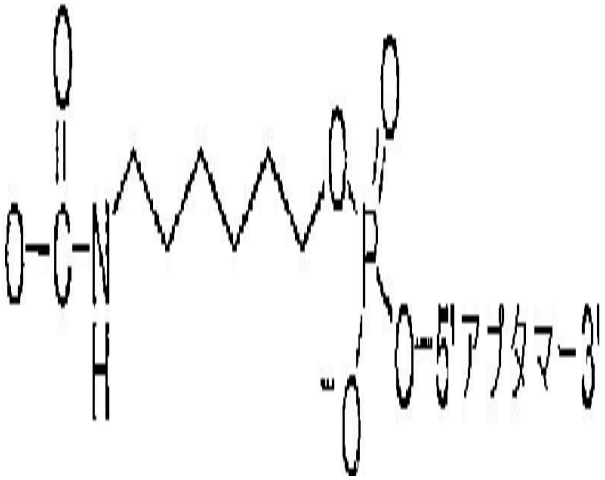
(56)参考文献　特表２００７－５２７７１４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０７９３６３（WO，Ａ１）
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY，１９９５年，vol.270 no.43，pp.25702-25708
Nucleosides and Nucleotides，１９９８年，vol.17 no.9-11，pp.1567-1570

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　　９／００－　９／７２
Ａ６１Ｋ　３１／００－３３／４４
Ｃ１２Ｎ　１５／００
ＣＡＰＬＵＳ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）

专利名称(译)	适体治疗剂可用于治疗补体相关疾病		
公开(公告)号	JP5253818B2	公开(公告)日	2013-07-31
申请号	JP2007555346	申请日	2006-02-14
[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		
当前申请(专利权)人(译)	阿克搭配LLC		
[标]发明人	ベネディクトクロード エプステインデイビッド ウィルソンチャールズ グレイトディララ クルツジェフリー クルツマーカス マッコーリートーマスグリーン ロットマンジェームス		
发明人	ベネディクト, クロード エプステイン, デイビッド ウィルソン, チャールズ グレイト, ディララ クルツ, ジェフリー クルツ, マーカス マッコーリー, トーマス グリーン ロットマン, ジェームス		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/115 A61K48/00 A61K31/7125 A61K47/48 A61P9/10 A61P29/00 A61P37/06 A61K49/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/60 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/317 C12N2310/321 C12N2310/322 C12N2310/351 C12N2310/3521 A61K47/50 A61K48/00 C12N2310/344 C12N2310/3533		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.H A61K48/00 A61K31/7125 A61K47/48 A61P9/10 A61P29/00 A61P37/06 A61K49/00.A G01N33/53.M		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	11/058134 2005-02-14 US		
其他公开文献	JP2008530133A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了使用这种核酸治疗剂治疗核酸治疗剂和补体相关病症的方法。在一个实施方案中，提供了包含与PEG部分缀合的根据ARC 186（SEQ ID NO：4）的核苷酸序列的适体。在某些实施方案中，ARC 186适体/ PEG缀合物包含根据SEQ ID NO：4的序列，用于C5补体蛋白，但含有与缺乏PEG部分的适体基本相同的结合亲和力。


O
O
O-C-N
H
O
P
O
O-5'アプタマー-3'