

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-506174

(P2015-506174A)

(43) 公表日 平成27年3月2日(2015.3.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A H	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 2 4
C O 7 K 14/575 (2006.01)	C O 7 K 14/575	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B O 6 3
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 93 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-551569 (P2014-551569)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月10日 (2013.1.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月10日 (2014.9.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/000055
 (87) 国際公開番号 W02013/104539
 (87) 国際公開日 平成25年7月18日 (2013.7.18)
 (31) 優先権主張番号 12000105.2
 (32) 優先日 平成24年1月10日 (2012.1.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/000089
 (32) 優先日 平成24年1月10日 (2012.1.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 509019004
 ノクソン・ファルマ・アクチエンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国, 10589 ベルリン
 , マックス-ドルン-シュトラッセ 8-10
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (74) 代理人 100114591
 弁理士 河村 英文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CGRP に特異的に結合する核酸

(57) 【要約】

本発明は、CGRP に結合することができる核酸分子に関し、核酸分子はヌクレオチドの中心ストレッチを含み、ヌクレオチドの中心ストレッチは 5' HWn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Yn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂Rn₁₃ADn₁₄n₁₅ARn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁ 3' [配列番号 99] のヌクレオチド配列を含み、式中、H、W、Y、G、A、U、M、B、K、R、D、C はリボヌクレオチドであり、n₁ は R または dG であり、n₂ は U または dT であり、n₃ は K または dG であり、n₄ は C または dC であり、n₅ は M または dC であり、n₆ は B または dU であり、n₇ は N または dG であり、n₈ は Y または dT であり、n₉ は N または dC であり、n₁₀ は R または dG であり、n₁₁ は V または dA であり、n₁₂ は K または dT または dU であり、n₁₃ は G または dG であり、n₁₄ は A または dA であり、n₁₅ は U または dT であり、n₁₆ は R または dG であり、n₁₇ は Y または dC であり、n₁₈ は C または dC であり、n₁₉ は B または dC であり、n₂₀ は C または dC であり、n₂₁ は C または dC であり、dG、dT、dC、dA および dU は 2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

CGRPに結合する能力を有する核酸分子であって、前記核酸分子がヌクレオチドの中心ストレッチを含み、前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

5' HWn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Yn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂
Rn₁₃ADn₁₄n₁₅ARn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁ 3' [配
列番号99]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、H、W、Y、G、A、U、M、B、K、R、D、Cはリボヌクレオチドであり、
n₁はRまたはdGであり、n₂はUまたはdTであり、n₃はKまたはdGであり、n₄はCまたはdCであり、n₅はMまたはdCであり、n₆はBまたはdUであり、n₇はNまたはdGであり、n₈はYまたはdTであり、n₉はNまたはdCであり、n₁₀はRまたはdGであり、n₁₁はVまたはdAであり、n₁₂はKまたはdTまたはdUであり、n₁₃はGまたはdGであり、n₁₄はAまたはdAであり、n₁₅はUまたはdTであり、n₁₆はRまたはdGであり、n₁₇はYまたはdCであり、n₁₈はCまたはdCであり、n₁₉はBまたはdCであり、n₂₀はCまたはdCであり、n₂₁はCまたはdCであり、

dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである、核酸分子

【請求項2】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

5' CUn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Bn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂
An₁₃ADn₁₄n₁₅AGn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁ 3' [配
列番号100]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、Y、G、A、M、B、Y、H、K、D、RおよびVはリボヌクレオチドであり、

n₁はGまたはdGであり、n₂はUまたはdTであり、n₃はGまたはdGであり、n₄はCまたはdCであり、n₅はMまたはdCであり、n₆はBまたはdUであり、n₇はDまたはdGであり、n₈はYまたはdTであり、n₉はHまたはdCであり、n₁₀はRまたはdGであり、n₁₁はVまたはdAであり、n₁₂はKまたはdTまたはdUであり、n₁₃はGまたはdGであり、n₁₄はAまたはdAであり、n₁₅はUまたはdTであり、n₁₆はGまたはdGであり、n₁₇はYまたはdCであり、n₁₈はCまたはdCであり、n₁₉はCまたはdCであり、n₂₀はCまたはdCであり、n₂₁はCまたはdCであり、

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

【請求項3】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

5' CUn₁n₂CGGAn₃An₄UAn₅n₆Cn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Gn₁₂
An₁₃AAAn₁₄n₁₅AGn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁ 3' [配
列番号101]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、Y、G、A、HおよびRはリボヌクレオチドであり、

n₁はGまたはdGであり、n₂はUまたはdTであり、n₃はGまたはdGであり、n₄はCまたはdCであり、n₅はCまたはdCであり、n₆はUまたはdUであり、n₇はRまたはdGであり、n₈はYまたはdTであり、n₉はHまたはdCであり、n₁₀はGまたはdGであり、n₁₁はRまたはdAであり、n₁₂はUまたはdTまたはdUであり、n₁₃はGまたはdGであり、n₁₄はAまたはdAであり、n₁₅はUまたはdTであり、n₁₆はGまたはdGであり、n₁₇はCまたはdCであり、n₁₈はCま

10

20

30

40

50

たは d C であり、 n_{19} は C または d C であり、 n_{20} は C または d C であり、 n_{21} は C または d C であり、

d G、d T、d C、d A および d U は 2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

5' C U n_1 n_2 C G G A n_3 A n_4 U A n_5 n_6 C n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} G n_{12}
A n_{13} A A n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配
列番号 102]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、G、A はリボヌクレオチドであり、

n_1 は G または d G であり、 n_2 は U または d T であり、 n_3 は G または d G であり、 n_4 は C または d C であり、 n_5 は C または d C であり、 n_6 は U または d U であり、 n_7 は G または d G であり、 n_8 は U または d T であり、 n_9 は C または d C であり、 n_{10} は G または d G であり、 n_{11} は A または d A であり、 n_{12} は U または d T または d U であり、 n_{13} は G または d G であり、 n_{14} は A または d A であり、 n_{15} は U または d T であり、 n_{16} は G または d G であり、 n_{17} は C または d C であり、 n_{18} は C または d C であり、 n_{19} は C または d C であり、 n_{20} は C または d C であり、 n_{21} は C または d C であり、

d G、d T、d C、d A および d U は 2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

10

20

【化 1 A】

- (1) 5' CUdGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号103]、
- (2) 5' CUGdTCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号104]、
- (3) 5' CUGUCGGdGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号105]、
- (4) 5' CUGUCGGAGdCUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号106]、
- (5) 5' CUGUCGGAGACUdCUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号107]、
- (6) 5' CUGUCGGAGACUACUCdGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号108]、
- (7) 5' CUGUCGGAGACUACUCGdTCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号109]、
- (8) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUdCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号110]、
- (9) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCdGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号111]、
- (10) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGdAGUAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号112]、
- (11) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdTAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号113]、
- (12) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAdGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号114]
- (13) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAdAU
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号115]
- (14) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAdT
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号116]、
- (15) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GdGUCCCCUCC 3' [配列番号117]、
- (16) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUdCCCCCUCC 3' [配列番号118]、
- (17) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCCUCC 3' [配列番号119]、
- (18) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCdCUCC 3' [配列番号120]、
- (19) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUdCC 3' [配列番号121]、
- (20) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCdC 3' [配列番号122]、
- (21) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCCUdCC 3' [配列番号123]、
- (22) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAAUA
AGGUCCdCCUCC 3' [配列番号130]、

10

20

30

40

【化 1 B】

- (23) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAAU
AGGUCCdCCUCC 3' [配列番号131]、
 (24) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUCC 3' [配列番号132]、
 (25) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号133]、
 (26) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号134]、
 (27) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号90]

10

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、
 式中、C、U、G、Aはリボヌクレオチドであり、
 dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項1
 ~4のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項6】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが

【化2】

- 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCC
dCCUCC 3' [配列番号119] または 5' CUGUCGGAGACUAC
UCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号1
23] または 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUCC 3' [配列番号131]

20

のヌクレオチド配列を含む、請求項1~5のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項7】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチがリボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌク
 レオチドからなる、請求項1~4のいずれか1項に記載の核酸分子。

30

【請求項8】

前記ヌクレオチドの中心ストレッチが2'-リボヌクレオチドからなる、請求項1~4
 のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項9】

前記核酸分子が、5' 3'の方向でヌクレオチドの第1の末端ストレッチ、前記ヌク
 レオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチを含み、
 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが4~7ヌクレオチドを含み、
 前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが4~7ヌクレオチドを含み、
 好ましくは、
 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5~7ヌクレオチドを含み、
 前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5~7ヌクレオチドを含む、請求項1~8の
 いずれか1項に記載の核酸分子。

40

【請求項10】

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5ヌクレオチドを含み、
 前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5ヌクレオチドを含む、請求項9に記載の核
 酸分子。

【請求項11】

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' Z₁Z₂Z₃SZ₄WZ₅ 3'のヌ
 クレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' Z₆Z₇Z₈Z₉
 Z₁₀Z₁₁Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、

50

式中、S、W、V、BおよびKはリボヌクレオチドであり、

Z₁はSまたは不在であり、Z₂はVまたは不在であり、Z₃はBまたは不在であり、Z₄はVまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はYまたはdCであり、Z₇はWまたはdAであり、Z₈はBまたはdCであり、Z₉はSまたはdGであり、Z₁₀はSまたはdGまたは不在であり、Z₁₁はBまたは不在であり、Z₁₂はKまたは不在であり、

dG、dCおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項9または10に記載の核酸分子。

【請求項12】

a) Z₁がSであり、Z₂がVであり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁がBであり、Z₁₂がKであり、

b) Z₁が不在であり、Z₂がVであり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁がBであり、Z₁₂がKであり、

c) Z₁がSであり、Z₂がVであり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁がBであり、Z₁₂が不在であり、

d) Z₁が不在であり、Z₂がVであり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁がBであり、Z₁₂が不在であり、

e) Z₁が不在であり、Z₂が不在であり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁がBであり、Z₁₂が不在であり、

f) Z₁が不在であり、Z₂がVであり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁が不在であり、Z₁₂が不在であり、

g) Z₁が不在であり、Z₂が不在であり、Z₃がBであり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁が不在であり、Z₁₂が不在であり、

h) Z₁が不在であり、Z₂が不在であり、Z₃が不在であり、Z₁₀がSまたはdGであり、Z₁₁が不在であり、Z₁₂が不在であり、

i) Z₁が不在であり、Z₂が不在であり、Z₃がBであり、Z₁₀が不在であり、Z₁₁が不在であり、Z₁₂が不在であり、または

j) Z₁が不在であり、Z₂が不在であり、Z₃が不在であり、Z₁₀が不在であり、Z₁₁が不在であり、Z₁₂が不在である、請求項11に記載の核酸分子。

【請求項13】

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' C A C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' G G C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G G C U 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' G U C A U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' G C C A U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A U G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' G C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' C C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G G G 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項9、11および12のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項14】

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' C C Z₄ U Z₅ 3'のヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ 3'のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、G、AおよびUはリボヌクレオチドであり、

Z₄はGまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はCまたはdCであり、Z₇はAまたはdAであり、Z₈はCまたはdCであり、Z₉はGまたはdGであり、Z₁₀はGまたはdGであり、

dC、dGおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドである、請求項9~12のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項15】

a) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACGG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

b) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCdGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACGG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

c) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUdG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACGG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

d) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' dCACGG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

e) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CdACGG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

f) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CA d C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

g) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C d G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

h) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' C A C G d G 3'のヌクレオチド配列を含み、

好ましくは、前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACGG 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項9~12および14のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項16】

a) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' GCGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACGC 3'のヌクレオチド配列を含み、または

b) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' GGGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACCC 3'のヌクレオチド配列を含み、または

c) 前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' GCCUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CAGGC 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項9~12および14のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項17】

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' CGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' CACG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

10

20

30

40

50

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5'CGUG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5'UACG 3'のヌクレオチド配列を含み、または

前記ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5'GCAG 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5'CUGC 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項9、11および12のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項18】

前記核酸分子が、配列番号2、配列番号7、配列番号15、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号25、配列番号26および配列番号88の群から選択されるヌクレオチド配列、または配列番号2、配列番号7、配列番号15、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号25、配列番号26および配列番号88の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有する核酸分子、または配列番号2、配列番号7、配列番号15、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号25、配列番号26および配列番号88の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同であり、相同性は少なくとも85%である核酸分子を含む、請求項1~4および8~17のいずれか1項に記載の核酸分子。

10

【請求項19】

前記核酸分子が、配列番号33、配列番号45、配列番号47、配列番号54、配列番号124および配列番号078の群から選択されるヌクレオチド配列、または配列番号33、配列番号45、配列番号47、配列番号54、配列番号124および配列番号078の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも85%の同一性を有する核酸分子、または配列番号33、配列番号45、配列番号47、配列番号54、配列番号124および配列番号078の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同であり、相同性は少なくとも85%である核酸分子を含む、請求項1~7および9~17のいずれか1項に記載の核酸分子。

20

【請求項20】

前記核酸分子の前記ヌクレオチドまたは前記核酸分子を形成する前記ヌクレオチドがL-ヌクレオチドである、請求項1~19のいずれか1項に記載の核酸分子。

30

【請求項21】

前記核酸分子がL-核酸分子である、請求項1~19のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項22】

前記核酸分子が、CGRPに結合することができる少なくとも1つの結合部分を含み、そのような結合部分がL-ヌクレオチドからなる、請求項1~21のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項23】

前記核酸が、CGRPにより媒介される活性のアンタゴニストである、請求項1~22のいずれか1項に記載の核酸分子。

40

【請求項24】

前記核酸分子が修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物からの排出速度が、前記修飾基を含まない核酸と比較して低下する、請求項1~23のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項25】

前記核酸分子が修飾基を含み、前記修飾基を含む前記核酸分子の生物における保持時間が、前記修飾基を含まない核酸分子と比較して増大する、請求項1~23のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項26】

前記修飾基が、生分解性および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは前記

50

修飾基が、ポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分岐ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される、請求項24または25に記載の核酸分子。

【請求項27】

前記修飾基がポリエチレングリコールであり、好ましくは直鎖ポリエチレングリコールまたは分岐ポリエチレングリコールからなり、前記ポリエチレングリコールの分子量が好ましくは約20,000~約120,000Da、より好ましくは約30,000~約80,000Da、最も好ましくは約40,000Daである、請求項26に記載の核酸分子。

10

【請求項28】

前記修飾基がヒドロキシエチルデンプンであり、好ましくは前記ヒドロキシエチルデンプンの分子量が約50~約1000kDa、より好ましくは約100~約700kDa、最も好ましくは200~500kDaである、請求項26に記載の核酸分子。

【請求項29】

前記修飾基がリンカーを介して前記核酸分子と結合し、好ましくは前記リンカーが生分解性リンカーである、請求項24~28のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項30】

前記修飾基が前記核酸分子の5'末端ヌクレオチドおよび/もしくは3'末端ヌクレオチド、ならびに/または前記核酸分子の5'末端ヌクレオチドと前記核酸分子の3'末端ヌクレオチドとの間にある前記核酸分子のヌクレオチドと結合している、請求項24~28のいずれか1項に記載の核酸分子。

20

【請求項31】

生物が動物またはヒトの身体、好ましくはヒトの身体である、請求項24~30のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項32】

疾患の治療および/または予防方法で使用するための、請求項1~31のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項33】

前記疾患が、片頭痛、異なる形態の頭痛、急性疼痛、慢性疼痛、モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性、骨関節症、血管形成、自己免疫疾患、腫瘍成長および炎症性疾患を含む群から選択され、好ましくは前記急性疼痛および慢性疼痛が炎症および/または神経障害に由来する、請求項32に記載の核酸分子。

30

【請求項34】

請求項1~32のいずれか1項に記載の核酸分子、および任意選択でさらなる構成要素を含む医薬組成物であって、さらなる構成要素が、薬学的に許容される賦形剤、薬学的に許容される担体および薬学的活性作用物質を含む群から選択される医薬組成物。

【請求項35】

請求項1~32のいずれか1項に記載の核酸分子および薬学的に許容される担体を含む、請求項34に記載の医薬組成物。

40

【請求項36】

薬剤を製造するための、請求項1~32のいずれか1項に記載の核酸分子の使用。

【請求項37】

薬剤が、ヒト医学で使用するためまたは獣医学で使用するための薬剤である、請求項36に記載の使用。

【請求項38】

診断手段を製造するための、請求項1~32のいずれか1項に記載の核酸分子の使用。

【請求項39】

前記薬剤が、片頭痛、異なる形態の頭痛、急性疼痛、慢性疼痛、モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性、骨関節症、血管形成、自己免疫疾患、腫瘍成長および炎症性疾患の

50

治療用および/または予防用であり、好ましくは前記急性疼痛および慢性疼痛が炎症および/または神経障害に由来する、請求項 3 6 に記載の使用。

【請求項 4 0】

好ましくは結晶複合体である、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子および C G R P を含む複合体。

【請求項 4 1】

C G R P を検出するための、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の使用。

【請求項 4 2】

C G R P により媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、
C G R P により媒介される活性の候補アンタゴニストを提供するステップと、
請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を提供するステップと、
C G R P により媒介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルをもたらす試験系を提供するステップと、
C G R P により媒介される活性の候補アンタゴニストが C G R P により媒介される活性のアンタゴニストであるかどうかを決定するステップと
を含む方法。

10

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子と、少なくとも使用説明リーフレットまたは反応容器とを含む、C G R P を検出するためのキット。

【請求項 4 4】

試料中の請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸を検出する方法であって、
a) 捕捉プローブおよび検出プローブを準備するステップと、ここで、前記捕捉プローブが請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、前記検出プローブが請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、あるいは、前記捕捉プローブが請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、かつ前記検出プローブが請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子の前記第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、
b) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを別々にまたは組み合わせて、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含有する試料または請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子を含有すると推定される試料に添加するステップと、
c) 前記捕捉プローブおよび前記検出プローブを、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子またはその部分と同時にまたは任意の順番で順次に反応させるステップと、
d) 任意選択で、前記捕捉プローブが、ステップ a) で準備された請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子とハイブリダイズするか否かを検出するステップと、
e) 請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子ならびに捕捉プローブおよび検出プローブからなる、ステップ c) で形成された複合体を検出するステップと
を含む方法。

20

30

【請求項 4 5】

検出プローブが検出手段を含み、かつ/または捕捉プローブを支持体、好ましくは固体支持体に固定化する、請求項 4 4 に記載の方法。

40

【請求項 4 6】

ステップ c) で形成された複合体の一部でないいかなる検出プローブも反応から除去され、その結果ステップ e) で複合体の一部である検出プローブだけが検出される、請求項 4 4 または 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

ステップ e) が、捕捉プローブおよび検出プローブが請求項 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の核酸分子またはその部分の存在下でハイブリダイズするとき、検出手段によって生じたシグナルと、前記核酸分子またはその部分の不在下でハイブリダイズするとき、検出手段によって生じたシグナルとを比較するステップを含む、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか

50

1 項に記載の方法。

【請求項 48】

前記 CGRP が、ヒト CGRP、マウス CGRP、ラット CGRP またはアカゲザル由来の CGRP であり、好ましくは CGRP がヒト CGRP である、請求項 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 49】

前記 CGRP が α -CGRP または β -CGRP であり、好ましくはヒト α -CGRP、ヒト β -CGRP またはラット α -CGRP である、請求項 1 ~ 32 および 48 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 50】

前記核酸分子が、10 nM 以下の、好ましくは 1 nM 以下の、より好ましくは 100 pM 以下の、 K_D として表されるヒト α -CGRP に対する結合親和性を有する、請求項 1 ~ 32、48 および 49 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 51】

前記核酸分子が、10 nM 以下の、好ましくは 1 nM 以下の、より好ましくは 100 pM 以下の、IC50 として表されるヒト α -CGRP に対する結合親和性を有する、請求項 1 ~ 32 および 48 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 52】

前記核酸分子が、100 nM 以上の、好ましくは 500 nM 以上の、より好ましくは 1000 nM 以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する、請求項 1 ~ 32 および 48 ~ 51 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 53】

前記核酸分子が、100 nM 以上の、好ましくは 500 nM 以上の、より好ましくは 1000 nM 以上の、IC50 として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する、請求項 1 ~ 32 および 48 ~ 52 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【請求項 54】

前記核酸分子が、10 nM 以下の、好ましくは 1 nM 以下の、より好ましくは 100 pM 以下の、 K_D として表されるヒト α -CGRP に対する結合親和性を有し、前記核酸分子が、100 nM 以上の、好ましくは 500 nM 以上の、より好ましくは 1000 nM 以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有し、
および / または

前記核酸分子が、10 nM 以下の、好ましくは 1 nM 以下の、より好ましくは 100 pM 以下の、IC50 として表されるヒト α -CGRP に対する結合親和性を有し、前記核酸分子が、100 nM 以上の、好ましくは 500 nM 以上の、より好ましくは 1000 nM 以上の、IC50 として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する、請求項 1 ~ 32 および 48 ~ 53 のいずれか 1 項に記載の核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（略語：CGRP）に結合することができる核酸分子、薬剤、診断薬および検出薬をそれぞれ製造するための核酸分子の使用、前記核酸分子を含む組成物、前記核酸分子を含む複合体、前記核酸分子を使用して、CGRP により媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングする方法、ならびに前記核酸分子を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アルファ CGRP は、カルシトニン遺伝子転写物の選択的スプライシングにより生成される 37 アミノ酸の神経ペプチドである（Amara, Jonas ら、1982）。CGRP は、抹消神経系および中枢神経系で主に発現される（van Rossum, Hanisch ら、1997）。CGRP に関して様々な機能が説明されているが、最も知られ

10

20

30

40

50

ているインビボでのCGRPの作用は、硬膜の血管拡張および痛覚の伝達である (EdvinssonおよびHo、2010)。ヒトCGRPの構造は、¹H-NMRによって部分的に決定されていた。ペプチドは、明確に定義されたアルファヘリックス (残基8および18) をもたらす、定義されたアミノ末端ジスルフィド結合ループ (残基2~7) を含む。ペプチドのC末端部分は、明瞭に定義された構造を有さない (Breeze, Harveyら、1991)。

【0003】

ベータCGRPは、アルファCGRPに対する相同性が高いペプチドである (ヒトアルファおよびベータCGRPは、37個のアミノ酸中で3個だけ異なる、すなわち95%同一のアミノ酸である) が、別々の遺伝子により転写される。両方のペプチドは別々の解剖学的部位で発現されるが、類似の生物学的作用を示す (EdvinssonおよびHo、2010)。ヒトアルファCGRPに対する配列相同性を示す他のペプチドは、ヒトアミリン (37個中で15個 = ヒトアルファCGRPに対して41%同一のアミノ酸)、カルシトニン (37個中で7個 = 19%同一)、アドレノメデュリン (37個中で7個 = 19%同一) およびインテルメジン (37個中で7個 = 19%同一) である (図8Aを参照)。

10

【0004】

CGRPの細胞受容体は、Gタンパク質連結受容体であるカルシトニン様受容体 (略語: CLR) のヘテロ二量体であり、受容体活性調節タンパク質1 (略語: RAMP1) と呼ばれる小さな膜貫通タンパク質である。2つの他のRAMP、すなわちRAMP2およびRAMP3はクローン化されており、CLRと共にヘテロ二量体を形成することができ、ペプチドのカルシトニンファミリーの他のメンバーに対する選択性を決定することができる。例えば、CLRおよびRAMP2は、アドレノメデュリンの選択的受容体を形成する (McLatchie, Fraserら、1998)。CLRとRAMP1とが共にCGRP用の結合ポケットを形成すること、および臨床的に有効なCGRP受容体アンタゴニストがこの結合溝を遮断することが、構造データから確認された (RadantおよびRusso、2011)。受容体に結合しているCGRPにより、細胞内のcAMPレベル増大をもたらされる。

20

【0005】

CGRPに関して様々な機能が説明されているが、最も知られているインビボでのCGRPの作用は、硬膜の血管拡張および痛覚の伝達である (EdvinssonおよびHo、2010)。実際、CGRPは、痛覚神経線維のマーカーとして広く使用されている。

30

【0006】

西洋諸国では、成人人口の約10%が片頭痛を患っており、女性における罹患率はより高い。片頭痛は、吐き気もしくは嘔吐、または光恐怖症もしくは音恐怖症を伴う激しい再発性頭痛で特徴付けられる衰弱性疾患である。患者の約15%では、頭痛は神経症状、通常は視覚から始まる。この種の片頭痛は、前兆を伴う片頭痛として定義される (Goadsby、2003)。

【0007】

現在の治療の選択肢には、標準的な鎮痛薬 (アセチルサリチル酸、パラセタモール、イブプロフェンおよびCOX-2阻害剤などの、主に非ステロイド性抗炎症薬 (略語: NSAID)) と、2つのクラスの片頭痛に特有の鎮痛薬、すなわち血管収縮性の麦角アルカロイド誘導体 (例えばジヒドロエルゴタミン) およびトリプタン、5-HT_{1B/1D}受容体アゴニスト (例えばスマトリプタン) とが含まれる。これらの薬物は多くの患者にとって非常に効果的であるが、全ての片頭痛患者が現在利用可能な薬によって十分に治療され得るわけではなく、新規の治療の選択肢の必要性が強調されている (MonteithおよびGoadsby、2011)。

40

【0008】

いくつかの証拠から、片頭痛の病理学におけるCGRPの中心的役割が示唆される。脳血管の血管拡張は、片頭痛における頭痛の発生にとって重要な機構であると考えられる。

50

CGRPは強力な血管拡張物質として知られており、三叉神経節の刺激により、三叉神経の終末からのCGRPの放出、続いて血管平滑筋上にあるCGRP受容体により仲介される血管拡張が生じることが示された(Limmroth, Katsaravaら、2001)。さらに、血漿CGRPレベルは、片頭痛発作中の患者において上昇した(Goadsby, Edvinssonら、1990; Gallai, Sarchielliら、1995; Juhasz, Zsombokら、2003)が、他の研究ではこの事実を確認することができなかった(Tvedskov, Lipkaら、2005)。小児片頭痛では、CGRPの頭部外(extracerebral)の源が示唆されている(Tfelt-HansenおよびAshina、2010)。驚くべきことに、CGRPの注入により、片頭痛患者において片頭痛様頭痛が誘導されるが健常者においては誘導されず、片頭痛患者にCGRPに対する感受性の増大が示唆される(Lassen, Haderslevら、2002)。さらに、CGRPは、群発性頭痛、発作性片側頭痛、外傷後頭痛および透析頭痛などの片頭痛と異なる頭痛に關与するという証拠がある(Frese, Schilgenら、2005; Alessandri, Massantiら、2006; Tfelt-HansenおよびLe、2009; Summ, Andreouら、2010)。例えば、血漿CGRPレベルは、鎮痛治療後に正常化される群発性頭痛の発作中に上昇する(GoadsbyおよびEdvinsson、1994; Tfelt-HansenおよびLe、2009)。

【0009】

片頭痛の病態生理学の一因となる血管拡張以外の機構にCGRPが關与するという証拠が増加している。神経性炎症は、感覚神経の活性化に起因する無菌タイプの炎症であり、血管拡張、血漿タンパク質の溢出、常在する肥満細胞からの炎症性メディエーターの放出により特徴付けられる。三叉神経の終末からのCGRPの血管周囲への放出により、硬膜に常在する肥満細胞およびサテライトグリア細胞が刺激されることによって、そのような炎症事象が引き起こされ得る(OttossonおよびEdvinsson、1997; RaddantおよびRusso、2011)。さらに、CGRPは、片頭痛関連の光恐怖症および音恐怖症中に観測された、感覚入力に対する感受性の増大をもたらす痛覚のシナプス伝達に直接影響を与える可能性がある(Ho, Edvinssonら、2010)。

【0010】

片頭痛におけるCGRPの重要性は、ジヒドロエルゴタミンまたはスマトリプタンなどの抗片頭痛薬の投与によりCGRPレベルを低下させることができるという観測によって強調される(Limmroth, Katsaravaら、2001; Stepien, Jagustynら、2003)。ペプチドフラグメントCGRP(8~37)は、受容体を遮断することによりCGRPの機能に拮抗する。CGRP(8~37)は、様々な片頭痛および疼痛のモデルにうまく使用されたが、低い生物学的安定性に起因して、その使用が制限される。いくつかの非ペプチド小分子CGRP受容体アンタゴニストが開発されている。オルセゲパント(BIBN4096BS)、静脈内配合CGRP受容体アンタゴニストは、片頭痛の急性発作の治療に有効であった(Olesen, Dienerら、2004)。これらの有望な結果にも関わらず、その開発は、おそらく経口有効性の欠如に起因して中止された。オルセゲパントの後続の経口投与可能な化合物であるBI-44370 TAは、急性片頭痛の第2相試験で用量依存効果を最近示した(Diener, Barbantiら、2011)。テルカゲパント(MK-0974)は、片頭痛の潜在的治療のために開発された経口投与可能なCGRP受容体アンタゴニストである。それは急性片頭痛の第3相臨床試験で効能を示した(Ho, Ferrariraら、2008; Connor, Shapiroら、2009)が、その開発は、おそらく予防臨床試験からの肝臓毒性の徴候により最近中止された(RaddantおよびRusso、2011)。第2相臨床試験での片頭痛の潜在的な経口カプセル治療のために、BMS-927711が最近開発されている。抗CGRPモノクローナル抗体は、神経性血管拡張を効果的に阻害した(Tan, Brownら、1995; Zeller, Poulsenら、2008)。

CGRPを標的とする2種のモノクローナル抗体が最近開発されている。両方の抗体は現在、片頭痛の潜在的治療のための第1相臨床試験にある。しかし、それらの潜在的免疫原性のために、これらと他の抗体は、片頭痛の長期治療にとって実行可能な選択肢ではない可能性がある。

【0011】

基本的に、CGRPレベル/活性を下げることによる治療介入の試みにより、CGRP拮抗作用の概念を片頭痛の潜在的治療として支持する多くの結果が得られているが、十分な効力プロファイルまたは十分な安全プロファイルを有する化合物はもたらされていない。

【0012】

発明者らは、ラットCGRPと、より低い親和性でヒトCGRPと結合するスピーゲルマーをすでに説明した(Vater, Jaroschら、2003)。動物モデルでは、このスピーゲルマーは、CGRPにより誘導される血管拡張を効果的に抑制し(Edvinsson, Nilssonら、2007; Juhl, Edvinssonら、2007)、電気刺激後の硬膜動脈血流の増加を予防し(Denekas, Troltzschら、2006)、侵害的熱に対するストレイン関連過敏症(strain-related hypersensitivity)を消失させた(Mogil, Miermeisterら、2005)。

【0013】

アミリンまたは島アミロイドポリペプチド(略語: IAPP)は、ヒトにおけるCGRPに対して41%同一のアミノ酸残基を示す37アミノ酸ペプチドホルモンである。アミリンは、ランゲルハンス島の細胞からインシュリンと共に分泌される。アミリンは、胃内容排出の速度を落とし、消化分泌液を抑制し、その結果として食物摂取量を低下させることにより、血糖値の制御に寄与する。さらに、アミリンは、明らかに中枢神経系との相互作用により、満腹感および喉の渇きの感覚を引き起こす(Field, Chaudhriら、2010)。これに基づいて、ラットでは、アミリンの注入により食物摂取量の低下が生じる(Lutz, Del Preteら、1994; Morley, Floodら、1994)。この食欲減退効果により、アミリンの抑制は食物摂取量および肥満の増加をもたらす可能性がある(Lutz、2006)。結果として、CGRP結合スピーゲルマーのアミリンとの交差反応は、片頭痛の潜在的治療にとって重大な障害である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の根底にある問題は、アミリン、好ましくはヒトアミリンと相互作用することなく、ヒトCGRP、好ましくはヒトアルファCGRPに特異的に結合し、CGRP、好ましくはヒトアルファCGRPにより媒介される活性に拮抗する手段を提供することであり、この手段は、片頭痛、急性および慢性の疼痛またはモルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性などの疾患および状態の予防および/または治療に適している。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の根底にあるこれらおよび他の問題は、添付した独立請求項の内容によって解決される。好ましい実施形態は、従属請求項から得ることができる。

【0016】

本発明の根底にある問題は、第1の態様の第1の実施形態でもある第1の態様において、CGRPに結合することができる核酸分子であって、核酸分子がヌクレオチドの中心ストレッチを含み、ヌクレオチドの中心ストレッチが

5' HWn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Yn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂
Rn₁₃ADn₁₄n₁₅ARn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁ 3' [配列番号99]

のヌクレオチド配列を含み、

10

20

30

40

50

式中、H、W、Y、G、A、U、M、B、K、R、D、Cはリボヌクレオチドであり、
 n_1 はRまたはdGであり、 n_2 はUまたはdTであり、 n_3 はKまたはdGであり、 n_4 はCまたはdCであり、 n_5 はMまたはdCであり、 n_6 はBまたはdUであり、 n_7 はNまたはdGであり、 n_8 はYまたはdTであり、 n_9 はNまたはdCであり、 n_{10} はRまたはdGであり、 n_{11} はVまたはdAであり、 n_{12} はKまたはdTまたはdUであり、 n_{13} はGまたはdGであり、 n_{14} はAまたはdAであり、 n_{15} はUまたはdTであり、 n_{16} はRまたはdGであり、 n_{17} はYまたはdCであり、 n_{18} はCまたはdCであり、 n_{19} はBまたはdCであり、 n_{20} はCまたはdCであり、 n_{21} はCまたはdCであり、
 dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである
 核酸分子によって解決される。

10

【0017】

第1の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第2の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、

5' C U n_1 n_2 Y G G A n_3 A n_4 U M n_5 n_6 B n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} K n_{12}
 A n_{13} A D n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配
 列番号100]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、Y、G、A、M、B、Y、H、K、D、RおよびVはリボヌクレオチドであり、

20

n_1 はGまたはdGであり、 n_2 はUまたはdTであり、 n_3 はGまたはdGであり、 n_4 はCまたはdCであり、 n_5 はMまたはdCであり、 n_6 はBまたはdUであり、 n_7 はDまたはdGであり、 n_8 はYまたはdTであり、 n_9 はHまたはdCであり、 n_{10} はRまたはdGであり、 n_{11} はVまたはdAであり、 n_{12} はKまたはdTまたはdUであり、 n_{13} はGまたはdGであり、 n_{14} はAまたはdAであり、 n_{15} はUまたはdTであり、 n_{16} はGまたはdGであり、 n_{17} はYまたはdCであり、 n_{18} はCまたはdCであり、 n_{19} はCまたはdCであり、 n_{20} はCまたはdCであり、 n_{21} はCまたはdCであり、

dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0018】

30

第1の態様の第1および第2の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第3の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、

5' C U n_1 n_2 C G G A n_3 A n_4 U A n_5 n_6 C n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} G n_{12}
 A n_{13} A A n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配
 列番号101]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、Y、G、A、HおよびRはリボヌクレオチドであり、

n_1 はGまたはdGであり、 n_2 はUまたはdTであり、 n_3 はGまたはdGであり、 n_4 はCまたはdCであり、 n_5 はCまたはdCであり、 n_6 はUまたはdUであり、 n_7 はRまたはdGであり、 n_8 はYまたはdTであり、 n_9 はHまたはdCであり、 n_{10} はGまたはdGであり、 n_{11} はRまたはdAであり、 n_{12} はUまたはdTまたはdUであり、 n_{13} はGまたはdGであり、 n_{14} はAまたはdAであり、 n_{15} はUまたはdTであり、 n_{16} はGまたはdGであり、 n_{17} はCまたはdCであり、 n_{18} はCまたはdCであり、 n_{19} はCまたはdCであり、 n_{20} はCまたはdCであり、 n_{21} はCまたはdCであり、

40

dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0019】

第1の態様の第1、第2および第3の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第4の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、

5' C U n_1 n_2 C G G A n_3 A n_4 U A n_5 n_6 C n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} G n_{12}

50

$A n_{13} A A n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3'$ [配列番号 102]

のヌクレオチド配列を含み、

式中、C、U、G、A はリボヌクレオチドであり、

n_1 は G または dG であり、 n_2 は U または dT であり、 n_3 は G または dG であり、 n_4 は C または dC であり、 n_5 は C または dC であり、 n_6 は U または dU であり、 n_7 は G または dG であり、 n_8 は U または dT であり、 n_9 は C または dC であり、 n_{10} は G または dG であり、 n_{11} は A または dA であり、 n_{12} は U または dT または dU であり、 n_{13} は G または dG であり、 n_{14} は A または dA であり、 n_{15} は U または dT であり、 n_{16} は G または dG であり、 n_{17} は C または dC であり、 n_{18} は C または dC であり、 n_{19} は C または dC であり、 n_{20} は C または dC であり、 n_{21} は C または dC であり、

dG、dT、dC、dA および dU は 2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0020】

第1の態様の第1、第2、第3および第4の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第5の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、

【化 1 A】

- (1) 5' CUdGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号103]、
- (2) 5' CUGdTCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号104]、
- (3) 5' CUGUCGGAGdGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号105]、
- (4) 5' CUGUCGGAGAGdCUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号106]、
- (5) 5' CUGUCGGAGACUACUdCUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号107]、
- (6) 5' CUGUCGGAGACUACUCdGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号108]、
- (7) 5' CUGUCGGAGACUACUCGdTCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号109]、
- (8) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUdCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号110]、
- (9) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCdGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号111]、
- (10) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGdAGUAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号112]、
- (11) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdTAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号113]、
- (12) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAdGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号114]、
- (13) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAdAU
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号115]、
- (14) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAdT
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号116]、
- (15) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GdGUCCCCUCC 3' [配列番号117]、
- (16) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUdCCCCUC 3' [配列番号118]、
- (17) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCCUCC 3' [配列番号119]、
- (18) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCdCUCC 3' [配列番号120]、
- (19) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUdCC 3' [配列番号121]、
- (20) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCdC 3' [配列番号122]、
- (21) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCCUdCC 3' [配列番号123]、
- (22) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAAUA
AGGUCCdCCUCC 3' [配列番号130]、

10

20

30

40

【化1B】

- (23) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAAU
AGGUCCdCCUCC 3' [配列番号131]、
 (24) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUCC 3' [配列番号132]、
 (25) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号133]、
 (26) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号134]、
 (27) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号90]、

10

の群から選択されるヌクレオチド配列を含み、
 式中、C、U、G、Aはリボヌクレオチドであり、
 dG、dT、dC、dAおよびdUは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0021】

第1の態様の第1、第2、第3、第4および第5の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第6の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、

【化2】

- 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCC
dCCUCC 3' [配列番号119]または5' CUGUCGGAGACUAC
UCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号1
23]または5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUCC 3' [配列番号131]

20

のヌクレオチド配列を含む。

【0022】

第1の態様の第1、第2、第3および第4の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第7の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、リボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌクレオチドからなる。

30

【0023】

第1の態様の第1、第2、第3および第4の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第8の実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは、2'-リボヌクレオチドからなる。

【0024】

第1の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7および第8の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第9の実施形態では、核酸分子は、5' 3'の方向でヌクレオチドの第1の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチを含み、

40

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは4~7ヌクレオチドを含み、
 ニクレオチドの第2の末端ストレッチは4~7ヌクレオチドを含み、
 好ましくは、
 ニクレオチドの第1の末端ストレッチは5~7ヌクレオチドを含み、
 ニクレオチドの第2の末端ストレッチは5~7ヌクレオチドを含む。

【0025】

第1の態様の第9の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第10の実施形態では、ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5ヌクレオチドを含み、
 ニクレオチドの第2の末端ストレッチは5ヌクレオチドを含む。

【0026】

50

第1の態様の第9および第10の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第11の実施形態では、ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' Z₁ Z₂ Z₃ S Z₄ W Z₅ 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ Z₁₁ Z₁₂ 3'のヌクレオチド配列を含み、式中、S、W、V、BおよびKはリボヌクレオチドであり、Z₁はSまたは不在であり、Z₂はVまたは不在であり、Z₃はBまたは不在であり、Z₄はVまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はYまたはdCであり、Z₇はWまたはdAであり、Z₈はBまたはdCであり、Z₉はSまたはdGであり、Z₁₀はSまたはdGまたは不在であり、Z₁₁はBまたは不在であり、Z₁₂はKまたは不在であり、

dG、dCおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0027】

第1の態様の第11の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第12の実施形態では、

- a) Z₁はSであり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁はBであり、Z₁₂はKであり、
- b) Z₁は不在であり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁はBであり、Z₁₂はKであり、
- c) Z₁はSであり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁はBであり、Z₁₂は不在であり、
- d) Z₁は不在であり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁はBであり、Z₁₂は不在であり、
- e) Z₁は不在であり、Z₂は不在であり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁はBであり、Z₁₂は不在であり、
- f) Z₁は不在であり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁は不在であり、Z₁₂は不在であり、
- g) Z₁は不在であり、Z₂は不在であり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁は不在であり、Z₁₂は不在であり、
- h) Z₁は不在であり、Z₂は不在であり、Z₃は不在であり、Z₁₀はSまたはdGであり、Z₁₁は不在であり、Z₁₂は不在であり、
- i) Z₁は不在であり、Z₂は不在であり、Z₃はBであり、Z₁₀は不在であり、Z₁₁は不在であり、Z₁₂は不在であり、または
- j) Z₁は不在であり、Z₂は不在であり、Z₃は不在であり、Z₁₀は不在であり、Z₁₁は不在であり、Z₁₂は不在である。

【0028】

第1の態様の第9、第11および第12の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第13の実施形態では、

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C A C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G G C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G C U 3'のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G U C A U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G C C A U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A U G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含

10

20

30

40

50

み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G C 3'のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G G 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0029】

第1の態様の第9、第10、第11および第12の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第14の実施形態では、

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C Z₄ U Z₅ 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ 3'のヌクレオチド配列を含み、または

式中、C、G、AおよびUはリボヌクレオチドであり、

Z₄はGまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はCまたはdCであり、Z₇はAまたはdAであり、Z₈はCまたはdCであり、Z₉はGまたはdGであり、Z₁₀はGまたはdGであり、

dC、dGおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドである。

【0030】

第1の態様の第9、第10、第11、第12および第14の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第15の実施形態では、

a)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

b)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C d G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

c)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U d G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

d)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' d C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

e)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C d A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

f)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A d C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

g)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C d G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

h)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G d G 3'のヌクレオチド配列を含み、

好ましくは、ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0031】

第1の態様の第9、第10、第11、第12および第14の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第16の実施形態では、

a)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G C G U G 3'のヌクレオチド配列を

含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' C A C G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または

b) ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチは 5' G G G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' C A C C C 3' のヌクレオチド配列を含み、または

c) ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチは 5' G C C U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' C A G G C 3' のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 3 2 】

第 1 の態様の第 9、第 11 および第 12 の実施形態の実施形態でもある第 1 の態様の第 17 の実施形態では、

ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチは 5' C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' C A C G 3' のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチは 5' C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' U A C G 3' のヌクレオチド配列を含み、または

ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチは 5' G C A G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは 5' C U G C 3' のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 3 3 】

第 1 の態様の第 1、第 2、第 3、第 4、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16 および第 17 の実施形態の実施形態でもある第 1 の態様の第 18 の実施形態では、核酸分子は、配列番号 2、配列番号 7、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26 および配列番号 88 の群から選択されるヌクレオチド配列、または配列番号 2、配列番号 7、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26 および配列番号 88 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有する核酸分子、または配列番号 2、配列番号 7、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26 および配列番号 88 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同であり、相同性は少なくとも 85% である核酸分子を含む。

【 0 0 3 4 】

第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、および第 17 の実施形態の実施形態でもある第 1 の態様の第 19 の実施形態では、核酸分子は、配列番号 33、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 54、配列番号 124 および配列番号 078 の群から選択されるヌクレオチド配列、または配列番号 33、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 54、配列番号 124 および配列番号 078 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と少なくとも 85% の同一性を有する核酸分子、または配列番号 33、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 54、配列番号 124 および配列番号 078 の群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子と相同であり、相同性は少なくとも 85% である核酸分子を含む。

【 0 0 3 5 】

第 1 の態様の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、第 19 および第 20 の実施形態の実施形態でもある第 1 の態様の第 20 の実施形態では、核酸分子のヌクレオチドまたは核酸分子を形成するヌクレオチドは L - ヌクレオチドである。

【 0 0 3 6 】

第 1 の態様の第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 1

10

20

30

40

50

1、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18および第19の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第21の実施形態では、核酸分子はL-核酸分子である。

【0037】

第1の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20および第21の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第22の実施形態では、核酸分子は、CGRPに結合することができる少なくとも1つの結合部分を含み、そのような結合部分はL-ヌクレオチドからなる。

【0038】

第1の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21および第22の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第23の実施形態では、核酸は、CGRPにより媒介される活性のアンタゴニストである。

【0039】

第1の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22および第23の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第24の実施形態では、核酸分子は修飾基を含み、修飾基を含む核酸分子の生物からの排出速度は、修飾基を含まない核酸と比較して低下する。

【0040】

第1の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17、第18、第19、第20、第21、第22および第23の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第25の実施形態では、核酸分子は修飾基を含み、修飾基を含む核酸分子の生物における保持時間は、修飾基を含まない核酸分子と比較して増大する。

【0041】

第1の態様の第24および第25の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第26の実施形態では、修飾基は生分解性および非生分解性修飾を含む群から選択され、好ましくは修飾基はポリエチレングリコール、直鎖ポリエチレングリコール、分岐ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、ペプチド、タンパク質、多糖、ステロール、ポリオキシプロピレン、ポリオキシアミデートおよびポリ(2-ヒドロキシエチル)-L-グルタミンを含む群から選択される。

【0042】

第1の態様の第26の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第27の実施形態では、修飾基はポリエチレングリコールであり、好ましくは直鎖ポリエチレングリコールまたは分岐ポリエチレングリコールからなり、ポリエチレングリコールの分子量は好ましくは約20,000~約120,000Da、より好ましくは約30,000~約80,000Da、最も好ましくは約40,000Daである。

【0043】

第1の態様の第26の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第28の実施形態では、修飾基はヒドロキシエチルデンプンであり、好ましくはヒドロキシエチルデンプンの分子量は約50~約1000kDa、より好ましくは約100~約700kDa、最も好ましくは200~500kDaである。

【0044】

第1の態様の第24、第25、第26、第27および第28の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第29の実施形態では、修飾基はリンカーを介して核酸分子と結合し、好ましくはリンカーは生分解性リンカーである。

【0045】

第1の態様の第24、第25、第26、第27および第28の実施形態の実施形態でも

10

20

30

40

50

ある第1の態様の第30の実施形態では、修飾基は核酸分子の5'末端ヌクレオチドおよび/もしくは3'末端ヌクレオチドと、ならびに/または核酸分子の5'末端ヌクレオチドと核酸分子の3'末端ヌクレオチドとの間にある核酸分子のヌクレオチドと結合している。

【0046】

第1の態様の第24、第25、第26、第27、第28、第29および第30の実施形態の実施形態でもある第1の態様の第31の実施形態では、生物は動物またヒトの身体、好ましくはヒトの身体である。

【0047】

本発明の根底にある問題は、第2の態様の第1の実施形態でもある第2の態様において、疾患の治療および/または予防方法で使用するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子によって解決される。

10

【0048】

第2の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第2の実施形態では、疾患は、片頭痛、異なる形態の頭痛、急性疼痛、慢性疼痛、モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性、骨関節症、血管形成、自己免疫疾患、腫瘍増殖および炎症性疾患を含む群から選択され、好ましくは急性疼痛および慢性疼痛は炎症および/または神経障害に由来する。

20

【0049】

本発明の根底にある問題は、第3の態様の第1の実施形態でもある第3の態様において、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子、ならびに任意選択でさらなる構成要素を含む医薬組成物であって、さらなる構成要素が、薬学的に許容される賦形剤、薬学的に許容される担体および薬学的活性作用物質を含む群から選択される医薬組成物によって解決される。

30

【0050】

第3の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第3の態様の第2の実施形態では、医薬組成物は、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子、ならびに薬学的に許容される担体を含む。

【0051】

本発明の根底にある問題は、第4の態様の第1の実施形態でもある第4の態様において、薬剤を製造するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態に対する核酸分子の使用によって解決される。

40

【0052】

第4の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第4の態様の第2の実施形態では、薬剤は、ヒト医学で使用するためまたは獣医学で使用するための薬剤である。

【0053】

第4の態様の第1および第2の実施形態の実施形態でもある第4の態様の第3の実施形

50

態では、薬剤は、片頭痛、異なる形態の頭痛、急性疼痛、慢性疼痛、モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性、骨関節症、血管形成、自己免疫疾患、腫瘍増殖および炎症性疾患の治療用および/または予防用であり、好ましくは急性疼痛および慢性疼痛は炎症および/または神経障害に由来する。

【0054】

本発明の根底にある問題は、第5の態様の第1の実施形態でもある第5の態様において、診断手段を製造するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子の使用によって解決される。

10

【0055】

本発明の根底にある問題は、第6の態様の第1の実施形態でもある第6の態様において、好ましくは結晶複合体である、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子およびCGRPを含む複合体によって解決される。

20

【0056】

本発明の根底にある問題は、第7の態様の第1の実施形態でもある第7の態様において、CGRPを検出するための、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子の使用によって解決される。

30

【0057】

本発明の根底にある問題は、第8の態様の第1の実施形態でもある第8の態様において、CGRPにより媒介される活性のアンタゴニストをスクリーニングする方法であって、CGRPにより媒介される活性の候補アンタゴニストを準備するステップと、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態の核酸分子を提供するステップと、

CGRPにより媒介される活性のアンタゴニストの存在下でシグナルをもたらす試験系を提供するステップと、

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

を含む方法によって解決される。

40

【0058】

本発明の根底にある問題は、第9の態様の第1の実施形態でもある第9の態様において、第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態による核酸分子と、少なくとも使用説明リーフレットまたは反応容器を含む、CGRPを検出するためのキットによって解決される。

【0059】

本発明の根底にある問題は、第10の態様の第1の実施形態でもある第10の態様にお

50

いて、試料中の第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態の核酸分子を検出する方法であって、

a) 捕捉プローブおよび検出プローブを準備するステップと、ここで、捕捉プローブは第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態による核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、検出プローブは第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態による核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、あるいは、捕捉プローブは第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態による核酸分子の第 2 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、検出プローブは第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態による核酸分子の第 1 の部分と少なくとも部分的に相補的であり、

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

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

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

e) 第 1 の態様の第 1 の、第 2 の、第 3 の、第 4 の、第 5 の、第 6 の、第 7 の、第 8 の、第 9 の、第 10 の、第 11 の、第 12 の、第 13 の、第 14 の、第 15 の、第 16 の、第 17 の、第 18 の、第 19 の、第 20 の、第 21 の、第 22 の、第 23 の、第 24 の、第 25 の、第 26 の、第 27 の、第 28 の、第 29 の、第 30 の、および第 31 の実施形態による核酸分子ならびに捕捉プローブおよび検出プローブからなる、ステップ c) で形成された複合体を検出するステップと

10

20

30

40

50

を含む方法によって解決される。

【0060】

第10の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第10の態様の第2の実施形態では、検出プローブは検出手段を含み、かつ/または捕捉プローブを支持体、好ましくは固体支持体に固定化する。

【0061】

第10の態様の第1および第2の実施形態の実施形態でもある第10の態様の第3の実施形態では、ステップc)で形成された複合体の一部でないいかなる検出プローブも反応から除去され、その結果ステップe)で複合体の一部である検出プローブだけが検出される。

10

【0062】

第10の態様の第1、第2および第3の実施形態の実施形態でもある第10の態様の第4の実施形態では、ステップe)は、捕捉プローブおよび検出プローブは請求項1から32のいずれか1項に記載の核酸分子またはその部分の存在下でハイブリダイズするとき、検出手段によって生じたシグナルと、前記核酸分子またはその部分の不在下でハイブリダイズするとき、検出手段によって生じたシグナルとを比較するステップを含む。

【0063】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、および第31の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第2の実施形態でもある、第1の態様の第32の実施形態では、CGRPは、ヒトCGRP、マウスCGRP、ラットCGRPまたはアカゲザル(*macaca mulatta*)由来のCGRPであり、好ましくは、CGRPはヒトCGRPである。

20

【0064】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、および第32の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1および第2の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第3の実施形態でもある、第1の態様の第33の実施形態では、CGRPは -CGRPまたは -CGRPであり、好ましくはヒト -CGRP、ヒト -CGRPまたはラット -CGRPである。

30

【0065】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、および第33の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1、第2および第3の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第4の実施形態でもある、第1の態様の第34の実施形態では、核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、 K_D として表されるヒト -CGRPに対する結合親和性を有する。

40

【0066】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33のおよび第34の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1、第2、第3および第4の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第5の実施形態でもある、第1の態様の

50

第35の実施形態では、核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、IC50として表されるヒト - CGRPに対する結合親和性を有する。

【0067】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34のおよび第35の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1、第2、第3、第4および第5の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第6の実施形態でもある、第1の態様の第36の実施形態では、核酸分子は、100 nM以上の、好ましくは500 nM以上の、より好ましくは1000 nM以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

10

【0068】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35のおよび第36の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1、第2、第3、第4、第5および第6の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第7の実施形態でもある、第1の態様の第37の実施形態では、核酸分子は、100 nM以上の、好ましくは500 nM以上の、より好ましくは1000 nM以上の、IC50として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

20

【0069】

第1の態様の第1の、第2の、第3の、第4の、第5の、第6の、第7の、第8の、第9の、第10の、第11の、第12の、第13の、第14の、第15の、第16の、第17の、第18の、第19の、第20の、第21の、第22の、第23の、第24の、第25の、第26の、第27の、第28の、第29の、第30の、第31の、第32の、第33の、第34の、第35の、第36のおよび第37の実施形態の実施形態でもあり、第2の態様の第1、第2、第3、第4、第5、第6および第7の実施形態の実施形態でもある第2の態様の第8の実施形態でもある、第1の態様の第38の実施形態では、核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、 K_D として表されるヒト - CGRPに対する結合親和性を有し、核酸分子は、100 nM以上の、好ましくは500 nM以上の、より好ましくは1000 nM以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有し、

30

および/または

核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、IC50として表されるヒト - CGRPに対する結合親和性を有し、核酸分子は、100 nM以上の、好ましくは500 nM以上の、より好ましくは1000 nM以上の、IC50として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

40

【発明を実施するための形態】

【0070】

どんな理論にも拘泥するものではないが、本発明者らは、驚くべきことに、本発明による核酸分子がCGRPに特異的におよび高親和性で結合し、それにより、アミリンと交差反応することなくCGRP受容体へのCGRPの結合が阻害されることを発見した。したがって、本発明による核酸分子は、片頭痛および他の疾患を含む疼痛関連疾患などのCGRP関連の障害および疾患の治療に使用される可能性がある。さらに、本発明者らは、本発明による核酸分子がCGRPとCGRP受容体との相互作用を遮断するのに適していることを発見した。その限りにおいて、本発明による核酸分子はCGRPのアンタゴニストであり、および/またはCGRP - CGRP受容体系のアンタゴニストである。

50

【0071】

CGRPに対するアンタゴニストは、CGRPに結合し、実施例5に記載されているインビトロアッセイにおいてCGRPによりCGRP受容体へと仲介される活性に拮抗する分子（本発明による核酸分子など）である。本発明によるCGRPにより媒介される活性の一種は、実施例5に記載されているヒト神経芽細胞腫細胞におけるcAMP産生の誘導である。

【0072】

本発明による核酸分子または組成物、好ましくは本発明による核酸分子を含む医薬組成物を使用することにより治療または予防することができる様々な疾患、状態および障害に関して、そのような疾患、状態および障害は、特に、本出願の導入部に記載されているお

10

【0073】

本明細書においてCGRPという用語は、それだけに限らないが哺乳動物CGRPを含む任意のCGRPに関する。好ましくは、哺乳動物CGRPは、ヒトCGRP、サルCGRP、ラットCGRP、マウスCGRP、ブタCGRP、ヒツジCGRP、イヌCGRPを含む群から選択される。より好ましくは、CGRPはヒトCGRPである。本明細書においてCGRPという用語は、CGRPおよび-CGRPに関する。好ましくは、-CGRPは、ヒト-CGRP、サル-CGRP、ラット-CGRP、マウス-CGRP、ブタ-CGRP、ヒツジ-CGRP、イヌ-CGRPを含む群から選択される。より好ましくは、-CGRPはヒト-CGRPである。

20

【0074】

配列アラインメント（図8Bを参照）は、以下のもの由来の-CGRPと同一のヒト-CGRPのアミノ酸の以下の割合を実証する。

・ <i>Macaca mulatta</i> （アカゲザル）	100%
・ <i>Rattus norvegicus</i> （ラット）	89%
・ <i>Mus musculus</i> （マウス）	89%
・ <i>Sus scrofa</i> （ブタ）	86%
・ <i>Ovis aries</i> （ヒツジ）	89%
・ <i>Canis familiaris</i> （イヌ）	92%

30

【0075】

本明細書においてCGRP受容体という用語は、シグナル伝達事象を誘導することによりCGRPシグナルを細胞中に伝える任意の細胞表面タンパク質に関する。CGRP受容体は、それだけに限らないが哺乳動物CGRP受容体を含む。好ましくは、哺乳動物CGRP受容体は、ヒトCGRP受容体、サルCGRP受容体、ラットCGRP受容体、マウスCGRP受容体、ブタCGRP受容体、ヒツジCGRP受容体、イヌCGRP受容体を含む群から選択される。より好ましくは、CGRP受容体はヒトCGRP受容体である。

【0076】

さらに、CGRP-CGRP受容体軸の生理学的作用がCGRPのより高い血漿中レベルに関連する場合には、本発明による核分子が好ましい。

40

【0077】

CGRPとアミリンとの間の高い配列相同性（図9のアラインメントを参照）の結果として、すでに同定されているCGRP結合スピーゲルマー（WO2003/04372を参照）は、アミリンとの交差反応を示した（実施例7、図10）。したがって、本発明は、次の驚くべき知見に基づく。すなわち、高親和性でヒトCGRPと結合し、それにより、CGRPの作用、特にCGRPの受容体に対するCGRPの作用を阻害およびアンタゴナイズする核酸分子を生成することができるという知見、およびこの核酸分子はヒトアミリンに対する交差反応を示さず、ヒトCGRPへの結合に関して高度に特異的であるとい

50

う知見である。

【0078】

本発明による核酸が核酸分子であることは本発明の範囲内である。その限りにおいて、核酸および核酸分子という用語は、そうでないことを示さない場合は同意語のように本明細書で使用される。さらに、そのような（1つまたは複数の）核酸は本明細書において、好ましくは、本発明による（1つまたは複数の）核酸分子、本発明による（1つまたは複数の）核酸、本発明の（1つまたは複数の）核酸、または本発明の（1つまたは複数の）核酸分子とも称される。

【0079】

本明細書に記載されている、本発明による核酸の特徴は、核酸が単独でまたは任意の組合せで使用される本発明の任意の態様において実現することができる。

10

【0080】

本明細書でより詳細に述べるように、本発明者らは、CGRPに特異的に結合するいくつかの異なるCGRP結合核酸分子であり、本明細書において開示されているようにも称されるヌクレオチドのストレッチの観点から特徴付けることができる核酸分子を同定した（実施例1を参照）。

【0081】

本発明のCGRP結合核酸分子はヌクレオチドの3つの異なるストレッチ、すなわちヌクレオチドの第1の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチを含む。一般に、本発明のCGRP結合核酸分子は、5'末端および3'末端において、ヌクレオチドの末端ストレッチ、すなわちヌクレオチドの第1の末端ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチ（また、ヌクレオチドの5'末端ストレッチおよびヌクレオチドの3'末端ストレッチとも称される）をそれぞれ含む。ヌクレオチドの第1の末端ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチは、原則としてはそれらの塩基相補性に起因して、互いにハイブリダイズことができ、ハイブリダイゼーション時に二本鎖構造が形成される。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは、生理学的条件および/または非生理学的条件下において分子内で必ずしも実現されるものではない。本発明のCGRP結合核酸分子のヌクレオチドの3つのストレッチであるヌクレオチドの第1の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチは、5' 3'の方向で、すなわちヌクレオチドの第1の末端ストレッチ - ヌクレオチドの中心ストレッチ - ヌクレオチドの第2の末端ストレッチで互いに配列されている。あるいは、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの末端の第1のストレッチが5' 3'の方向で互いに配列されている。

20

30

【0082】

本発明による核酸のヌクレオチドの中心ストレッチの長さは、好ましくは40である。

【0083】

本発明による核酸のヌクレオチドの第1の末端ストレッチの長さは4~7ヌクレオチドであり、好ましくは5~7ヌクレオチドであり、より好ましくは5ヌクレオチドである。

【0084】

本発明による核酸のヌクレオチドの第2の末端ストレッチの長さは4~7ヌクレオチドであり、好ましくは5~7ヌクレオチドであり、より好ましくは5ヌクレオチドである。

40

【0085】

本発明の様々なCGRP結合核酸分子の間で定義されたボックスまたはストレッチの配列における差異は、CGRPに対する結合親和性に影響を与える。本発明の様々なCGRP結合核酸分子の結合分析に基づいて、中心ストレッチおよびそれを形成するヌクレオチドは個々に、より好ましくはそれらの全体でCGRPへのCGRP結合核酸分子の結合に不可欠である。

【0086】

「ストレッチ」および「ヌクレオチドのストレッチ」という用語は、そうでないことを

50

示さない限り同意語のように本明細書で使用される。

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

2つ以上のストレッチまたはその(1つまたは複数の)部分を含む、本発明による核酸が、原理上、互いにハイブリダイズすることができることは、本発明の範囲内である。そのようなハイブリダイゼーション後に二本鎖構造が形成される。特にインビトロおよび/またはインビボの条件下で、そのようなハイブリダイゼーションが起こることもあり、または起こらないこともあることが当業者によって認められるであろう。また、そのようなハイブリダイゼーションの場合、必ずしも、ハイブリダイゼーションが、少なくとも塩基対形成の規則に基づいてそのようなハイブリダイゼーション、したがって二本鎖構造の形成が原理上起こり得る2つのストレッチの長さ全体にわたって起こるとは限らない。好ましくは本明細書において、二本鎖構造とは、核酸分子の2つ以上の別々の鎖または一本鎖の2つの空間的に分離したストレッチによって形成される核酸分子の一部または構造であり、好ましくはワトソン-クリック塩基対形成の規則に従って塩基対を形成している少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の塩基対が存在する。フーグスティーン塩基対形成などの他の塩基対形成がそのような二本鎖構造中に存在し、またはそれを形成する可能性があることも当業者によって認められるであろう。2つのストレッチがハイブリダイズするという特徴が、好ましくは、そのようなハイブリダイゼーションがインビボおよび/またはインビトロで実際に起こるかどうかに関わらず、そのようなハイブリダイゼーションが2つのストレッチの塩基相補性に起因して起こると推定されることを示唆することも認められるはずである。本発明に関連して、そのようなストレッチは、上記で定義したように、実施形態においてハイブリダイズすることができるヌクレオチドの第1の末端ストレッチおよびヌクレオチドの第2のストレッチである。

【0090】

好ましい実施形態では、本明細書において配置という用語は、本明細書で開示されている本発明の(1つまたは複数の)核酸に関連して本明細書に記載されている構造的または機能的特徴または要素の順番または順序を意味する。

【0091】

本発明による核酸がCGRPと結合することができることが当業者によって認められるであろう。どんな理論にも拘泥するものではないが、CGRP結合は、本発明の核酸分子の三次元構造的な特性または要素の組み合わせから生じていると考えられ、その特性または要素は、そのような特性または要素を形成するヌクレオチドの一次配列の配向および折り畳みパターンによって生じており、好ましくは、そのような特性または要素は、CGRP結合核酸分子のヌクレオチドの第1の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第2の末端ストレッチである。本発明の核酸分子のCGRPへの結合を仲介するために、そのような要素または特性が形成しなければならない三次元構造に応じて変動の程度が様々であり得る種々の異なる個々の配列によって、個々の特性または要素が形成され得ることは明らかである。特許請求に係る核酸の全体的な結合の特徴は、最終的に特許請求に係る核酸とその標的、すなわちCGRPの相互作用をもたらす種々の要素および特性それぞれの相互影響から生じる。さらに、どんな理論にも拘泥するものではないが、CGRP結合核酸に特徴的なヌクレオチドの中心ストレッチは、特許請求に係る核酸分子とCGRPとの結合を仲介するために重要である。したがって、本発明による核酸は、CGRPとの相互作用に適している。また、本発明による核酸が、CGRPに対す

10

20

30

40

50

るアンタゴニストであることも当業者によって認められるであろう。このため、本発明による核酸は、CGRPに関連しまたはそれによって引き起こされる任意の疾患または状態の治療および予防それぞれに適している。そのような疾患および状態は、CGRPが前記疾患および状態それぞれに関与しまたはそれに関連することを明らかにし、本発明による核酸の治療目的での使用について科学的論拠をもたらす、参照により本明細書に組み込まれる従来技術から得ることができる。

【0092】

本発明による核酸分子は、本明細書で開示されている特定のヌクレオチド配列と本質的に相同である核酸分子も含むものとする。実質的に相同という用語は、例えば相同性が少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%を超えるものであるように理解されるものとする。

10

【0093】

本発明による核酸分子中に存在する相同ヌクレオチドの実際の割合は、核酸中に存在するヌクレオチドの総数に依存するだろう。修飾の割合を、核酸分子中に存在するヌクレオチドの総数に基づいて算出することができる。

【0094】

当業者に知られているように、2つの核酸分子間の相同性を決定することができる。より具体的には、配列比較アルゴリズムを使用して、指定されたプログラムパラメータに基づいて基準配列に対する(1つまたは複数の)試験配列のパーセント配列相同性を計算することができる。試験配列は、好ましくは、異なる核酸分子と相同であるといわれている、または相同であるかどうか、相同である場合はどの程度であるかを試験すべきである配列または核酸分子であり、そのような異なる核酸分子は基準配列とも称される。一実施形態では、基準配列は、本明細書に記載の核酸分子、好ましくは配列番号2、配列番号7、配列番号15、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号88、配列番号33、配列番号45、配列番号47、配列番号54、配列番号124および配列番号078のいずれか1つによる配列を有する核酸分子である。比較に最適な配列のアラインメントは、例えば、Smith & Waterman (Smith & Waterman, 1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, 1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, 1988)の類似性の検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装系(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, Wis.)によって、または視覚的検査によって行うことができる。

20

30

【0095】

パーセント配列同一性の決定に適したアルゴリズムの一例は、基本的な局所アラインメント検索ツールで使用されるアルゴリズム(以下「BLAST」)であり、例えば、Altschulら(Altschulら、1990およびAltschulら、1997)を参照されたい。BLAST分析を行うソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(以後「NCBI」)を通じて公的に利用可能である。NCBIから利用可能であるソフトウェア、例えばBLASTN(ヌクレオチド配列用)およびBLASTP(アミノ酸配列用)を使用して配列同一性を決定する際に使用される初期設定パラメータは、McGinnisら(McGinnisら、2004)に記載されている。

40

【0096】

本発明による核酸分子は、本明細書で開示されている本発明の(1つまたは複数の)核酸分子に対する同一性を特定の程度で有し、その/それらのヌクレオチド配列によって定

50

義される核酸分子も含むものとする。より好ましくは、本発明は、そのヌクレオチド配列またはその一部によって定義される本発明の核酸分子に対して少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%を超える同一性を有する核酸分子も含む。

【0097】

本発明の核酸または本発明による核酸分子という用語は、本明細書で開示されている核酸配列またはその一部を、例えば本発明による核酸の代謝物または誘導体などを、好ましくは核酸分子または前記一部がCGRPとの結合に關与するまたはCGRPと結合することができる程度まで含む核酸分子も含むものとする。例えば切断により、そのような核酸分子を本明細書で開示されているものから誘導することができる。切断は、本明細書で開示されている本発明の核酸分子の末端の一方または両方に關連し得る。また、切断は、ヌクレオチドの内部配列にも關連し得、すなわち、5'末端ヌクレオチドおよび3'末端ヌクレオチドそれぞれの間にある(1つまたは複数の)ヌクレオチドの内の1つまたはいくつかに關連し得る。さらに、切断は、本明細書で開示されている本発明の核酸分子の配列からのわずか1つだけのヌクレオチドの欠失を含むものとする。切断は、本発明の核酸分子のヌクレオチドの複数のストレッチにも關連し得、ヌクレオチドのストレッチはわずか1ヌクレオチドの長さでもよい。本発明による核酸分子の結合は、日常的な実験を使用して、または本明細書に記載の、好ましくは実施例の部において本明細書に記載の方法を使用もしくは採用することによって、当業者により決定することができる。

10

【0098】

本発明による核酸分子は、D-核酸分子でもよく、またはL-核酸分子でもよい。好ましくは、本発明による核酸分子はL-核酸分子であり、より好ましくは、本発明による核酸分子はスピーゲルマーである。

20

【0099】

一実施形態において、その(1つまたは複数の)核酸配列の観点から本明細書に記載の核酸分子その全体のうちのそれぞれおよびいずれかが、特定の(1つまたは複数の)示されたヌクレオチド配列に限定されることも、本発明の範囲内である。言い換えると、「含んでいる(comprising)」または「含む(comprise(s))」という用語は、そのような実施形態において、含有している(contains)またはからなる(consisting of)の意味に解釈されるものとする。

30

【0100】

本発明による核酸が長い核酸の一部であり、この長い核酸がいくつかの部分を含み、少なくとも1つのそのような部分が本発明による核酸またはその部分であることも、本発明の範囲内である。これらの長い核酸の(1つまたは複数の)他の部分は、1つもしくはいくつかの(1つもしくは複数の)D-核酸でもよく、または(1つもしくは複数の)L-核酸でもよい。本発明に關連して任意の組合せを使用することができる。この長い核酸のこれらの(1つまたは複数の)他の部分は、結合、好ましくはCGRPとの結合とは異なる機能を示し得る。1つのあり得る機能は、例えば固定化、架橋、検出または増幅などのために、他の分子との相互作用を可能にすることであり、そのような他の分子は、好ましくはCGRPと異なる。本発明のさらなる実施形態では、本発明による核酸は、個々のまたは組み合わせた部分として、本発明の核酸のいくつかを含む。本発明の核酸のいくつかを含むそのような核酸も、長い核酸という用語によって包含される。

40

【0101】

本明細書においてL-核酸とは、L-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にL-ヌクレオチドからなる核酸または核酸分子である。

【0102】

本明細書においてD-核酸とは、D-ヌクレオチドからなる、好ましくは完全にD-ヌクレオチドからなる核酸または核酸分子である。

【0103】

核酸および核酸分子という用語は、そうでないと明白に示さない場合は互換的に本明細

50

書で使用される。

【0104】

また、そうでないことを示さない場合は、任意のヌクレオチド配列は、本明細書において5' 3'の方向で記載されている。

【0105】

好ましくは本明細書において、ヌクレオチドの任意の位置は、そのようなヌクレオチドを含む配列、ストレッチまたはサブストレッチの5'末端に対して決定または言及される。したがって、2番目のヌクレオチドは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの5'末端からカウントして2番目のヌクレオチドである。また、それによれば、最後から2番目のヌクレオチドは、配列、ストレッチおよびサブストレッチそれぞれの3'末端からカウントして2番目のヌクレオチドである。

10

【0106】

本発明の核酸分子が、D-ヌクレオチド、L-ヌクレオチドまたは例えばランダムな組合せもしくは少なくとも1つのL-ヌクレオチドおよび少なくとも1つのD-核酸からなるストレッチの規定された配列である両方の組合せからなるかどうかに関係なく、核酸は、(1つまたは複数の)デオキシリボヌクレオチド、(1つまたは複数の)リボヌクレオチドまたはその組合せからなってもよい。

【0107】

リボヌクレオチドおよび2'デオキシリボヌクレオチドの両方からなる核酸分子も本発明の範囲内である。2'デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを図11A~Bおよび12に示す。本発明による核酸分子の配列においてリボヌクレオチドおよび2'デオキシリボヌクレオチドを区別するために、本明細書において以下の参照コードを使用する。

20

【0108】

本発明による核酸分子は主に2'デオキシリボヌクレオチドからなり、dGは2'デオキシ-グアノシン-5'-モノホスフェートであり、dCは2'デオキシ-シチジン-5'-モノホスフェートであり、dAは2'デオキシ-アデノシン-5'-モノホスフェートであり、dTは2'デオキシ-チミジン-5'-モノホスフェートであり、およびdUは2'デオキシ-ウリジン-5'-モノホスフェートである。

【0109】

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

30

【0110】

L-核酸分子として本発明の核酸分子を設計することは、いくつかの理由で有利である。L-核酸分子は、天然に存在する核酸の鏡像異性体である。しかし、D-核酸分子は、ヌクレアーゼが広範に存在するために、水溶液中、特に生物系または生物試料中であまり安定でない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞由来のヌクレアーゼは、L-核酸を分解することができない。このため、L-核酸分子の生物学的半減期は、動物およびヒトの身体を含めたそのような系の中で著しく増大する。L-核酸分子の分解性を欠くため、ヌクレアーゼ分解生成物は発生せず、したがってそれから生じる副作用は、動物およびヒトの身体を含めたそのような系の中で観察されない。この側面は、CGRPの存在が関与しているもしくはCGRPが媒介する疾患および/または障害の治療で使用される事実上全ての他の化合物からL-核酸分子を区別する。ワトソクリック塩基対形成と異なる機構を通じて標的分子と特異的に結合するL-核酸分子、または部分的にもしくは完全にL-ヌクレオチドからなるアプタマー、特にアプタマーと標的分子の結合に関与しているアプタマーの部分は、スピーゲルマーとも呼ばれる。アプタマーおよびスピーゲルマーそれ自体は当業者に知られており、とりわけ「The Aptamer Handbook」(Klusmann編、2006)に記載されている。

40

【0111】

50

本発明の核酸分子が、それがD-核酸、L-核酸もしくはD、L-核酸として存在するかどうか、またはそれがDNAもしくはRNAであるかどうかに関わらず、一本鎖または二本鎖核酸として存在し得ることも、本発明の範囲内である。典型的には、本発明の核酸分子は、一次配列に起因して規定された二次構造を示し、したがって三次構造をも形成できる一本鎖核酸分子である。しかし、本発明の核酸分子は、互いに相補的または部分的に相補的な2つの鎖が互いにハイブリダイズするという意味で二本鎖でもよい。

【0112】

本発明の核酸分子を修飾することができる。そのような修飾は、核酸分子の単一のヌクレオチドに関連し得、当技術分野で周知である。そのような修飾の例は、とりわけ、Venkatesanら(Venkatesan, Kimら、2003)およびKusser(Kusser、2000)に記載されている。そのような修飾は、核酸分子を構成する個々のヌクレオチドの内の1つ、いくつか、または全ての2'位におけるH原子、F原子またはO-CH₃基もしくはNH₂-基であり得る。また、本発明による核酸分子は、少なくとも1つのLNAヌクレオチドを含んでもよい。一実施形態では、本発明による核酸分子はLNAヌクレオチドからなる。

10

【0113】

一実施形態では、本発明による核酸分子は多分割核酸分子でもよい。本明細書において多分割核酸分子とは、少なくとも2つの別々の核酸鎖からなる核酸分子である。これら少なくとも2つの核酸鎖は機能的単位を形成し、その機能的単位は標的分子に対するリガンドであり、好ましくは、CGRPの場合では標的分子に対するアンタゴニストである。少なくとも2つの核酸鎖は、本発明の核酸分子を切断して少なくとも2つの鎖を得るか、または本発明の完全長の核酸分子の第1の部分に対応する1つの核酸分子および本発明の完全長の核酸分子の別の部分に対応する別の核酸分子を合成することにより、本発明の核酸分子のいずれかから得ることができる。完全長の核酸分子を形成する部分の数に応じて、必要なヌクレオチド配列を有する同数の部分が合成される。切断手法と合成手法を両方適用して、上記で例示した、鎖が2つより多い多分割核酸分子を得ることができることが認められるはずである。言い換えると、少なくとも2つの別々の核酸鎖は、典型的には、互いに相補的でありハイブリダイズする2つの鎖と異なるが、前記少なくとも2つの別々の核酸鎖の間にある程度の相補性が存在することがあり、そのような相補性の結果、前記別々の鎖のハイブリダイゼーションが生じることがある。

20

30

【0114】

最後に、本発明による核酸分子の完全に閉鎖した、すなわち環状の構造が実現され、すなわち、本発明による核酸分子が一実施形態において、好ましくは共有結合により閉鎖し、より好ましくはそのような共有結合が本明細書で開示されている核酸配列またはその任意の誘導体の5'末端と3'末端の間でなされることも、本発明の範囲内である。

【0115】

本発明による核酸分子の結合定数を決定できる可能性は、本明細書において実施例4に記載の方法の使用にあり、これにより、本発明による核酸が有望なK_D値の範囲を示すという上記の知見が確認される。個々の核酸分子と、この場合CGRPである標的との結合の強度を表すのに適した尺度はいわゆるK_D値であり、それ自体、同様にその決定の方法も当業者に知られている。

40

【0116】

好ましくは、本発明による核酸によって示されるK_D値は1μM以下である。約1μMのK_D値は、核酸と標的の非特異的な結合に特徴的であるといわれている。当業者によって認められるように、本発明による核酸分子の種々の実施形態など一群の化合物のK_D値は特定の範囲内にある。上記で述べた約1μMのK_Dは、K_D値について好ましい上限である。本発明による核酸分子の一つなどの標的結合核酸のK_Dの下限はわずかに約10ピコモルでもよく、またはより高くてもよい。CGRPと結合する個々の本発明による核酸分子のK_D値が好ましくはこの範囲内であることは、本発明の範囲内である。この範囲内の任意の第1の数およびこの範囲内の任意の第2の数を選択することによって、好ま

50

しい K_D 値の範囲を規定することができる。好ましい上位の K_D 値は250 nMおよび100 nMであり、好ましい下位の K_D 値は50 nM、10 nM、1 nM、100 pMおよび10 pMである。より好ましい上位の K_D 値は10 nMであり、より好ましい下位の K_D 値は100 pMである。

【0117】

好ましくは、CGRPはヒトアルファCGRPであり、核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、 K_D として表されるヒトアルファCGRPに対する結合親和性を有する。

【0118】

本発明による核酸分子に関して実施例7に示すように、表面プラズモン共鳴測定によってヒトアミリンに対する結合を検出することができなかった。好ましくは、本発明による核酸分子は、100 nM以上の、好ましくは500 nM以上の、より好ましくは1000 nM以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

【0119】

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

【0120】

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

【0121】

好ましくは、本発明による核酸分子によって示される IC_{50} 値は1 μ M未満である。約1 μ Mの IC_{50} 値は、標的機能の非特異的な阻害、好ましくは、本発明の核酸分子による、標的による標的受容体の活性化の阻害に特徴的であるといわれている。当業者によって認められるように、本発明による核酸分子の様々な実施形態など一群の化合物の IC_{50} 値は特定の範囲内にある。上記で述べた約1 μ Mの IC_{50} は、 IC_{50} 値についての好ましい上限である。標的結合核酸分子の IC_{50} についての下限はわずか約10ピコモルでもよく、またはより高くてもよい。CGRPと結合する個々の核酸の IC_{50} 値が好ましくはこの範囲内であることは、本発明の範囲内である。この範囲内での任意の第1の数およびこの範囲内での任意の第2の数を選択することによって、好ましい範囲を規定することができる。好ましい上位の IC_{50} 値は250 nMおよび100 nMであり、好ましい下位の IC_{50} 値は50 nM、10 nM、1 nM、100 pMおよび10 pMである。より好ましい上位の IC_{50} 値は5 nMであり、より好ましい下位の IC_{50} 値は100 pMである。

【0122】

好ましい実施形態では、CGRPはヒトアルファCGRPであり、核酸分子は、10 nM以下の、好ましくは1 nM以下の、より好ましくは100 pM以下の、 IC_{50} として表されるヒトアルファCGRPに対する結合親和性を有する。

【0123】

本発明による核酸分子に関して実施例7に示すように、ヒトアミリンに関して1000

10

20

30

40

50

nMを超えるIC50およびラットアミリンに関して100nMを超えるIC50を測定した。好ましい実施形態では、本発明の分子による核酸は、100nM以上の、好ましくは500nM以上の、より好ましくは1000nM以上の、IC50として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

【0124】

好ましくは、核酸分子は、10nM以下の、好ましくは1nM以下の、より好ましくは100pM以下の、 K_D として表されるヒトアルファCGRPに対する結合親和性を有し、核酸分子は、100nM以上の、好ましくは500nM以上の、より好ましくは1000nM以上の、 K_D として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有し、および/または核酸分子は、10nM以下の、好ましくは1nM以下の、より好ましくは100pM以下の、IC50として表されるヒトアルファCGRPに対する結合親和性を有し、核酸分子は、100nM以上の、好ましくは500nM以上の、より好ましくは1000nM以上の、IC50として表されるヒトアミリンに対する結合親和性を有する。

10

【0125】

本発明による核酸分子は、それが依然としてCGRPの場合での標的分子と結合することができるという条件で、どんな長さを有していてもよい。本発明による核酸について好ましい長さがあることが当技術分野において認められるであろう。典型的には、その長さは15~120ヌクレオチドである。15~120の間の任意の整数が、本発明による核酸についてあり得る長さであることが当業者によって認められるであろう。本発明による核酸の長さについてより好ましい範囲は、約20~100ヌクレオチド、約20~80ヌクレオチド、約20~60ヌクレオチド、約20~52ヌクレオチドおよび約48~54ヌクレオチドである。

20

【0126】

核酸分子が、好ましくは高分子量部分であり、かつ/または好ましくは核酸の特徴を、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの身体における滞留時間の観点から修飾することを可能にする部分を含むことは、本発明の範囲内である。そのような修飾の特に好ましい実施形態は、本発明による核酸分子のPEG化およびHES化である。本明細書において、PEGはポリ(エチレングリコール)を表し、HESはヒドロキシエチルデンブンを表す。好ましくは本明細書においてPEG化は本発明による核酸の修飾であり、そのような修飾は本発明による核酸と結合したPEG部分からなる。好ましくは本明細書においてHES化は本発明による核酸の修飾であり、そのような修飾は本発明による核酸と結合したHES部分からなる。これら修飾、ならびにそのような修飾を使用して核酸を修飾する方法は欧州特許出願EP1306382に記載され、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0127】

PEGがそのような高分子量部分である場合、分子量は好ましくは約20,000~約120,000Da、より好ましくは約30,000~約80,000Da、最も好ましくは約40,000Daである。HESがそのような高分子量部分である場合、分子量は好ましくは約50~約1000kDaであり、より好ましくは約100~約700kDaであり、最も好ましくは200~500kDaである。HESは、0.1~1.5の、より好ましくは1~1.5のモル置換を示し、約0.1~15の、好ましくは約3~10のC2/C6比として表される置換グレードを示す。HES修飾の方法は、例えば独国特許出願DE12004006249.8に記載され、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0128】

修飾は、原理上、本発明の核酸分子に対してその任意の位置で行うことができる。好ましくは、そのような修飾は、核酸分子の5'末端ヌクレオチド、3'末端ヌクレオチドおよび/または5'ヌクレオチドと3'ヌクレオチドの間にある任意のヌクレオチドに対して行われる。

【0129】

50

修飾ならびに好ましくはPEGおよび/またはHES部分を、直接または間接的に、好ましくはリンカーを介して間接的に本発明の核酸分子と結合させることができる。本発明による核酸分子が1つまたは複数の修飾、好ましくは1つまたは複数のPEGおよび/またはHES部分を含むことも、本発明の範囲内である。一実施形態では、個々のリンカー分子は複数のPEG部分またはHES部分を本発明による核酸分子と結合させる。本発明に関連して使用されるリンカーは、それ自体直鎖でもよく、または分岐していてもよい。この種のリンカーは当業者に知られており、特許出願WO2005/074993およびWO2003/035665にさらに記載されている。

【0130】

好ましい実施形態では、リンカーは生分解性リンカーである。生分解性リンカーは、本発明による核酸からの修飾の放出により、本発明による核酸の特徴を、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの身体における滞留時間の観点から修飾することを可能にする。生分解性リンカーを使用すると、本発明による核酸の滞留時間の良好な調節を可能にすることができる。そのような生分解性リンカーの好ましい実施形態は、それだけに限らないが、国際特許出願WO2006/052790、WO2008/034122、WO2004/092191およびWO2005/099768に記載されている生分解性リンカーである。

10

【0131】

修飾または修飾基が生分解性修飾であり、その生分解性修飾を、直接または好ましくはリンカーを介して間接的に本発明の核酸分子と結合させることができることは、本発明の範囲内である。生分解性修飾は、本発明による核酸からの修飾の放出または分解により、本発明による核酸の特徴を、とりわけ、動物の身体、好ましくはヒトの身体における滞留時間の観点から修飾することを可能にする。生分解性修飾を使用すると、本発明による核酸の滞留時間の良好な調節を可能にすることができる。そのような生分解性修飾の好ましい実施形態は、それだけに制限されないが、国際特許出願WO2002/065963、WO2003/070823、WO2004/113394およびWO2000/41647に、好ましくはWO2000/41647、18ページ、4~24行目に記載されているように生分解性である。

20

【0132】

上記に記載の修飾のほかに、他の修飾を使用して、本発明による核酸の特徴を修飾することができる。そのような他の修飾は、タンパク質、コレステロールなどの脂質およびアミラーゼ、デキストランなどの糖鎖などの群から選択することができる。

30

【0133】

どんな理論にも拘泥するものではないが、好ましくは生理的に許容されるポリマー、より詳細には本明細書で開示されているポリマーの1つまたはいくつかなどの高分子量部分で本発明による核酸分子を修飾することにより、そのような修飾された本発明の核酸分子の、本発明の修飾核酸分子が投与される動物またはヒトの身体からの排出動態が変化する。より詳細には、そのような修飾された本発明の核酸分子の分子量が増大し、特にL型のときに、すなわちL-核酸分子であるときに本発明の核酸分子が代謝に曝されないため、動物の身体、好ましくは哺乳動物の身体、より好ましくはヒトの身体からの排出が低下する。典型的には排出が腎臓を介して行われるので、こうして修飾された核酸分子の糸球体ろ過量がこの種の高分子量修飾を有さない核酸分子と比較して著しく低減され、その結果、動物の身体における修飾核酸分子の滞留時間が増大することが想定される。それに関連して、そのような高分子量修飾にも関わらず、本発明による核酸分子の特異性が、有害な方法で影響を受けないことは特に注目に値する。その限りにおいて、本発明による核酸分子は、とりわけ、持続性放出をもたらす医薬製剤が本発明による核酸分子の持続性放出をもたらすことが必ずしも必要でないような、薬学的活性化合物から通常は予想できない驚くべき特徴を有する。むしろ、高分子量部分を含む修飾された形態の本発明による核酸分子は、その修飾のために、すでに持続性放出製剤から放出されたかのように働くので、それ自体すでに持続性放出製剤として使用することができる。その限りにおいて、本明細書

40

50

で開示されている本発明による核酸分子の（１つまたは複数の）修飾およびこうして修飾された本発明による核酸分子ならびにそれらを含む任意の組成物は、独特の、好ましくは調節された薬物動態および生体内分布をもたらすことができる。これには、動物およびヒトの身体の循環ならびにそのような動物およびヒトの組織への分布における滞留時間も含まれる。そのような修飾は、特許出願W O 2 0 0 3 / 0 3 5 6 6 5 にさらに記載されている。

【 0 1 3 4 】

しかし、本発明による核酸が、修飾、特にPEG化またはHES化などの高分子量修飾を含まないことも、本発明の範囲内である。そのような実施形態は、本発明による核酸が体内の任意の標的臓器もしくは組織に対して優先的な分布を示すとき、または身体への投与後の身体からの本発明による核酸の迅速なクリアランスが所望されるときに特に好ましい。体内の任意の標的臓器または標的組織に対して優先的な分布プロファイルを有する、本明細書で開示されている本発明による核酸分子により、核酸分子の全身濃度を低く維持しつつ、標的組織における有効な局所濃度の確立が可能となる。これにより低用量の使用が可能となり、それは経済的な視点から有益であるだけでなく、核酸作用物質に対する他の組織の不要な曝露も低減し、それによって副作用の潜在的なリスクが低減する。投与後の身体からの本発明による核酸分子の迅速なクリアランスは、とりわけ、本発明による核酸分子またはそれを含む薬剤を使用したインビボ画像化または特定の治療的投与の必要のある場合に所望されることがある。

10

【 0 1 3 5 】

本発明による核酸分子および/または本発明によるアンタゴニストは、薬剤または医薬組成物の生成または製造に使用することができる。本発明によるそのような薬剤または医薬組成物は、任意選択で少なくとも１つのさらなる薬学的活性化化合物と一緒に、本発明による核酸分子の少なくとも１つを含有し、本発明による核酸分子は、好ましくは、薬学的活性化化合物それ自体として働く。そのような薬剤は、好ましい実施形態では、少なくとも薬学的に許容される担体を含む。そのような担体は、例えば、水、緩衝液、PBS、グルコース溶液、好ましくは５％グルコース、塩平衡溶液、クエン酸塩、デンプン、糖、ゼラチンまたは任意の他の許容される担体物質でよい。そのような担体は、当業者に一般に知られている。本発明の薬剤のまたはそれに関連する任意の実施形態、使用および態様が、本発明の医薬組成物にも適用可能であり、逆もまた同じであることが当業者によって認められるであろう。

20

30

【 0 1 3 6 】

本発明によるまたは本発明に従って調製された核酸分子、医薬組成物および薬剤による治療および/または予防の適応症、疾患および障害は、それぞれの病原性機構においてCGRPが直接または間接的に関与することから生じる。

【 0 1 3 7 】

片頭痛および他の頭痛の発現に関連するまたは関与する経路におけるCGRPの関与に基づいて、本発明の核酸分子、核酸分子の内の１つまたはいくつかを含有する本発明の医薬組成物および核酸分子の内の１つまたはいくつかを含有する本発明に薬剤が前記疾患、障害および疾患状態の治療および/または予防において有用であることは明らかである。

40

【 0 1 3 8 】

本発明の核酸分子、核酸分子の内の１つまたはいくつかを含有する本発明の医薬組成物および核酸分子の内の１つまたはいくつかを含有する本発明の薬剤の使用は、上記に記載した片頭痛および他の頭痛の発現における潜在的な治療的介入に制限されない。さらに、それらは、CGRPの病態生理学的関与が説明されている疾患および/または障害および/または疾患状態に適用可能である。したがって、そのような疾患および/または障害および/または疾患状態には、それだけに限らないが、片頭痛、異なる形態の頭痛、急性疼痛、慢性疼痛、モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性、骨関節症、血管形成、腫瘍成長、自己免疫疾患およびまたは炎症性疾患が含まれ、好ましくは、急性疼痛および慢性疼痛は炎症および/または神経障害に由来する。

50

【0139】

言うまでもなく、本発明によるCGRP結合核酸分子がCGRPと相互作用し、またはCGRPに結合することから、本発明によるCGRP結合核酸分子を、ヒトおよび動物の本明細書に記載されている任意の疾患の治療、予防および/または診断に容易に使用することができることを当業者は一般に理解するだろう。それに関連して、一実施形態では、本発明による核酸分子が、本明細書に記載されている疾患、障害および状態の根底にある作用の機序に関係なく、そのような疾患、障害または状態のいずれかの治療および予防に使用することができることが認められるはずである。

【0140】

いかなる不必要な繰り返しも避けるために、それに関連して概略されているCGRP-CGRP受容体軸の関与により、特許請求に係る治療、予防および診断効果が実現するように本発明による核酸分子によって前記軸に対処することができることが認められるはずである。さらに、患者の疾患、障害および状態の特殊性およびそれに関連して記載されている治療レジメンのいかなる詳細も本出願の好ましい実施形態の対象であり得ることが認められるはずである。

10

【0141】

急性および慢性の疼痛。CGRPは、侵害受容性の神経線維により高度に発現される。CGRPが急性および慢性の疼痛の発生および永続化に関与する証拠が蓄積されている。炎症は、急性および慢性の痛覚の潜在的トリガーであり得る。慢性膵炎では疼痛が最も治りにくい症状である。それは、後根神経節におけるCGRPの上方制御を順次誘導する膵臓におけるNGFの発現の増大により進行する(Winston, Heら、2005; Wick, Hogeら、2006; Liu, Shenoyら、2011)。CGRP(8~37)の髄腔内投与により、この機構に拮抗することができ、痛覚過敏を低下させることができる(Liu, Shenoyら、2011)。関節炎の動物モデルでは、髄腔内のCGRP(8~37)およびオルセゲパントはニューロン活動を著しく阻害し、後肢の侵害反射の閾値を増大させた(McDougal, 2006; Adwanikar, Jiら、2007)。CGRP欠乏マウスでは、関節炎の実験的誘導後に痛覚過敏を実証することに失敗した(ZhangおよびMcDougal, 2006)。さらに、自発性疼痛に伴う関節炎の顎関節の髄液中において、CGRPが高レベルで発見されている(Kopp, 2001)。深部組織炎症のモデルでは、静脈内CGRP(8~37)により血漿の溢出が遮断され、頭部および後肢の両方の機械的アロディニアが消滅した(Ambalavanar, Moritaniら、2006)。

20

30

【0142】

神経障害性疼痛に関するモデルでは、CGRPの高度発現が観測される(Zheng, Wangら、2008; Nitzan-Luques, Devorら、2011)。CGRP(8~37)は、脊髄ヘミセクションまたは骨髄神経切断により誘発される機械的および熱的なアロディニアの消滅に効果的である(Bennett, Chastainら、2000; LeeおよびKim, 2007)。同様に、CGRP(8~37)およびオルセゲパントにより、部分的な坐骨神経の結紮後の温熱性痛覚過敏が効果的に弱められた(MaおよびQuirion, 2006)。糖尿病の神経障害性疼痛に関するモデルでは、静脈内CGRP(8~37)により、STZにより誘導される糖尿病を患うマウスにおいて痛覚過敏活性が著しく弱められた(GabraおよびSirois, 2004)。さらに、CGRPは、帯状ヘルペスによって引き起こされる神経損傷の結果であると考えられる後ヘルペス性神経痛に関与することができる(Hou, Barrら、2011)。

40

【0143】

腰痛は仙腸関節で起こることが知られている。ヒト組織の組織学的研究により、CGRPが仙骨および腸骨の軟骨の上層に存在することが明らかになった(Szadek, Hooglandら、2010)。一致するように、ラットにおけるアジュバントによる誘導される腰痛中での後根神経節中においてCGRP発現が増大した(Lee, Kimら、2009)。

50

【0144】

癌性疼痛におけるCGRPの関与の証拠が、CGRP陽性線維およびCGRP放出を伴う腫瘍の神経支配の増大が痛覚過敏と関連することを明らかにしている研究によりもたらされている(Wacnik, Bakerら、2005; Schweizerhof, Stosserら、2009)。CGRP(8~37)の腫瘍内注入により、腫瘍が関連する痛覚過敏が部分的に遮断される(Wacnik, Bakerら、2005)。

【0145】

疼痛は過敏性腸症候群の特徴的な症状である。慢性結腸過敏症に関する非炎症性のモデルでは、CGRP受容体の遮断により結腸過敏症が低減した。このことは、過敏性腸症候群における腹痛の潜在的治療としてのCGRP拮抗作用を示唆する(Bourdu, Da poignyら、2005)。

10

【0146】

片頭痛、異なる形態の頭痛、急性および慢性の疼痛における治療的介入の場合では、本発明のまたは本発明に従って調製された核酸分子、医薬組成物および薬剤を、NSAID、麦角アルカロイド誘導体(例えばジヒドロエルゴタミン)およびトリプタン、5-HT_{1B/1D}受容体アゴニスト(例えばスマトリプタン)などの確立した鎮痛剤(analgetics)との併用療法で使用することができる。

【0147】

モルヒネをベースとする鎮痛に対する耐性。モルヒネをベースとする薬物に長時間にわたって曝されると鎮痛効力が徐々に減少し、その臨床用途が制限される。CGRPは、モルヒネをベースとする鎮痛剤に対するこの耐性の仲介に関与すると示唆されている。ラットでは、慢性の髄腔内モルヒネ治療により、その抗侵害受容性効果に対する耐性がもたらされ、脊髄後角におけるCGRPの上方制御が誘導される。同様に、この神経末端から放出されたCGRPは、モルヒネにより誘導される鎮痛に対する耐性の発生の一因となる。動物モデルでは、オルセゲパントまたはCGRP(8~37)による髄腔内治療により、これらの下流効果が遮断され、それによって、慢性的に使用されるモルヒネの鎮痛特性が維持される。したがって、CGRPアンタゴニストを、アヘン剤をベースとする治療における補助剤として潜在的に使用することができる(Powell, Maら、2000; Wang, Maら、2009)。

20

【0148】

骨関節症。痛みを伴う骨関節症(略語:OA)を患う患者からの股関節は、対照と比較して3倍高いCGRP陽性神経密度を有し、関節リウマチおよびOAの患者からの滑膜組織の組織学は、OAにおける著しく高いCGRP-陽性神経線維密度を明らかにした(Saxler, Loerら、2007; Dirmeier, Capellinoら、2008)。一致するように、関節を刺激するCGRP-陽性線維の割合がOAの動物モデルでは著しく増大した(Ferreira-Gomes, Adaesら、2010)。一過性受容体電位カチオンチャンネルサブファミリーVメンバー1アンタゴニストの鎮痛効果は、OAモデルにおけるCGRPの低下した脊髄レベルと関連した(Puttfarcken, Hanら、2010)。侵害受容におけるCGRPの役割に加えて、CGRPは、骨代謝に直接関与することもできる。CGRPシグナル伝達は、骨芽細胞の増殖および分化を刺激することにより、RANKLにより誘導される破骨細胞形成および骨吸収の抑制により、骨量を維持する(Han, Zhangら、2010; Wang, Shiら、2010)。

30

40

【0149】

腫瘍の血管形成および増殖。CGRP欠乏マウスでは、移植肺癌細胞の腫瘍の増殖および腫瘍関連の血管形成が著しく低下する。野生型マウスでは、CGRP(8~37)または除神経は癌細胞の増殖を抑制した。これらの結果は、CGRPが腫瘍関連の血管形成および腫瘍の増殖を促進することを示す。血管形成のCGRP依存性増大に関する下流の分子がVEGFであるという徴候がある(Toda, Suzukiら、2008)。ヒトでは、小細胞肺癌、前立腺癌、乳癌および甲状腺癌を含む特定の癌からの血漿および腫瘍の

50

両方においてCGRPの高度の発現が確認されている。前立腺癌では、血清CGRPは高悪性度の/高段階の疾患と関連した。RAMP1 mRNA発現が、良性の褐色細胞腫および悪性の褐色細胞腫、コロン腺腫および膵臓癌において検出されている(Hay, Walkerら、2011)。

【0150】

虚血により誘導される血管形成。虚血により、代償機構としての血管形成が誘導される。ラットの後肢(hind limb)の虚血組織においてCGRPレベルが増大し、CGRPのアデノウイルス過剰発現により虚血後肢における毛細管密度が増加した(Zheng, Liら、2010)。CGRP欠乏マウスは、実験的な後肢の虚血後に血流回復の低下および毛細管密度の減少を示した。ミニ浸透圧ポンプによるCGRP(8~37)の皮下注入により血管形成が遅延した(Mishima, Itoら、2011)。

10

【0151】

炎症。CGRPが炎症プロセスに直接影響を及ぼすという証拠がある。CGRPは、関節炎の動物モデルでは上方制御されている(Nohr, Schafferら、1999; Chen, Willcocksonら、2008)。多発性硬化症のモデルでは、CGRPが病原性T細胞応答を促進することが明らかになった(Mikami, Watanabeら、2012)。2型糖尿病の動物モデルではCGRPレベルの増大も観測された(Gram, Hansenら、2005; Tanaka, Shimayaraら、2011)。乾癬のマウスモデルでは、CGRP(8~37)によるCGRPの除神経または阻害により、CD4⁺細胞数および表皮肥厚の著しい減少がもたらされた(Ostrowski, Belkadiら、2011)。さらに、ヒト皮膚微小血管内皮細胞によるケモカイン産生をCGRPが阻害すること(Huang, Stohlら、2011)、およびアトピー性皮膚炎の患者由来のT細胞によるケモカイン産生をCGRPが調節したこと(Antunez, Torresら、2009)を明らかにしている研究により、皮膚炎症におけるCGRPの役割が示唆される。

20

【0152】

不安。CGRPの注入により、ラットにおいて、CGRP拮抗作用が不安の軽減に臨床上有用な方針であり得ることを示唆する不安様応答が引き起こされる。

【0153】

神経変性疾患。最近の研究により、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)の発病に不可欠であるアンドロゲン受容体の変異がCGRP発現の増大と関連すること、およびCGRP発現の抑制により臨床症状が軽減されることが明らかになった(Minamiyama, Katsunoら、2012)。

30

【0154】

嚢胞性繊維症(Xie, Fisherら、2011)、肥満細胞症(Maintz, Wardelmannら、2011)、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)(Zhang, Gongら、2012)、非びらん性胃食道逆流症(Xu, Liら、2012)を含む様々な他の疾患においてCGRPの病因的役割が示唆されている。

【0155】

さらなる実施形態では、薬剤は、さらなる薬学的活性作用物質を含む。そのようなさらなる薬学的活性化合物は、とりわけ、それだけに限定されないが、片頭痛、急性および慢性の疼痛の治療および/または予防用の化合物であり、化合物は、トリプタン、NSAID、オピオイド、N型電位開口型カルシウムチャネル遮断剤(ジコノチド)、抗うつ剤および抗てんかん剤を含む群から選択される。本発明による核酸分子によって本発明に従って対処され得る様々な適応症を仮定すれば、前記さらなる(1つまたは複数の)薬学的活性作用物質は、原理上、そのような疾患の治療および/または予防に適しているいずれか1つであり得ることが当業者に理解されるだろう。本発明による核酸分子は、特に薬剤として存在するまたは使用される場合、好ましくは、トリプタン、NSAID、オピオイド、N型電位開口型カルシウムチャネル遮断剤(ジコノチド)、抗うつ剤および抗てんかん剤であり、またはそれらと併用される。

40

50

【 0 1 5 6 】

あるいは、またはさらに、本発明による薬剤が、原理上、前記疾患の治療のための薬剤の使用に関連して開示されている疾患のいずれかの予防に使用されることは、本発明の範囲内である。したがって、すなわちそれぞれの疾患に対するそれぞれのマーカが当業者に知られている。好ましくは、それぞれのマーカはCGRPである。

【 0 1 5 7 】

本発明の薬剤の一実施形態では、そのような薬剤は、本明細書で開示されている疾患、特に本発明の薬剤が使用される疾患のいずれかに対する他の治療と組み合わせて使用するための薬剤である。

【 0 1 5 8 】

「併用療法」（または「共同療法」）は、特定の治療レジメンの一部としての本発明の薬剤および少なくとも第2の作用物質またはさらなる薬学的活性作用物質の投与を含み、その治療レジメンは、これらの治療作用物質、すなわち本発明の核酸分子および前記第2の作用物質またはさらなる作用物質の共同作用から有益な効果をもたらすことを意図している。併用の有益な効果には、それだけに限らないが、治療作用物質の併用から生じる薬物動態的または薬力学的な共同作用が含まれる。組合せにおけるこれらの治療作用物質の投与は、典型的には、規定された期間にわたって（選択された組合せに応じて通常は数分、数時間、数日または数週間）実施される。

【 0 1 5 9 】

「併用療法」は、別々の単独療法レジメンの一部としてのこれら2つ以上の治療作用物質の投与を包含することを意図し得るが、一般には意図していない。「併用療法」は、順次の、すなわち各治療作用物質が異なる時期に投与される形でのこれらの治療作用物質の投与、ならびに実質的に同時のこれらの治療作用物質、または少なくとも2つの治療作用物質の投与を含むことを意図している。実質的に同時の投与は、例えば、対象に、固定された比率の各治療作用物質を有する単一のカプセルを投与し、または治療作用物質それぞれについて単一のカプセルを複数投与することによって行なうことができ、まるで複数の単一カプセルが同時に投与されたように治療効果が得られるように、複数の単一カプセルが同時にまたは適時に投与される。

【 0 1 6 0 】

治療作用物質それぞれの順次または実質的に同時の投与は、それだけに限らないが、局所経路、経口経路、静脈内経路、筋内経路、および粘膜組織を介する直接吸収を含めた任意の適当な経路により実施することができる。治療作用物質は、同じ経路により投与することもでき、または異なる経路により投与することもできる。例えば、組合せの第1の治療作用物質を注射により投与することができ、一方で、その組合せの他の治療作用物質を局所投与することができる。

【 0 1 6 1 】

あるいは、例えば、全ての治療作用物質を局所投与することができ、または全ての治療作用物質を注射により投与することができる。「併用療法」は、他の生物学的または薬学的な活性成分とのさらなる組み合わせでの、上記に記載した治療作用物質の投与を含むこともできる。併用療法が非薬物治療をさらに含む場合、非薬物治療は、治療作用物質と非薬物治療の組合せの共同作用からの有益な効果が実現される限り、任意の適切な時期に行うことができる。例えば、適当な場合には、非薬物治療が治療作用物質の投与からおそらく数日または数週間でも時間的に隔てられているときでも有益な効果が依然として実現される。

【 0 1 6 2 】

上記の一般用語で概略を述べたように、原理上、当業者に知られている任意の形態で、本発明による薬剤を投与することができる。好ましい投与経路は全身投与であり、より好ましくは非経口投与により、好ましくは注射による。あるいは、薬剤を局所に投与することができる。他の投与経路は、筋内、腹腔内および皮下、経口、鼻内、気管内または肺を含み、効率を確保しつつ侵襲性が最も小さい投与経路が優先される。

10

20

30

40

50

【0163】

皮下、筋内または静脈内注射および注入に非経口投与が一般に使用される。さらに、非経口投与の1つの手法は、確実に一定レベルの投与量が維持されるようにし、当業者に周知である緩徐放出または持続性放出系の埋め込みを使用する。

【0164】

さらに、適切な鼻内用媒体、吸入剤の局所使用を介する鼻内の形態で、または当業者に周知の経皮的皮膚パッチの形態を使用する経皮経路を介して、本発明の好ましい薬剤を投与することができる。経皮送達系の形態で投与するために、その投与は、好ましくは、投与レジメン全体にわたって断続的ではなく連続的となる。他の好ましい局所製剤には、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、エアロゾルスプレー剤およびゲル剤が含まれる。

10

【0165】

本発明の方法に対して有利に反応することができる対象には、医学のおよび獣医学の対象が含まれ、一般に、ヒトおよびヒトの患者が含まれる。本発明の方法および手段が有用である他の対象の中には、ネコ、イヌ、大型動物、ニワトリなどの鳥類などがある。

【0166】

本発明の薬剤は、一般に、それだけに限らないが、薬学的に許容される媒質中に溶解または分散した本発明の核酸分子を含めた、治療に有効な量の(1つまたは複数の)活性構成成分を含む。薬学的に許容される媒質または担体には、ありとあらゆる溶媒、分散媒、被覆、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的活性物質についてのそのような媒質および作用剤の使用は当技術分野で周知である。本発明の薬剤中に補充的な活性成分を取り込むこともできる。

20

【0167】

さらなる態様では、本発明は医薬組成物に関する。そのような医薬組成物は、本発明による核酸分子の少なくとも1つおよび好ましくは薬学的に許容される結合剤を含む。そのような結合剤は、当技術分野で使用され、かつ/または知られている任意の結合剤でよい。より詳細には、そのような結合剤は、本明細書で開示されている薬剤の製造に関連して論じられる任意の結合剤であるが、それに制限されない。さらなる実施形態では、本発明の医薬組成物はさらなる薬学的活性作用物質を含む。

【0168】

本発明の薬剤および医薬組成物の調製は、本開示に照らして当業者に知られている。典型的には、そのような組成物は、液体の溶液もしくは懸濁液の注射剤として；注射前に液体で溶液もしくは懸濁液にするのに適した固体形態；経口投与用の錠剤もしくは他の固体として；徐放型カプセルとして；または点眼剤、クリーム剤、ローション剤、膏薬、吸入剤などを含めた現在使用されている任意の他の形態で調製することができる。手術現場において特定の領域を取り扱う外科医、内科医または医療従事者による、食塩水に基づく洗浄などの滅菌剤の使用も特に有用であり得る。微小デバイス、微小粒子またはスポンジを介して本発明の組成物を送達することもできる。

30

【0169】

処方時に、本発明の薬剤を、投与製剤に適合する手段で、および薬理的に有効であるような量で投与することができる。製剤は、上記に記載されている注射剤のタイプなどの様々な投与形態で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなども使用することができる。

40

【0170】

本発明の薬剤は、徐放および持続性放出錠剤またはカプセル、丸剤、粉末、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁液、シロップおよびエマルションのような経口剤形で投与することもできる。坐剤は、脂肪性のエマルションまたは懸濁液から調製すると有利である。

【0171】

本発明の医薬組成物または薬剤は、滅菌することができ、かつ/または保存剤、安定化剤、湿潤剤もしくは乳化剤、溶解促進剤、浸透圧を制御するための塩および/もしくは緩衝剤などのアジュバントを含有してよい。さらに、それらは他の治療的価値のある物質を

50

含有してもよい。組成物は、従来の混合、造粒、または被覆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% の活性成分を含む。

【0172】

液体の、特に注射可能な組成物は、例えば、溶解、分散などによって調製することができる。活性化合物を、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの薬学的に純粋な溶媒中に溶解し、またはそれと混合することによって、注射可能な溶液または懸濁液を形成する。さらに、注射前に液体で溶解するのに適した固体形態を製剤することができる。

【0173】

本発明の薬剤および核酸分子はそれぞれ、小型単層小胞、大型単層小胞や多層小胞などのリポソーム送達系の形態で投与することもできる。リポソームは、種々のリン脂質から形成することができ、コレステロール、ステアシルアミンまたはホスファチジルコリンを含有している。いくつかの実施形態では、脂質構成成分の薄膜が薬物の水溶液で水和されて薬物を被包する脂質層を形成するが、これは当業者に周知である。例えば、当技術分野で知られている方法を使用して構築された親油性化合物または非免疫原性の高分子量化合物との複合体として、核酸分子を提供することができる。さらに、リポソームは、その表面上に細胞傷害作用物質を標的化するためのそのような核酸分子と、内部に細胞死滅を仲介するための毒性試薬を有し得る。核酸結合複合体の例は、米国特許第 6,011,020 号に示されている。

10

【0174】

本発明の薬剤および核酸分子はそれぞれ、標的化可能な薬物担体である可溶性ポリマーと結合していてもよい。そのようなポリマーには、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピル-メタクリルアミド-フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換したポリエチレンオキシドポリリシンが含まれ得る。さらに、本発明の薬剤および核酸分子はそれぞれ、薬物の制御放出を実現するのに有用なあるクラスの生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸、ポリエプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレートおよびヒドロゲルの架橋または両親媒性ブロックコポリマーと結合していてもよい。

20

【0175】

所望の場合、投与する医薬組成物および薬剤はそれぞれ、湿潤または乳化剤、pH 緩衝化剤や、例えば酢酸ナトリウムやオレイン酸トリエタノールアミンなどの他の物質などの非毒性補助物質を少量含有してもよい。

30

【0176】

本発明の核酸分子および薬剤をそれぞれ利用する投与レジメンは、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別および医学的状态；治療する状態の重症度；投与経路；患者の腎および肝機能；ならびに使用する特定の Aptamer またはその塩を含めた種々のファクターに従って選択される。通常、技能を有する医師または獣医なら、状態の進行を予防し、それに対抗し、またはそれを停止するのに必要な薬物の有効量を容易に決定し処方することができる。

40

【0177】

本明細書で開示されている疾患のいずれかの治療において、本発明による核酸分子の有効な血漿レベルは、好ましくは 500 fM ~ 200 μM であり、好ましくは 1 nM ~ 20 μM、より好ましくは 5 nM ~ 20 μM であり、最も好ましくは 50 nM ~ 20 μM である。

【0178】

本発明の核酸分子および薬剤はそれぞれ、好ましくは、毎日 1 回の投与で、2 日もしくは 3 日に 1 回、毎週、2 週間に 1 回、毎月 1 回の投与でまたは 3 ヶ月に 1 回投与することができる。

【0179】

50

本明細書に記載されている本発明の薬剤が、本明細書に開示されている医薬組成物、好ましくは本発明の医薬組成物を構成することは、本発明の範囲内である。

【0180】

さらなる態様では、本発明は、そのような治療を必要とする対象の治療方法に関し、その方法は、薬学的活性量の本発明による核酸分子の投与を含む。一実施形態では、対象は疾患を患いまたはそのような疾患を発症するリスクがあり、疾患は、本明細書で開示されているもののいずれか、特に薬剤を製造するための本発明による核酸分子のいずれかの使用に関連して開示されている疾患のいずれかである。

【0181】

好ましくは本明細書において診断用物質または診断薬または診断手段は、CGRP、好ましくは本明細書に記載のCGRP、より好ましくは本明細書に記載の種々の障害および疾患に関連して本明細書に記載されているCGRPを直接または間接的に検出するのに適している。診断用物質は、本明細書に記載の障害および疾患それぞれのうちいずれかの検出および/または経過観察に適している。そのような検出は、本発明による核酸とCGRPの結合により可能である。そのような結合を直接または間接的に検出することができ得る。そのそれぞれの方法および手段は当業者に知られている。とりわけ、本発明による核酸分子は、本発明による核酸分子、好ましくはCGRPと結合している核酸分子の検出を可能にする標識を含んでよい。そのような標識は、好ましくは、放射性、酵素および蛍光標識を含む群から選択される。原理上、抗体について開発された全ての既知のアッセイを本発明による核酸分子に採用させることができ、標的結合抗体は本発明の標的結合核酸分子によって置き換えられる。標識のない標的結合抗体を使用する抗体アッセイでは、好ましくは、検出は、放射性、酵素および蛍光標識で修飾され、そのFc断片で標的結合抗体と結合する二次抗体によって行われる。核酸、好ましくは本発明による核酸分子の場合、核酸はそのような標識で修飾され、好ましくは、そのような標識はビオチン、Cy-3およびCy-5を含む群から選択され、そのような標識はそのような標識に対する抗体、例えば抗ビオチン抗体、抗Cy3抗体もしくは抗Cy5抗体によって検出され、または標識がビオチンである場合、その標識は、天然にビオチンと結合するストレプトアビジンまたはアビジンによって検出される。そのような抗体、ストレプトアビジンまたはアビジンが、好ましくは、それぞれの標識、(例えば二次抗体のような)放射性、酵素および蛍光標識で修飾され、その検出を可能にするシグナルを伝達する。

【0182】

さらなる実施形態では、本発明による核酸分子は、第2の検出手段によって検出または分析され、前記第2の検出手段は分子ビーコンである。分子ビーコンの方法は当業者に知られており、Mairalらによって報告されている(Mairalら、2008)。

【0183】

本発明による核酸分子を使用したCGRPの検出により、本明細書で定義されるCGRPの検出が特に可能となることが認められるであろう。

【0184】

CGRPの検出に関連して本発明の好ましい方法は、
 (a) CGRPの存在について試験する試料を提供するステップと、
 (b) 本発明による核酸分子を提供するステップと、
 (c) 好ましくは反応容器中で試料を核酸と反応させるステップと
 を含み、ステップ(b)の前にステップ(a)を行うことができ、または、ステップ(a)の前にステップ(b)を行うことができる。

【0185】

好ましい実施形態では、さらなるステップd)が提供され、これは、試料と核酸分子との反応の検出からなる。好ましくは、ステップb)の核酸分子は表面に固定化される。その表面は、反応チューブ、プレートのウェルなどの反応容器の表面でもよく、または例えばビーズなどそのような反応容器に入っているデバイスの表面でもよい。表面への核酸分子の固定化は、それだけに限らないが、非共有結合または共有結合による連結を含めた、

当業者に知られている任意の手段によって行うことができる。好ましくは、表面と核酸分子との共有化学結合を介して連結が確立される。しかし、本発明の核酸分子が表面に間接的に固定化されることも本発明の範囲内であり、そのような間接的固定化はさらなる構成成分または一对の相互作用パートナーの使用を伴う。そのようなさらなる構成成分は、好ましくは、相互作用パートナーとも称される固定化する核酸と特異的に相互作用し、したがって核酸分子と表面の結合を仲介する化合物である。相互作用パートナーは、好ましくは、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される。好ましくは、相互作用パートナーは抗体、より好ましくはモノクローナル抗体である。あるいは、相互作用パートナーは核酸、好ましくは機能的核酸である。より好ましくは、そのような機能的核酸は、アプタマー、スปีゲルマーおよび核酸と少なくとも部分的に相補的である核酸を含む群から選択される。さらなる代替の実施形態では、核酸と表面の結合は、多分割相互作用パートナーによって仲介される。そのような多分割相互作用パートナーは、好ましくは、一对の相互作用パートナー、または核酸分子に含まれもしくはそれに結合した第1のメンバーおよび表面に結合しもしくはそれに含まれる第2のメンバーからなる相互作用パートナーである。多分割相互作用パートナーは、好ましくは、ビオチンおよびアビジン、ビオチンおよびストレプトアビジン、ならびにビオチンおよびニュートラアビジンを含む相互作用パートナーの対の群から選択される。好ましくは、相互作用パートナーの対の第1のメンバーはビオチンである。

10

20

30

40

50

【0186】

そのような方法の好ましい結果は、CGRPと本発明の核酸分子との固定化された複合体の形成であり、より好ましくは前記複合体が検出される。複合体からCGRP部分が検出されることは、実施形態の範囲内である。

【0187】

この要求に従っているそれぞれの検出手段は、例えばCGRP/CGRPの(1つまたは複数の)一部に特異的な任意の検出手段である。特に好ましい検出手段は、核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む群から選択される検出手段であり、これらの生成は当業者に知られている。

【0188】

本発明によるCGRPの検出方法は、一実施形態において、好ましくはステップc)を行うのに使用されている反応容器から試料を除去することも含む。

【0189】

本発明の方法は、さらなる実施形態では、表面、好ましくは上記で定義した表面上にCGRPの相互作用パートナーを固定化するステップも含み、相互作用パートナーは、本明細書、好ましくはそのそれぞれの方法に関連して上記と同様に定義され、より好ましくはその種々の実施形態において核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む。この実施形態では、特に好ましい検出手段は本発明による核酸分子であり、そのような核酸は好ましくは標識されていてよく、または標識されていなくてもよい。そのような核酸分子が標識されている場合、核酸分子は直接または間接的に検出することができ得る。そのような検出は、第2の検出手段の使用を伴うこともあり、この手段は、好ましくは核酸、ポリペプチドおよびタンパク質を含む群からやはり選択される。そのような検出手段は、好ましくは、本発明による核酸分子に特異的である。より好ましい実施形態では、第2の検出手段は分子ビーコンである。核酸分子または第2の検出手段またはそれらの両方が、好ましい実施形態において検出標識を含んでもよい。検出標識は、好ましくは、ビオチン、プロモデオキシウリジン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識、UV標識、放射標識およびキレーター分子を含む群から選択される。あるいは、第2の検出手段は、好ましくは核酸分子に含有される、核酸分子に含まれる、または核酸分子に結合している検出標識と相互作用する。特に好ましい組合せは以下の通りである：

検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がビオチンに対する抗体であり、または
検出標識がビオチンであり、第2の検出手段がアビジンもしくはアビジン保有分子であり、または

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

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

検出標識がプロモデオキシウリジンであり、第2の検出手段がプロモデオキシウリジンに対する抗体であり、または

検出標識がジゴキシゲニンであり、第2の検出手段がジゴキシゲニンに対する抗体であり、または

検出標識がキレーターであり、第2の検出手段が放射性核種であり、前記検出標識は核酸分子に結合していることが好ましい。この種類の組合せが、核酸が表面に結合している実施形態にも適用可能であることが認められるはずである。そのような実施形態では、検出標識が、相互作用パートナーに結合していることが好ましい。

10

【0190】

最後に、第3の検出手段を使用して第2の検出手段が検出されることも本発明の範囲内であり、好ましくは、第3の検出手段は、酵素、より好ましくは第2の検出手段の検出において酵素反応を示す酵素であり、または、第3の検出手段は、放射線、より好ましくは、放射性核種により放射される放射線を検出するための手段である。好ましくは、第3の検出手段は、第2の検出手段を特異的に検出し、かつ/またはそれと相互作用している。

【0191】

また、CGRPの相互作用パートナーが表面上に固定化され、本発明による核酸分子が好ましくは相互作用パートナーとCGRPの間で形成された複合体に付加される実施形態では、反応から、より好ましくはステップc)および/またはd)が行われる反応容器から試料を除去することができる。

20

【0192】

一実施形態では、本発明による核酸分子は蛍光部分を含み、蛍光部分の蛍光は、核酸とCGRPとにより形成された複合体と、遊離CGRPとの間で異なる。

【0193】

さらなる実施形態では、核酸分子は、本発明による核酸分子の誘導体であり、核酸の誘導体は、アデノシンを置換するアデノシンの少なくとも1つの蛍光誘導体を含む。好ましい実施形態では、アデノシンの蛍光誘導体はエテノアデノシンである。

30

【0194】

さらなる実施形態では、本発明による核酸分子の誘導体およびCGRPからなる複合体は、蛍光を使用して検出される。

【0195】

その方法の実施形態では、ステップc)またはステップd)でシグナルが生じ、好ましくは、シグナルは試料中のCGRPの濃度と相関する。

【0196】

好ましい態様では、本発明の方法の一部であるアッセイを、構成成分が上記に記載の反応容器中に固定化され、ウェルが反応容器として働く96ウェルプレート中で実施することができる。

40

【0197】

薬物発見の出発物質として、本発明の核酸分子をさらに使用することができる。基本的に、2つの手法が考えられる。1つの手法は化合物ライブラリーのスクリーニングであり、そのような化合物ライブラリーは、好ましくは低分子量化合物ライブラリーである。一実施形態では、スクリーニングはハイスループットスクリーニングである。好ましくは、ハイスループットスクリーニングは、標的に基づくアッセイにおける化合物の迅速で効率のよい、試行錯誤による評価である。最も良い場合、分析は比色測定に基づいて行われる。それに関連して使用されるライブラリーは当業者に知られている。

【0198】

化合物ライブラリーのスクリーニングの場合では、当業者に知られている競合アッセイ

50

などを使用することによって、適当なCGRP類似体、CGRPアゴニストまたはCGRPアンタゴニストを同定することができる。そのような競合アッセイを以下のように設定することができる。本発明の核酸分子、好ましくは標的結合L-核酸であるスピーゲルマーを固相と結合させる。CGRP類似体を同定するために、標識CGRPをアッセイに加えることができる。潜在的な類似体はスピーゲルマーと結合するCGRP分子と競合し、このことは、それぞれの標識によって得られるシグナルの低下と同時に起こる。アゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングは、当業者に知られている細胞培養アッセイの使用を伴うことがある。

【0199】

本発明によるキットは、好ましくはCGRPの検出のため、核酸分子の少なくとも1つまたはいくつかを含んでよい。さらに、キットは、少なくとも1つまたはいくつかの陽性または陰性対照を含んでよい。陽性対照は、例えばCGRP、特に本発明の核酸分子が選択または結合するCGRPでよく、好ましくは、液体形態で存在する。陰性対照は、例えば、CGRPと類似する生物物理学的特性の観点から定義されるが、本発明の核酸分子によって認識されないペプチドでよい。さらに、前記キットは、1つまたはいくつかの緩衝液を含んでよい。種々の成分は、乾燥もしくは凍結乾燥形態でキット中に入っているもよく、または液体中に溶解しているもよい。キットは、1つまたはいくつかの容器を含んでもよく、その容器は1つまたはいくつかのキットの成分を含有してもよい。さらなる実施形態では、キットは、キットおよびその種々の成分の使用法についての情報を使用者に提供する使用説明または使用説明リーフレットを含む。

10

20

【0200】

本発明による核酸分子の薬学的なおよび生物分析的な測定は、ヒトまたは非ヒトの身体のいくつかの体液、組織および臓器における核酸分子の薬物動態および生物力学プロファイルの評価の基本である。そのような目的で、本明細書で開示されまたは当業者に知られている検出方法のいずれかを使用することができる。本発明のさらなる態様では、本発明による核酸分子を検出するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイが提供される。検出アッセイでは、捕捉プローブおよび検出プローブが使用される。捕捉プローブは第1の部分と相補的であり、本発明による核酸分子の第2の部分に対する検出プローブ。捕捉プローブは表面またはマトリックスに固定化される。検出プローブは、好ましくは、本明細書においてすでに記載されているように検出できるマーカ分子または標識を保有する。

30

【0201】

本発明による核酸分子の検出は、以下の通りに実施することができる：本発明による核酸分子を、その末端の1つで捕捉プローブと、その他の末端で検出プローブとハイブリダイズさせる。その後、非結合検出プローブを例えば1つまたはいくつかの洗浄ステップにより除去する。続いて、例えば、参照により本明細書に組み込まれるWO/2008/052774でより詳細な概略が述べられているように、好ましくは標識またはマーカ分子を保有する結合検出プローブの量を測定することができる。

【0202】

好ましくは本明細書において、治療という用語は、好ましい実施形態ではそれに加えてまたはその代わりに予防および/または経過観察を含む。

40

【0203】

好ましくは本明細書において、疾患および障害という用語は、そうでないと示さない場合は互換的に使用されるものとする。

【0204】

本明細書において、含む(comprise)という用語は、好ましくは、そのような用語の前にあるまたはそれによって述べられる内容を限定することを意図していない。

【0205】

種々の配列番号、本発明による核酸分子の化学的性質、および、その実際の配列ならびに内部参照番号が以下の表にまとめられている。

50

【表 1 A】

表1

配列番号	内部参照		配列
001	212-G1-001	L-RNA	CGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
002	226-F2-001	L-RNA	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
003	212-F1-001	L-RNA	CGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
004	224-B2-001	L-RNA	GCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
005	224-E1-001	L-RNA	GCAGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCUGC
006	226-A2-002	L-RNA	CGUGAUAUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
007	226-A3-001	L-RNA	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
008	226-G2-002	L-RNA	CGUGCAGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
009	226-C2-002	L-RNA	CGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
010	226-E1-002	L-RNA	CGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
011	226-F1-001	L-RNA	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
012	226-C3-001	L-RNA	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
013	231-A1-001	L-RNA	GUCAUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGGC
014	231-G2-001	L-RNA	GCCAUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCAUGGC
015	231-C1-001	L-RNA	GCCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGGC
016	231-C2-001	L-RNA	GCCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAAUAGGUCCCCUCCCCACGGC

10

20

30

40

【表 1 B】

配列番号	内部参照		配列
017	231-D1-001	L-RNA	GCCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGC
018	231-F1-001	L-RNA	GCCGUGCUGUCGGAGACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGC
019	231-E1-001	L-RNA	CCCUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGC
020	231-B3-001	L-RNA	CACCGUGCUGUCGGAAUACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGUG
021	231-A2-001	L-RNA	GGCCGUGCUGUCGGAGACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGCU
022	231-E2-001	L-RNA	CCCUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGC
023	231-H2-001	L-RNA	GCCGUGUUGUCGGAGACUACCCCGAGGUAAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGGC
024	226-F2-003	L-RNA	GCGUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGC
025	226-F2-004	L-RNA	GGGUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCCC
026	226-F2-005	L-RNA	GCCUGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGC
027	226-F2-001-D03	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CC <u>dg</u> UGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGG
028	226-F2-001-D05	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGU <u>dg</u> UGCUGUCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGG
029	226-F2-001-D08	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGC <u>dg</u> UGCUGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCGUCACCGG

10

20

30

40

【表 1 C】

配列番号	内部参照		配列
030	226-F2-001-D09	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUG <u>dT</u> CGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
031	226-F2-001-D14	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGG <u>AdG</u> ACUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
032	226-F2-001-D16	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAG <u>AdC</u> UACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
033	226-F2-001-D19	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACU <u>AdC</u> UACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
034	226-F2-001-D22	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUC <u>dG</u> UCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
035	226-F2-001-D23	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCG <u>dT</u> CGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
036	226-F2-001-D24	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dC</u> GAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
037	226-F2-001-D25	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dG</u> AGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
038	226-F2-001-D26	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dA</u> AGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
039	226-F2-001-D28	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dT</u> AGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
040	226-F2-001-D30	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dG</u> AAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
041	226-F2-001-D33	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dA</u> UAGGUCCCCUCCCACGG
042	226-F2-001-D34	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dT</u> AGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
043	226-F2-001-D37	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dG</u> UAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG
044	226-F2-001-D39	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCGU <u>dC</u> UAGAAAUAAGGUCCCCUCCCACGG

【表 1 D】

配列番号	内部参照		配列
045	226-F2-001-D41	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCC <u>dc</u> UCCCCACGG
046	226-F2-001-D42	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCC <u>dc</u> UCCCCACGG
047	226-F2-001-D44	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCCU <u>dc</u> CCCCACGG
048	226-F2-001-D45	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCC <u>dc</u> CCCCACGG
049	226-F2-001-D46	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>dc</u> CCCCACGG
050	226-F2-001-D47	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>da</u> CCCCACGG
051	226-F2-001-D48	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>dc</u> CCCCACGG
052	226-F2-001-D49	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>dc</u> CCCCACGG
053	226-F2-001-D50	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>dc</u> CCCCACGG
054	226-F2-001-D41/ D44	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCC <u>dc</u> CCCCACGG
055	212-G1-001	D-RNA	CGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCCUCCCCACG
056	226-F2-001	D-RNA	CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCCUCCCCACGG
057	212-F1-001	D-RNA	CGUGCUGUGGAGACUACUUGUUUAGUAGAUUAGGUUCCCCUCCCCACG
058	224-B2-001	D-RNA	GCGUGCUGUCGGAGACUACGCUUCGCGUAGAGAUAGGUCCCCUCCCCACGC
059	224-E1-001	D-RNA	GCAGCUGUCGGAGACUACCCGUCGGGAGAAAUAGGUCCCCUCCCCUCCG

10

20

30

40

【表 1 E】

配列番号	内部参照		配列
060	226-A2-002	D-RNA	CGUGAUUCCGGAGACUACUCGUGGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCG
061	226-A3-001	D-RNA	CCGUGCUGCCGGAGACUACUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
062	226-G2-002	D-RNA	CGUGCAGUCCGGAGACUACUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCG
063	226-C2-002	D-RNA	CGUGCUGCCGGAGACUACUCGAGUAGGAGUAAGGUCCCCUCCACCG
064	226-E1-002	D-RNA	CGUGCUGCCGGAGACUACUCGAGUAGAGUAAGGUCCCCUCCUACCG
065	226-F1-001	D-RNA	CCGUGCUGCCGGAGACUACUCGAGUAGAUUAGGUCCCCUCCACCGG
066	226-C3-001	D-RNA	CCGUGCUGCCGGAGACUACUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
067	231-A1-001	D-RNA	GUCAUGCUGCCGGAGACUACUCAUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
068	231-G2-001	D-RNA	GCCAUGCUGCCGGAGACUACUCAUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
069	231-C1-001	D-RNA	GCCGUGCUGCCGGAGACUACUCAUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
070	231-C2-001	D-RNA	GCCGUGCUGCCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
071	231-D1-001	D-RNA	GCCGUGCUGCCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
072	231-F1-001	D-RNA	GCCGUGCUGCCGGAGACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
073	231-E1-001	D-RNA	CCCGUGCUGCCGGAGACUACUCGUUGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
074	231-B3-001	D-RNA	CACCGUGCUGCCGGAGUACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG
075	231-A2-001	D-RNA	GGCCGUGCUGCCGGAGACUACUCGCCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCCACCGG

10

20

30

40

【表 1 F】

配列番号	内部参照		配列
076	231-E2-001	D-RNA	CCCGUGCUGCGGAGACUACUCGUAGGGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGG
077	231-H2-001	D-RNA	GCCGUGUUGUCGGAGACUACCCAGGGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGG
078	226-F2-001-D41-40kDa-PE G, NOX-L41	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDa-PEG- CCGUGCUGCGGAGACUACUCGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGG
079	226-F2-003	D-RNA	GCGUGCUGCGGAGACUACUCGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGC
080	226-F2-004	D-RNA	GGGUGCUGCGGAGACUACUCGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGC
081	226-F2-005	D-RNA	GCCUGCUGCGGAGACUACUCGUAGAAAUAGGUCCCCCACCACGGC
082	ヒトアルファ-CGRP、h-αCGRP 、アカゲザル由来のアルファCG RP	L-ペプチド	ACDTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKNFVPTNVGSKAF
083	ヒトベータ-CGRP	L-ペプチド	ACNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS FVPTNVGSKAF
084	ヒトアミリン、h-アミリン	L-ペプチド	KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILLS TNVGSNTY
085	ヒトカルシトニン	L-ペプチド	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHFPQTAIGVGAP
086	ヒトアドレノメデュリン	L-ペプチド	YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRSKISPQGY
087	ヒトインテルメジン	L-ペプチド	TQAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLMGPAGRQDSAPVDPSSPHSY

10

20

30

40

【表 1 G】

配列番号	内部参照		配列
088	226-F2-001-5'-40kDa-PEG	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	40kDa-PEG- CCGUCGUGCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCCUC CCACGG
089	ラット由来のアルファ-CGRP、マウス由来のα-CGRP	L-ペプチド	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKDNFVPTNVGSEAF
090		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAG <u>du</u> UAGAAAUAGGUCC <u>dc</u> CU <u>dc</u>
091	イノシン由来のアルファ-CGRP	L-ペプチド	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGMVKS NFVPTDVGSEAF
092	ヒツジ由来のアルファ-CGRP	L-ペプチド	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKSNFVPTNVGSQAF
093	イヌ由来のアルファ-CGRP	L-ペプチド	SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVKNNFVPTNVGSEAF
094	r-アミリン	L-ペプチド	KCNTATCATQRLANFLVRSNNFGAILSPNTNVGSNTY
095		L-RNA	HWRUYGGAKACUMMBYNYNRVKKRGADAUARRUYCCBUCC
096		L-RNA	CUGUYGGAGACUMMUBDYHRVKKAGADAUAGGUCCCCUCC
097		L-RNA	CUGUCGAGACUACUCRYHGRGUAGAAAUAGGUCCCCUCC
098		L-RNA	CUGUCGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCCCCUCC

10

20

30

40

配列番号	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	配列
099	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	<p>HWn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Yn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂Rn₁₃ADn₁₄n₁₅ARn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁</p> <p>n₁はRまたは<u>dg</u>であり、n₂はUまたは<u>dt</u>であり、n₃はKまたは<u>dg</u>であり、n₄はCまたは<u>dc</u>であり、n₅はMまたは<u>dc</u>であり、n₆はBまたは<u>du</u>であり、n₇はNまたは<u>dg</u>であり、n₈はYまたは<u>dt</u>であり、n₉はNまたは<u>dc</u>であり、n₁₀はRまたは<u>du</u>であり、n₁₁はVまたは<u>da</u>であり、n₁₂はKまたは<u>dt</u>であり、n₁₃はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₄はAまたは<u>da</u>であり、n₁₅はUまたは<u>dt</u>であり、n₁₆はRまたは<u>dg</u>であり、n₁₇はYまたは<u>dc</u>であり、n₁₈はCまたは<u>dc</u>であり、n₁₉はBまたは<u>dc</u>であり、n₂₀はCまたは<u>dc</u>であり、n₂₁はCまたは<u>dc</u>である</p>
100	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	<p>CUn₁n₂YGGAn₃An₄UMn₅n₆Bn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Kn₁₂An₁₃ADn₁₄n₁₅AGn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁</p> <p>n₁はGまたは<u>dg</u>であり、n₂はUまたは<u>dt</u>であり、n₃はGまたは<u>dg</u>であり、n₄はCまたは<u>dc</u>であり、n₅はMまたは<u>dc</u>であり、n₆はBまたは<u>du</u>であり、n₇はDまたは<u>dg</u>であり、n₈はYまたは<u>dt</u>であり、n₉はHまたは<u>dc</u>であり、n₁₀はRまたは<u>dg</u>であり、n₁₁はVまたは<u>da</u>であり、n₁₂はKまたは<u>dt</u>であり、n₁₃はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₄はAまたは<u>da</u>であり、n₁₅はUまたは<u>dt</u>であり、n₁₆はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₇はYまたは<u>dc</u>であり、n₁₈はCまたは<u>dc</u>であり、n₁₉はCまたは<u>dc</u>であり、n₂₀はCまたは<u>dc</u>であり、n₂₁はCまたは<u>dc</u>である</p>
101	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	<p>CUn₁n₂CGGAn₃An₄UAn₅n₆Cn₇n₈n₉n₁₀n₁₁Gn₁₂An₁₃AAn₁₄n₁₅AGn₁₆Un₁₇Cn₁₈n₁₉Un₂₀n₂₁</p> <p>n₁はGまたは<u>dg</u>であり、n₂はUまたは<u>dt</u>であり、n₃はGまたは<u>dg</u>であり、n₄はCまたは<u>dc</u>であり、n₅はCまたは<u>dc</u>であり、n₆はUまたは<u>du</u>であり、n₇はRまたは<u>dg</u>であり、n₈はYまたは<u>dt</u>であり、n₉はHまたは<u>dc</u>であり、n₁₀はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₁はRまたは<u>da</u>であり、n₁₂はUまたは<u>dt</u>であり、n₁₃はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₄はAまたは<u>da</u>であり、n₁₅はUまたは<u>dt</u>であり、n₁₆はGまたは<u>dg</u>であり、n₁₇はCまたは<u>dc</u>であり、n₁₈はCまたは<u>dc</u>であり、n₁₉はCまたは<u>dc</u>であり、n₂₀はCまたは<u>dc</u>であり、n₂₁はCまたは<u>dc</u>である</p>

【表 1 I】

配列番号	L-RNA/L-DNA	配列
102	L-RNA/L-DNA	CU n_1 n $_2$ CGGAN $_3$ An $_4$ UAAn $_5$ n $_6$ Cn $_7$ n $_8$ n $_9$ n $_10$ n $_11$ Gn $_12$ An $_13$ AAAn $_14$ n $_15$ AGN $_16$ Un $_17$ Cn $_18$ n $_19$ Un $_20$ n $_21$ n $_1$ はGまたはdgであり、n $_2$ はUまたはdtであり、n $_3$ はGまたはdgであり、n $_4$ はCまたはdcであり、n $_5$ はCまたはdcであり、n $_6$ はUまたはduであり、n $_7$ はGまたはdgであり、n $_8$ はAまたはdaであり、n $_9$ はGまたはdcであり、n $_10$ はGまたはdgであり、n $_11$ はAまたはdaであり、n $_12$ はUまたはdtであり、n $_13$ はGまたはdgであり、n $_14$ はAまたはdaであり、n $_15$ はUまたはdtであり、n $_16$ はGまたはdcであり、n $_17$ はCまたはdcであり、n $_18$ はCまたはdcであり、n $_19$ はCまたはdcであり、n $_20$ はCまたはdcであり、n $_21$ はCまたはdcである
103	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
104	L-RNA/L-DNA	CUGdtCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
105	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAdgACUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
106	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGAdcUACUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
107	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUAdcUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
108	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCdggUCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
109	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGdtCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
110	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUdCGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
111	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCdGAGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
112	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCGdaGUAGAAAUAAGGUCCCCUCC
113	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdtAGAAAUAAGGUCCCCUCC
114	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAdgAAAUAAGGUCCCCUCC
115	L-RNA/L-DNA	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAdaUAAGGUCCCCUCC

【表 1 J】

配列番号	内部参照		配列
116		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>dTAGGU</u> CCCCUCC
117		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGdgU</u> CCCCUCC
118		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
119		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
120		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
121		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
122		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
123		L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCUCC
124	226-F2-001-D41-dU20	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG
125	226-F2-001-D41-dU28	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCCGUCGAG <u>du</u> AGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG
126	226-F2-001-D41-dU20-28	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAG <u>du</u> AGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG
127	226-F2-001-D41/D44-dU20	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG
128	226-F2-001-D41/D44-dU28	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUACUCCGUCGAG <u>du</u> AGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG
129	226-F2-001-D41/D44-dU20-28	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CCGUGCUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAG <u>du</u> AGAAA <u>UAGGUdCC</u> CCCCACGG

10

20

30

40

【表 1 K】

配列番号	内部参照	配列
130	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUCC<u>dc</u>CUCC</u>
131	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAG <u>du</u> VAGAAA <u>UAGGUCC<u>dc</u>CUCC</u>
132	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAG <u>du</u> VAGAAA <u>UAGGUCC<u>dc</u>CUCC</u>
133	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUAC <u>du</u> CGUCGAGUAGAAA <u>UAGGUCC<u>dc</u>CUCC</u>
134	L-RNA/ <u>L-DNA</u>	CUGUCGGAGACUACUCGUCGAG <u>du</u> VAGAAA <u>UAGGUCC<u>dc</u>CUCC</u>
135	L-RNA	5' - 40kDa - PEG - GGA CUGAUGGCGGGUCCUAUUACGCCCGAUGGGUGAGGGGA

10

20

30

40

それからさらなる特徴、実施形態および利点を得ることができる図面、実施例および配列表によって、本発明をさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1A-1B】本発明のCGRP結合核酸分子の配列のアラインメントおよび競合的結合アッセイにおけるヒトアルファCGRPに対する相対活性を示す。

【図2】異なる第1のおよび第2の末端ストレッチを有するCGRP結合核酸分子226-F2-001の誘導体を示す。

【図3A-3D】表面プラズモン共鳴測定により決定した K_D 値およびヒトアルファCGRPに対する相対結合活性を含む、CGRP結合核酸分子226-F2-001の誘導体を示す。

【図4】固定化されたヒトアルファCGRPに対するCGRP結合スピーゲルマー226-F2-001および226-F2-001-D41のBiacore測定による動態評価を示す図であり、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、1.95および0nMのスピーゲルマー226-F2-001および226-F2-001-D41に関するデータを応答単位として示す。

【図5】固定化されたヒトアルファCGRPに対するCGRP結合スピーゲルマー226-F2-001および226-F2-001-D44のBiacore測定による動態評価を示す図であり、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、1.95および0nMのスピーゲルマー226-F2-001および226-F2-001-D44に関するデータを応答単位として示す。

【図6】固定化されたヒトアルファCGRPに対するCGRP結合スピーゲルマー226-F2-001-D41および226-F2-001-D41/44のBiacore測定による動態評価を示す図であり、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、1.95および0nMのスピーゲルマー226-F2-001-D41および226-F2-001-D41/44に関するデータを応答単位として示す。

【図7A】CGRP結合スピーゲルマー212-G1-001（黒ひし形）および226-F2-001（黒丸）による、ヒトアルファCGRPにより誘導されるcAMP産生の阻害を示す図であり、a) ウェル当たりのcAMPの生成量を各データセットの最大値に正規化し、スピーゲルマー濃度に対する百分率活性として示し、b) Prism5ソフトウェアによる非線形回帰（4パラメータフィット）を使用して、cAMP産生が50%阻害されるスピーゲルマー濃度（ IC_{50} ）を算出し、c) 212-G1-001および226-F2-001に関して決定した IC_{50} 値はそれぞれ8.7nMおよび3.5nMであった。

【図7B】CGRP結合スピーゲルマー226-F2-001-5'40kDa-PEG（黒丸）およびNOX-L41（226-F2-001-D41-5'40kDa-PEGとも称される、黒四角）による、ヒトCGRPにより誘導されるcAMP産生の阻害を示す図であり、a) ウェル当たりのcAMPの生成量を各データセットの最大値に正規化し、スピーゲルマー濃度に対する百分率活性として示し、b) Prism5ソフトウェアによる非線形回帰（4パラメータフィット）を使用して、cAMP産生が50%阻害されるスピーゲルマー濃度（ IC_{50} ）を算出し、c) 226-F2-001-5'40kDa-PEGおよびNOX-L41に関して決定した IC_{50} 値はそれぞれ3.8nMおよび0.39nMであった。

【図8A】ヒトアルファCGRP、ヒトベータCGRP、ヒトアミリン、ヒトカルシトニン、ヒトアドレノメデュリンおよびヒトインテルメジンのアミノ酸配列アラインメントを示す。

【図8B】ヒト、アカゲザル、ラット、マウス、イノシシ、ヒツジおよびイヌ由来のアルファCGRPのアミノ酸配列アラインメントを示す。

【図9】ヒトおよびラットのCGRPならびにヒトおよびラットのアミリンのアミノ酸配

10

20

30

40

50

列アラインメントを示し、CGRP結合スピーゲルマーNOX-L41(226-F2-001-D41-5'40kDa-PEGとも称される)および226-F2-001-D41に関して、IC₅₀値をヒトCGRP受容体によるインビトロアッセイで決定し、解離定数K_Dを動的Biacore測定に決定した。

【図10】CGRP結合スピーゲルマーNOX-L41(226-F2-001-D41-5'40kDa-PEGとも称される、黒四角)およびアミリン結合対照スピーゲルマー(黒三角)による、ヒトアミリンにより誘導されるcAMP産生の阻害を示す図であり、ウェル当たりのcAMPの生成量を各データセットの最大値に正規化し、スピーゲルマー濃度に対する百分率活性として示した。

【図11A-11B】本発明による核酸分子を構成する2'デオキシリボヌクレオチドを示す。

【図12】本発明による核酸分子を構成するリボヌクレオチドを示す。

【図13】固定化されたヒトCGRPに対するCGRP結合スピーゲルマー226-F2-001-D41、226-F2-001-D41-dU20および226-F2-001-D41-dU28のBiacore測定による動態評価を示す図であり、500-250-125-62.5-31.3-15.6-7.8(2x)-3.9-1.95-0.98-0.48-0nMのスピーゲルマー226-F2-001-D41、226-F2-001-D41-dU20および226-F2-001-D41-dU28に関するデータを応答単位として示す。

【実施例】

【0208】

[実施例1：CGRPに特異的に結合することができる核酸分子]

いくつかのCGRP結合核酸分子およびそれらの誘導体を同定し、それらのヌクレオチド配列を図1～図3に示す。CGRP結合核酸分子のヒトアルファCGRPに対する結合親和性およびヒトアルファCGRPとCGRP受容体との相互作用に関するそれらの拮抗作用を、

a)比較競合的プルダウンアッセイ(comparative competition pull-down assay)(実施例3)を使用してアプタマー、即ちD-核酸分子として、

b)表面プラズモン共鳴測定(実施例4)により、およびヒトCGRP受容体を発現する細胞によるインビトロアッセイ(実施例5)により、スピーゲルマー、即ちL-核酸として特徴付けた。

【0209】

スピーゲルマーおよびアプタマーを実施例2に記載されるように合成した。

【0210】

このように作製した核酸分子はわずかに異なる配列を示し、配列を配列ファミリーとして集約するまたは分類することができる。

【0211】

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

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

10

20

30

40

50

N 全て A または G または C または U。

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

2' - デオキシリボヌクレオチドに関して：d G、d C、d T、d A および d U (図 1 A および 1 B を参照)。

リボヌクレオチドに関して：G、C、T、U (図 1 2 を参照)。

【 0 2 1 2 】

反対に示されない場合、任意の核酸配列またはストレッチおよびボックスの配列は、それぞれ 5' 3' の方向で示す。

【 0 2 1 3 】

図 1 ~ 3 に示すように、CGRP 結合核酸分子は、潜在的 CGRP 結合モチーフを定義するヌクレオチドの 1 つの中心ストレッチを含み、図 1 (図 1 A および 1 B) は配列ファミリーの様々な配列を示し、図 2 ~ 3 は核酸分子 2 2 6 - F 2 - 0 0 1 の誘導体を示す。

【 0 2 1 4 】

一般に、CGRP 結合核酸分子は、それらの 5' 末端および 3' 末端において、ヌクレオチドの末端ストレッチである、ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチおよびヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチを含む。ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチおよびヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは互いにハイブリダイズでき、ハイブリダイゼーション後に二本鎖構造が形成される。しかしながら、このようなハイブリダイゼーションは、インピボ および / またはインピトロの分子内に必ずしも与えられるわけではない。

【 0 2 1 5 】

CGRP 結合核酸分子のヌクレオチドの 3 つのストレッチであるヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは、5' 3' の方向で、即ちヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチ - ニュクレオチドの中心ストレッチ - ニュクレオチドの第 2 の末端ストレッチで互いに配列されている。しかし、あるいは、ヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチ、ヌクレオチドの中心ストレッチおよびヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチは、5' 3' の方向で、即ちヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチ - ニュクレオチドの中心ストレッチ - ニュクレオチドの第 1 の末端ストレッチで互いに配列されている。

【 0 2 1 6 】

定義されたストレッチの配列は、CGRP、好ましくはヒトアルファ CGRP に対する結合親和性に影響を与える CGRP 結合核酸分子の間で異なってもよい。異なる CGRP 結合核酸分子の結合分析に基づいて、以下に記載するようにヌクレオチドの中心ストレッチおよびそのヌクレオチド配列は、個々に、より好ましくはその全体が CGRP、好ましくはヒトアルファ CGRP との結合に不可欠である。

【 0 2 1 7 】

図 1 A および 1 B に示す本発明による CGRP 結合核酸分子は、リボヌクレオチドからなる。CGRP 結合核酸分子 2 1 2 - G 1 - 0 0 1 は、ヒトアルファ CGRP に関する 5 . 1 2 n M の K_D の結合親和性を有する (プラズモン共鳴測定による決定、実施例 4 を参照)。CGRP 結合核酸分子 2 2 6 - F 2 - 0 0 1、2 1 2 - F 1 - 0 0 1、2 2 4 - B 2 - 0 0 1、2 2 4 - E 1 - 0 0 1、2 2 6 - A 2 - 0 0 2、2 2 6 - A 3 - 0 0 1、2 2 6 - G 2 - 0 0 2、2 2 6 - G 1 - 0 0 2、2 2 6 - C 2 - 0 0 2、2 2 6 - E 1 - 0 0 2、2 2 6 - F 1 - 0 0 1、2 2 6 - C 3 - 0 0 1、2 3 1 - A 1 - 0 0 1、2 3 1 - G 2 - 0 0 1、2 3 1 - C 1 - 0 0 1、2 3 1 - C 2 - 0 0 1、2 3 1 - D 1 - 0 0 1、2 3 1 - F 1 - 0 0 1、2 3 1 - E 1 - 0 0 1、2 3 1 - B 3 - 0 0 1、2 3 1 - A 2 - 0 0 1、2 3 1 - E 2 - 0 0 1 および 2 3 1 - H 2 - 0 0 1 を、ヒトアルファ CGRP に結合するそれらの能力に関して、CGRP 結合核酸 2 1 2 - G 1 - 0 0 1 に対する比較競合的プルダウンアッセイで試験した (実施例 3、図 1 A および 1 B を参照)。

【 0 2 1 8 】

CGRP 結合核酸分子 2 2 6 - F 2 - 0 0 1、2 2 6 - A 3 - 0 0 1、2 2 6 - C 3 -

10

20

30

40

50

001、231-A1-001、231-C1-001、231-C2-001、231-F1-001、231-E1-001、231-A2-001および231-E2-001は、212-G1-001よりも良好な結合親和性を示した。CGRP結合核酸分子212-F1-001、224-B2-001、224-E1-001および226-F1-001は、212-G1-001と同様の結合親和性を示した。CGRP結合核酸分子226-A2-002、226-G2-002、226-C2-002、226-E1-002、231-G2-001、231-D1-001、231-B3-001および231-H2-001は、212-G1-001よりも弱い結合親和性を示した(図1Aおよび1Bを参照)。

【0219】

CGRP結合核酸分子212-G1-001、226-F2-001、212-F1-001、224-B2-001、224-E1-001、226-A2-002、226-A3-001、226-G2-002、226-C2-002、226-E1-002、226-F1-001、226-C3-001、231-A1-001、231-G2-001、231-C1-001、231-C2-001、231-D1-001、231-F1-001、231-E1-001、231-B3-001、231-A2-001、231-E2-001および231-H2-001はリボヌクレオチドからなり、配列

5' HWRUYGGAKACUMMBYNYNRVKKRGADAUARRUYYCCBU
CC 3' [配列番号95]

を共有する。

【0220】

CGRP結合核酸分子226-F2-001、212-F1-001、224-B2-001、224-E1-001、226-A3-001、226-F1-001、226-C3-001、231-A1-001、231-C1-001、231-C2-001、231-F1-001、231-E1-001、231-A2-001および231-E2-001は、ヒトアルファCGRPに対して212-G1-001と同様のまたは212-G1-001よりも良好の結合親和性を示し、配列

5' CUGUYGGAGACUMMUBDYHRVKKAGADAUAAGGUYCCCU
CC 3' [配列番号96]

を共有する。

【0221】

CGRP結合核酸分子226-F2-001、226-A3-001、226-C3-001、231-A1-001、231-C1-001、231-C2-001、231-F1-001、231-E1-001、231-A2-001および231-E2-001は、ヒトアルファCGRPに対する最大の結合親和性を示し、配列

5' CUGUCGGAGACUACUCRYHGRGUAGAAUAAGGUCCCCU
CC 3' [配列番号97]

を共有し、配列

5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAUAAGGUCCCCU
CC 3' [配列番号98]

がその好ましい実施形態である。

【0222】

本発明者らは、驚くべきことに、ヌクレオチドの中心ストレッチならびにヌクレオチドの第1のおよび第2の末端ストレッチの配列内において2'-デオキシリボヌクレオチドによりリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP結合核酸分子226-F2-001のヒトアルファCGRPに対する結合親和性が向上することを発見した。特に、CGRP結合核酸分子226-F2-001中において2'-デオキシリボヌクレオチドにより2つ以下のリボヌクレオチドを置き換えることにより、プラズモン共鳴測定により決定したヒトアルファCGRPに対する結合親和性の向上がもたらされた(プロトコルに関

10

20

30

40

50

して実施例 4 を参照)。より詳細には、本発明者らは、驚くべきことに以下のことを発見した。

a) CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 のヌクレオチドの中心ストレッチ中の 3、4、9、11、14、15、17、18、19、20、21、23、25、28、29、32、34、36、37、39 および 40 位において、1 つの 2' - デオキシリボヌクレオチドにより 1 つのリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 の結合親和性と比較してヒト CGRP に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 A、3 B、3 C および 3 D を参照; スピーゲルマー 226 - F2 - 001 - D08、226 - F2 - 001 - D09、226 - F2 - 001 - D14、226 - F2 - 001 - D16、226 - F2 - 001 - D19、226 - F2 - 001 - D22、226 - F2 - 001 - D23、226 - F2 - 001 - D24、226 - F2 - 001 - D25、226 - F2 - 001 - D26、226 - F2 - 001 - D28、226 - F2 - 001 - D30、226 - F2 - 001 - D33、226 - F2 - 001 - D34、226 - F2 - 001 - D37、226 - F2 - 001 - D39、226 - F2 - 001 - D41、226 - F2 - 001 - D42、226 - F2 - 001 - D44、226 - F2 - 001 - D45、226 - F2 - 001 - dU - 20 および 226 - F2 - 001 - dU - 28);

10

b) CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 のヌクレオチドの第 1 の末端ストレッチ中の 3 または 5 位において、1 つの 2' - デオキシリボヌクレオチドにより 1 つのリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 の結合親和性と比較してヒト CGRP に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 A を参照; スピーゲルマー 226 - F2 - 001 - D03 および 226 - F2 - 011 - D05);

20

c) CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 のヌクレオチドの第 2 の末端ストレッチ中の任意の位置において、1 つの 2' - デオキシリボヌクレオチドにより 1 つのリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 の結合親和性と比較してヒト CGRP に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 A および 3 C を参照; スピーゲルマー 226 - F2 - 001 - D46、226 - F2 - 001 - D47、226 - F2 - 001 - D48、226 - F2 - 001 - D49、226 - F2 - 001 - D50);

30

d) CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 のヌクレオチドの中心ストレッチ中の 36 および 39 位、または 36 および 15 位、または 36 および 23 位において、2 つの 2' - デオキシリボヌクレオチドにより 2 つのリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 の結合親和性と比較してヒト CGRP に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 A、3 C および 3 D を参照; スピーゲルマー 226 - F2 - 001 - D41 / 44、226 - F2 - 001 - D41 - dU - 20 および 226 - F2 - 001 - D41 - dU28);

e) CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 のヌクレオチドの中心ストレッチ中の 36、39 および 15 位、または 36、39 および 23 位において、3 つの 2' - デオキシリボヌクレオチドにより 3 つのリボヌクレオチドを置き換えることにより、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001 の結合親和性と比較してヒト CGRP に対する結合親和性の向上がもたらされた (図 3 D を参照; スピーゲルマー 226 - F2 - 001 - D41 / D44 - dU20、226 - F2 - 001 - D41 / D44 - dU28)。

40

【0223】

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

5' HW_{n₁} n₂ Y G G A n₃ A n₄ U M n₅ n₆ Y n₇ n₈ n₉ n₁₀ n₁₁ K n₁₂
R n₁₃ A D n₁₄ n₁₅ A R n₁₆ U n₁₇ C n₁₈ n₁₉ U n₂₀ n₂₁ 3' [配

50

列番号 99]

式中、H、W、Y、G、A、U、M、B、K、R、D、C はリボヌクレオチドであり、
 n_1 は R または dG であり、 n_2 は U または dT であり、 n_3 は K または dG であり、 n_4 は C または dC であり、 n_5 は M または dC であり、 n_6 は B または dU であり、 n_7 は N または dG であり、 n_8 は Y または dT であり、 n_9 は N または dC であり、 n_{10} は R または dG であり、 n_{11} は V または dA であり、 n_{12} は K または dT または dU であり、 n_{13} は G または dG であり、 n_{14} は A または dA であり、 n_{15} は U または dT であり、 n_{16} は R または dG であり、 n_{17} は Y または dC であり、 n_{18} は C または dC であり、 n_{19} は B または dC であり、 n_{20} は C または dC であり、 n_{21} は C または dC であり、

dG、dT、dC、dA および dU は 2' - デオキシリボヌクレオチドである
 に集約することができる。

【0224】

一般式

5' C U n_1 n_2 Y G G A n_3 A n_4 U M n_5 n_6 B n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} K n_{12}
 A n_{13} A D n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配
 列番号 100]

は、CGRP 結合核酸分子 226 - F2 - 001、およびヒトアルファ CGRP に対して
 212 - G1 - 001 と同様のまたは 212 - G1 - 001 よりも良好の結合親和性を示
 した、226 - F2 - 001 の誘導体 212 - F1 - 001、224 - B2 - 001、2
 24 - E1 - 001、226 - A3 - 001、226 - F1 - 001、226 - C3 - 0
 01、231 - A1 - 001、231 - C1 - 001、231 - C2 - 001、231 -
 F1 - 001、231 - E1 - 001、231 - A2 - 00 および 231 - E2 - 001
 の中心ストレッチの配列を集約し、

式中、C、U、Y、G、A、M、B、Y、H、K、D、R および V はリボヌクレオチドで
 あり、

n_1 は G または dG であり、 n_2 は U または dT であり、 n_3 は G または dG であり、 n_4 は C または dC であり、 n_5 は M または dC であり、 n_6 は B または dU であり、 n_7 は D または dG であり、 n_8 は Y または dT であり、 n_9 は H または dC であり、 n_{10} は R または dG であり、 n_{11} は V または dA であり、 n_{12} は K または dT または dU であり、 n_{13} は G または dG であり、 n_{14} は A または dA であり、 n_{15} は U または dT であり、 n_{16} は G または dG であり、 n_{17} は Y または dC であり、 n_{18} は C または dC であり、 n_{19} は C または dC であり、 n_{20} は C または dC であり、 n_{21} は C または dC であり、

dG、dT、dC、dA および dU は 2' - デオキシリボヌクレオチドである。

【0225】

一般式

5' C U n_1 n_2 C G G A n_3 A n_4 U A n_5 n_6 C n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} G n_{12}
 A n_{13} A A n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配
 列番号 101]

は、CGRP に関する結合親和性が最大である CGRP 結合核酸分子 (スピーゲルマー 2
 26 - F2 - 001 およびその誘導体、ならびにスピーゲルマー 226 - A3 - 001、
 226 - C3 - 001、231 - A1 - 001、231 - C1 - 001、231 - C2 -
 001、231 - F1 - 001、231 - E1 - 001、231 - A2 - 001 および 2
 31 - E2 - 001) の中心ストレッチの配列を集約し、

式中、C、U、Y、G、A、H および R はリボヌクレオチドであり、

n_1 は G または dG であり、 n_2 は U または dT であり、 n_3 は G または dG であり、 n_4 は C または dC であり、 n_5 は C または dC であり、 n_6 は U または dU であり、 n_7 は R または dG であり、 n_8 は Y または dT であり、 n_9 は H または dC であり、 n_{10} は G または dG であり、 n_{11} は R または dA であり、 n_{12} は U または dT または dU

10

20

30

40

50

であり、 n_{13} は G または d G であり、 n_{14} は A または d A であり、 n_{15} は U または d T であり、 n_{16} は G または d G であり、 n_{17} は C または d C であり、 n_{18} は C または d C であり、 n_{19} は C または d C であり、 n_{20} は C または d C であり、 n_{21} は C または d C であり、

d G、d T、d C、d A および d U は 2' - デオキシリボヌクレオチドである。

【0226】

CGRP 結合核酸 226 - F2 - 001、およびヌクレオチドの中心ストレッチのいつかの位置における 2' - デオキシリボヌクレオチドによるリボヌクレオチドの置き換えに起因して、226 - F2 - 001 と比較して CGRP に対する結合の向上を示す 226 - F2 - 001 の誘導体のヌクレオチドの中心ストレッチを以下の一般式：

5' C U n_1 n_2 C G G A n_3 A n_4 U A n_5 n_6 C n_7 n_8 n_9 n_{10} n_{11} G n_{12} A n_{13} A A n_{14} n_{15} A G n_{16} U n_{17} C n_{18} n_{19} U n_{20} n_{21} 3' [配列番号 102]

に集約することができ、

式中、C、U、G、A はリボヌクレオチドであり、

n_1 は G または d G であり、 n_2 は U または d T であり、 n_3 は G または d G であり、 n_4 は C または d C であり、 n_5 は C または d C であり、 n_6 は U または d U であり、 n_7 は G または d G であり、 n_8 は U または d T であり、 n_9 は C または d C であり、 n_{10} は G または d G であり、 n_{11} は A または d A であり、 n_{12} は U または d T または d U であり、 n_{13} は G または d G であり、 n_{14} は A または d A であり、 n_{15} は U または d T であり、 n_{16} は G または d G であり、 n_{17} は C または d C であり、 n_{18} は C または d C であり、 n_{19} は C または d C であり、 n_{20} は C または d C であり、 n_{21} は C または d C であり、

d G、d T、d C、d A および d U は 2' - デオキシリボヌクレオチドである

好ましい実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは配列

10

20

【化 3 A】

- (1) 5' CUdGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号103]、
- (2) 5' CUGdTCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号104]、
- (3) 5' CUGUCGGAGdGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号105]、
- (4) 5' CUGUCGGAGAGdCUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号106]、
- (5) 5' CUGUCGGAGACUAdCUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号107]、
- (6) 5' CUGUCGGAGACUACUCdGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号108]、
- (7) 5' CUGUCGGAGACUACUCGdTCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号109]、
- (8) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUdCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号110]、
- (9) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCdGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCC 3' [配列番号111]、
- (10) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGdAGUAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号112]、
- (11) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdTAGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号113]、
- (12) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAdGAAAUA
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号114]、
- (13) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAdAU
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号115]、
- (14) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAdT
AGGUCCCCUCC 3' [配列番号116]、
- (15) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GdGUCCCCUCC 3' [配列番号117]、
- (16) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUdCCCCCUCC 3' [配列番号118]、
- (17) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCUCC 3' [配列番号119]、
- (18) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCdCUCC 3' [配列番号120]、
- (19) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUdCC 3' [配列番号121]、
- (20) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCCCUCdC 3' [配列番号122]、
- (21) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUA
GGUCCdCCdCC 3' [配列番号123]、
- (22) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAAUA
AGGUCCdCUCC 3' [配列番号130]、

10

20

30

40

【化3B】

(23) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAU
AGGUCCdCCUCC 3' [配列番号131]、
 (24) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUCC 3' [配列番号132]、
 (25) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGUAGAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号133]、
 (26) 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAU
AGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号134]、
 (27) 5' CUGUCGGAGACUACdUCGUCGAGdUAGAAA
UAGGUCCdCCUdCC 3' [配列番号90]

10

を含み、より好ましい実施形態では、ヌクレオチドの中心ストレッチは配列

【化4】

5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCC
dCCUCC 3' (Spiegelmer 226-F2-001-D41を参
照のこと、[配列番号119])、または
 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUAGAAAUAGGUCC
dCCUdCC 3' (Spiegelmer 226-F2-001-D41/
44を参照のこと、[配列番号123])、または
 5' CUGUCGGAGACUACUCGUCGAGdUAGAAAUAGGUC
CdCCUCC 3' (Spiegelmer 226-F2-001-D41-
dU28を参照のこと、[配列番号131])

20

を含む。

【0227】

本発明のCGRP結合核酸分子の第1のおよび第2の末端ストレッチは、4つ、5つ、
6つ、または7つのヌクレオチドを含み(図1~3)、ストレッチは任意選択で互いにハ
イブリダイズし、ハイブリダイゼーション時に二本鎖構造が形成される。この二本鎖構造
は1~7つの塩基対からなり得る。しかし、このようなハイブリダイゼーションはインピ
ボおよびインピトロで分子内に必ずしも与えられるわけではない。

30

【0228】

試験した全てのCGRP結合核酸分子のヌクレオチドの第1の末端ストレッチおよびヌ
クレオチドの第2の末端ストレッチの分析から、ヌクレオチドの第1の末端ストレッチの
一般式は5' Z₁Z₂Z₃SZ₄WZ₅ 3' であり、ヌクレオチドの第2の末端ストレ
ッチの一般式は5' Z₆Z₇Z₈Z₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂ 3' であり、
 式中、

Z₁はSまたは不在であり、Z₂はVまたは不在であり、Z₃はBまたは不在であり、Z
4はVまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はYまたはdCであり、Z₇
はWまたはdAであり、Z₈はBまたはdCであり、Z₉はSまたはdGであり、Z₁₀
はSまたはdGまたは不在であり、Z₁₁はBまたは不在であり、Z₁₂はKまたは不在
であり、

40

S、W、V、B、YおよびKはリボヌクレオチドであり、
dG、dCおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、
好ましい実施形態では、

a) Z₁はSであり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり、
Z₁₁はBであり、Z₁₂はKであり、

b) Z₁は不在であり、Z₂はVであり、Z₃はBであり、Z₁₀はSまたはdGであり
、Z₁₁はBであり、Z₁₂はKであり、

50

- c) Z_1 は S であり、 Z_2 は V であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は B であり、 Z_{12} は不在であり、
- d) Z_1 は不在であり、 Z_2 は V であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は B であり、 Z_{12} は不在であり、
- e) Z_1 は不在であり、 Z_2 は不在であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は B であり、 Z_{12} は不在であり、
- f) Z_1 は不在であり、 Z_2 は V であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は不在であり、 Z_{12} は不在であり、
- g) Z_1 は不在であり、 Z_2 は不在であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は不在であり、 Z_{12} は不在であり、
- h) Z_1 は不在であり、 Z_2 は不在であり、 Z_3 は不在であり、 Z_{10} は S または d G であり、 Z_{11} は不在であり、 Z_{12} は不在であり、
- i) Z_1 は不在であり、 Z_2 は不在であり、 Z_3 は B であり、 Z_{10} は不在であり、 Z_{11} は不在であり、 Z_{12} は不在であり、
- j) Z_1 は不在であり、 Z_2 は不在であり、 Z_3 は不在であり、 Z_{10} は不在であり、 Z_{11} は不在であり、 Z_{12} は不在である。

10

【0229】

リボヌクレオチドからなる第1のおよび第2の末端ストレッチを含む CGRP 結合核酸分子は、第1のおよび第2の末端ストレッチの以下の組み合わせ：

- a) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' C A C C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- b) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G G C C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G G C U 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- c) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G U C A U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- d) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G C C A U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A U G G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- e) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G C C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- f) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' C C C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G G G 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- g) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- h) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G G G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C C C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- i) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' G C C U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A G G C 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- j) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは 5' C A C G 3' のヌクレオチド配列を含み、または
- k) ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは 5' C G U G 3' のヌクレオチド配列を含

20

30

40

50

み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' U A C G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

1)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' G C A G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C U G C 3'のヌクレオチド配列を含む

を含む。

【0230】

リボヌクレオチドおよび2'-デオキシリボヌクレオチドからなる第1のおよび第2の末端ストレッチを含むCGRP結合核酸分子は、第1のおよび第2の末端ストレッチの以下の組み合わせを含み、

ヌクレオチドの第1の末端ストレッチが5' C C Z₄ U Z₅ 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチが5' Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ 3'のヌクレオチド配列を含み、または

C、G、AおよびUはリボヌクレオチドであり、

Z₄はGまたはdGであり、Z₅はGまたはdGであり、Z₆はCまたはdCであり、Z₇はAまたはdAであり、Z₈はCまたはdCであり、Z₉はGまたはdGであり、Z₁₀はGまたはdGであり、

dC、dGおよびdAは2'-デオキシリボヌクレオチドであり、

好ましい実施形態では、

a)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

b)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C d G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

c)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U d G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

d)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' d C A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

e)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C d A C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

f)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A d C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

g)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C d G G 3'のヌクレオチド配列を含み、または

h)ヌクレオチドの第1の末端ストレッチは5' C C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2の末端ストレッチは5' C A C G d G 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0231】

CGRP結合スピーゲルマー212-G1-001、226-F2-001、226-F2-001-D41、226-F2-001-D44、226-F2-001-D41/D44および226-F2-001-D41-dU28のヒトアルファCGRPに対する、K_Dとして表される結合親和性をプラズモン共鳴測定により決定した(実施例4、図4、5、6および13)：

212-G1-001：5.12 nMのK_D

10

20

30

40

50

226 - F2 - 001 : 2.62 nMの K_D
 226 - F2 - 001 - D41 : 0.55 nMの K_D
 226 - F2 - 001 - D44 : 0.52 nMの K_D
 226 - F2 - 001 - D41 / D44 : 0.2 nMの K_D
 226 - F2 - 001 - D41 - dU28 : 0.07 nMの K_D
 226 - F2 - 001 - D41 - dU28 : 0.21 nMの K_D

【0232】

CGRP結合分子212 - G1 - 001および226 - F2 - 001は、ヌクレオチドの同一の中心ストレッチを共有する(図1Aを参照)。親和性決定(上記参照)により示されるように、4ヌクレオチド(212 - G1 - 001を参照)の代わりに5ヌクレオチド(226 - F2 - 001を参照)を有する第1のおよび第2の末端ストレッチにより、ヒトCCR Pに対する結合親和性の著しい改善がもたらされた。

10

【0233】

さらに、上記および図4、5および6に示すように、CGRP結合分子226 - F2 - 001中における(1つまたは複数の)2'-デオキシリボヌクレオチドによる1つ(226 - F2 - 001 - D41および226 - F2 - 001 - D44を参照)または2つ(226 - F2 - 001 - D41 / D44を参照)のリボヌクレオチドの置き換えにより、ヒトアルファCCR Pに対する結合親和性の著しい改善がもたらされた。

【0234】

一般に、スピーゲルマーは、それをインピボで使用するためにPEG部分で修飾される。5'末端にアミノ基を含むスピーゲルマーとして、CGRP結合核酸分子226 - F2 - 001および226 - F2 - 001 - D41を合成した。前記アミノ修飾スピーゲルマーに40kDaのPEG部分を連結して、CGRP結合スピーゲルマー226 - F2 - 001 - 5' - 40kDa - PEGおよび226 - F2 - 001 - D41 - 40kDa - PEG(NOX - L41とも称される)を得た。スピーゲルマーの合成およびPEG化は実施例2に記載されている。CGRP結合核酸分子226 - F2 - 001および226 - F2 - 001 - D41のPEG修飾は、スピーゲルマーの結合および機能に影響を及ぼさなかった(以下を参照)。

20

【0235】

CGRP結合分子212 - G1 - 001、226 - F2 - 001、226 - F2 - 001 - 5' - 40kDa - PEGおよび226 - F2 - 001 - D41 - 5' - 40kDa - PEG(NOX - L41とも称される)は、以下の IC_{50} により、インピボでヒトCGRPの受容体に対するヒトCGRPの機能と拮抗することができる(実施例5、図7Aおよび7B)：

30

212 - G1 - 001 : 8.7 nMの IC_{50}
 226 - F2 - 001 : 3.5 nMの IC_{50}
 226 - F2 - 001 - 5' - 40kDa PEG : 3.8 nMの IC_{50}
 226 - F2 - 001 - D41 - 5' - 40kDa - PEG : 0.39 nMの IC_{50}

【0236】

親和性決定(上記参照)と一致して、4ヌクレオチド(212 - G1 - 001を参照)の代わりに5ヌクレオチド(226 - F2 - 001を参照)を有する第1のおよび第2の末端ストレッチにより、ヒトアルファCCR Pの機能の著しく強力な阻害がもたらされた(図7A)。

40

【0237】

さらに、上記および図7Bに示すように、2'-デオキシリボヌクレオチドによる1つのリボヌクレオチドの置き換え(226 - F2 - 001 - 5' - 40kDa - PEGおよびNOX - L41、226 - F2 - 001 - D41 - 5' - 40kDa - PEGとも称される)により、ヒトアルファCCR Pの機能の著しく強力な阻害がもたらされた(図7Bを参照)。

【0238】

50

[実施例 2 : アプタマーおよびスピーゲルマーの合成および誘導体化]

< 小規模合成 >

標準的な環外アミン保護基を有する 2' T B D M S - R N A および D N A ホスホラミダイト化学 (D a m h a および O g i l v i e , 1 9 9 3) を使用して、A B I - 3 9 4 合成装置 (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A , U S A) を用いた固相合成によって、アプタマー (D - R N A 核酸または D - D N A 修飾 D - R N A 核酸) およびスピーゲルマー (L - R N A 核酸または L - D N A 修飾 L - R N A 核酸) を生成した。オリゴヌクレオチドの R N A 部分に関しては、D - 立体配置および L - 立体配置の r A (N - B z) - ホスホラミダイト、r C (N - A c) - ホスホラミダイト、r G (N - i b u) - ホスホラミダイトおよび r U - ホスホラミダイトを使用したが、D N A 部分に関しては、D - 立体配置および L - 立体配置の d A (N - B z) - 、 d C (N - A c) - 、 d G (N - i b u) - 、 d T および d U を適用した。全てのホスホラミダイトを ChemGenes、Wilmington、MA から購入した。合成および脱保護後に、アプタマーおよびスピーゲルマーをゲル電気泳動によって精製した。

10

【 0 2 3 9 】

< 大規模合成および修飾 >

標準環外アミン保護基を有する 2' T B D M S R N A および D N A ホスホラミダイト化学 (D a m h a および O g i l v i e , 1 9 9 3) を使用して、A k t a P i l o t 1 0 0 合成装置 (G E H e a l t h c a r e , F r e i b u r g) を用いた固相合成によって、スピーゲルマーを生成した。L - r A (N - B z) - ホスホラミダイト、L - r C (N - A c) - ホスホラミダイト、L - r G (N - i b u) - ホスホラミダイト、L - r U - ホスホラミダイト、L - d A (N - B z) - ホスホラミダイト、L - d C (N - A c) - ホスホラミダイト、L - d G (N - i B u) - ホスホラミダイトおよび L - d T - ホスホラミダイトは、ChemGenes、Wilmington、MA から購入した。5' - アミノ - 修飾剤は、American International Chemicals Inc. (Framingham , M A , U S A) から購入した。非修飾スピーゲルマーまたは 5' - アミノ - 修飾スピーゲルマーの合成を、L - リボ A、L - リボ C、L - リボ G、L - リボ U、L - 2' デオキシ A、L - 2' デオキシ C、L - 2' デオキシ G または L - 2' デオキシ T 修飾 C P G 孔径 1 0 0 0 (L i n k T e c h n o l o g y , G l a s g o w , U K) で開始した。R N A および D N A ホスホラミダイトのカップリング (1 サイクル当たり 1 5 分) について、アセトニトリル中の 0 . 3 M のベンジルチオテトラゾール (C M S - C h e m i c a l s , A b i n g d o n , U K) 、およびアセトニトリル中のそれぞれの 0 . 2 M のホスホラミダイト溶液 2 当量を使用した。酸素 - キッピングサイクルを使用した。オリゴヌクレオチド合成のためのさらなる標準的な溶媒および試薬は、Biosolve (V a l k e n s w a a r d , N L) から購入した。スピーゲルマーを D M T - O N 合成し、脱保護後、Source 15 RPC 媒体 (A m e r s h a m) を使用して分取 R P - H P L C (W i n c o t t e r , 1 9 9 5) によって精製した。5' D M T - 基を、8 0 % 酢酸 (室温で 3 0 分) で除去した。5' アミノ修飾スピーゲルマーの場合、5' M M T - 基を 8 0 % 酢酸 (室温で 9 0 分) で除去した。続いて、水性 2 M の N a O A c 溶液を加え、5 K 再生セルロース膜 (M i l l i p o r e , B e d f o r d , M A) を使用した接線流濾過によってスピーゲルマーを脱塩した。

20

30

40

【 0 2 4 0 】

< スピーゲルマーの P E G 化 >

インビボでのスピーゲルマーの血漿残留時間を延長するために、4 0 k D a のポリエチレングリコール (P E G) 部分をスピーゲルマーの 5' 末端で共有結合した。

【 0 2 4 1 】

P E G 化 (P E G 化のための方法の技術的詳細については、欧州特許出願第 1 3 0 6 3 8 2 号を参照) のために、精製 5' - アミノ修飾スピーゲルマーを、H₂O (2 . 5 m l) 、DMF (5 m l) 、および緩衝液 A (5 m l 、クエン酸・H₂O [7 g] 、ホウ酸 [3 . 5 4 g] 、リン酸 [2 . 2 6 m l] 、および 1 M の N a O H [3 4 3 m l] を混合し

50

、1 lの最終容量まで水を加えることにより調製した。pH = 8.4は1 MのHClで調整した)の混合物に溶解させた。

【0242】

スピーゲルマー溶液のpHを、1 MのNaOHで8.4にした。次いで、40 kDaのPEG-NHSエステル(Jenkem Technology, Allen, TX, USA)を、37 °Cで30分ごとに0.25当量を6回に分けて、75~85%の最大収率に達するまで加えた。反応混合物のpHは、PEG-NHSエステルを加える間、1 MのNaOHで8~8.5に保った。

【0243】

反応混合物を4 mlの尿素溶液(8 M)、および4 mlの緩衝液B(H₂O中に0.1 Mのトリエチルアンモニウムアセテート)と混ぜ、95 °Cまで15分間加熱した。次いでPEG化スピーゲルマーを、アセトニトリル勾配(緩衝液B、緩衝液C:アセトニトリル中に0.1 Mのトリエチルアンモニウムアセテート)を使用して、Source 15 R PC媒体(Amersham)を用いるRP-HPLCによって精製した。過剰なPEGは5%緩衝液Cで、PEG化スピーゲルマーは10~15%の緩衝液Cで溶出した。95%超の純度(HPLCにより評価した場合)を有する生成物画分を合わせ、3 MのNaOAc 40 mlと混合した。接線流濾過(5 K再生セルロース膜、Millipore, Bedford MA)によってPEG化スピーゲルマーを脱塩した。

【0244】

[実施例3:競合的ブルダウン結合アッセイによるD-アルファCGRP結合アプタマーの順位付け]

異なる試験アプタマーのセットの比較順位付けのために、ブルダウン結合アッセイを使用した。この目的のために、標識していないアプタマーは、ピオチン化D-CGRPへの結合に関して、標識した基準アプタマーと競合し、そのため試験アプタマーのD-CGRPに対する親和性に従って結合シグナルを減少させた。基準アプタマーを、[³²P]-標識ATP(Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany)を使用して、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(インビトロゲン, Karlsruhe, Germany)によって5'-末端で400000~800000 cpm/pmolの比放射能に放射性標識した。2~4時間にわたって、360 μlの選択緩衝液(20 mMのTris-HCl pH 7.4、150 mMのNaCl、5 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、1 mMのCaCl₂、0.1% [w/vol]のTween-20、10 μg/mlのHSA、10 μg/mlの酵母RNA)中で、10~20 nMである一定量のピオチン化D-CGRPと一緒に150 pMの放射性標識した基準アプタマーを用いて、37 °Cで結合反応を実施した。これらの条件により、ニュートラアビジンアガロースまたはストレプトアビジンUltraLink Plus(共にPierce Biotechnology, Rockford, USA)における固定化および洗浄後に、ピオチン化D-CGRPに対する基準アプタマーの約5~10%の結合がもたらされた。競合させるために、標識していない試験アプタマーを、一定量の標識した基準アプタマーと一緒に、5 nM、50 nMおよび500 nMで結合反応に添加した。結合の競合、固定化、適切な洗浄、およびシンチレーションカウンターによる、固定化された放射能の定量後に、試験中に最大の活性が見られたアプタマーを次いで、さらなるアプタマー多様体の比較分析のための新しい基準として機能させた。結果を図1A~Bに示す。

【0245】

[実施例4:CGRPおよび関連ペプチドに結合するスピーゲルマーのBiacore測定]

<Biacoreアッセイの設定>

ヒトCGRPおよび関連ペプチドを、0.4 MのEDC(H₂O中の1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド; GE, BR-1000-50)と0.1 MのNHS(H₂O中のN-ヒドロキシスクシンイミド; GE, BR-1000-50)との1:1混合物を使用して、カルボキシメチル化(略語:CM)デキストラン被覆センサ

10

20

30

40

50

チップ上に、アミンカップリング手順により固定化した。同じセンサーチップ上の基準フローセルをビオチンで遮断した。

【0246】

<一般的な動態評価>

CGRP結合スピーゲルマーを、100 μMの保存濃度(260 nmでの吸収の測定による定量化)まで水で希釈し、水浴またはサーモミキサー中で30秒間95℃まで加熱し、氷上で即座に冷却して、均一に溶解した溶液を確保した。

【0247】

ランニング緩衝液で希釈した1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.8、3.9、1.95および0 nMの濃度での、または500 - 250 - 125 - 62.5 - 31.3 - 15.6 - 7.8 (2x) - 3.9 - 1.95 - 0.98 - 0.48 - 0 nMの濃度での一連のスピーゲルマー注入によって、動態パラメータおよび解離定数を評価した。全ての実験において、30 μl/分の流量で240~360秒の結合時間および240~360秒の解離時間を定量するKinjectコマンドを使用して、37℃で分析を実施した。このアッセイは2重を基準とし、一方でFC1は(遮断された)表面对照(各スピーゲルマー濃度のバルク寄与)として機能し、検体を有さない連続した緩衝液注入により緩衝液自体のバルク寄与を決定した。データ分析および解離定数 K_D の算出を、改良したLangmuir1:1化学量論的適合アルゴリズムを使用して、BIAevaluation3.1.1ソフトウェア(BIACORE AB、Uppsala、Sweden)により行った。

【0248】

データ分析および解離定数 K_D の算出を、定数RIと 1×10^7 [RU/M*秒]の質量輸送係数 k_t による質量輸送評価とにより、改良したLangmuir1:1化学量論的適合アルゴリズムを使用して、BIAevaluation3.1.1ソフトウェア(BIACORE AB、Uppsala、Sweden)により行なった。結果を図3A~D、4~6、9および13に示す。

【0249】

[実施例5:ヒト神経芽細胞腫細胞における、アルファCGRPにより誘導されるcAMP産生の阻害]

CGRP結合スピーゲルマーの生物学的効力を以下のように分析した。

【0250】

SK-N-MCヒト神経芽細胞腫細胞(ACC203、DSMZ、Braunschweig)を平底の96-ウェルプレートに 5×10^4 個の細胞/ウェルで播種し、10%熱不活性化したウシ胎仔血清(FCS)、4 mMのL-アラニル-L-グルタミン(GLUTAMAX)、50単位/mlのペニシリンおよび50 μg/mlのストレプトマイシンを添加した100 μlのDMEM(1000 mg/Lのグルコース、インビトロゲン)中において37℃および5%CO₂にて48時間培養した。

【0251】

刺激溶液(1 nMのヒトまたはラットのL-アルファCGRP(Bachem)+漸増濃度のスピーゲルマー)を、V底の0.2 mlロープロファイル96-ウェルプレートを使用して、1 mg/mlのBSAおよび20 mMのHEPESを添加したHBSS(Gibco)で三重反復試験として調製し、全体で60分にわたり37℃でインキュベートした。ブランク値(L-アルファCGRPなし、スピーゲルマーなし)および対照値(1 nMのL-アルファCGRP、スピーゲルマーなし)を三重反復試験として含めた。刺激の20分前に、1 mMのホスホジエステラーゼ阻害剤3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx、Sigma; HBSS/BSA/HEPESで希釈したDMSO中での50 mMストック)を細胞および刺激溶液に添加した。

【0252】

刺激するために細胞培養培地を細胞から除去し、100 μlの予めインキュベートした刺激溶液で置換した。細胞を37℃、5%CO₂で30分刺激した。刺激溶液の除去後、

50 μ l / ウェルのアッセイ / 溶解緩衝液 (Applied Biosystems、Tropix cAMP - Screen™ Systemキット) を 37 °C で 30 分添加することにより、細胞を溶解した。

【0253】

その後、ウェル当たりの cAMP の産生量を、製造業者の指示書に従って、Tropix cAMP - Screen (商標) ELISA Systemキット (Applied Biosystems) を使用して測定した。簡単に言うと、6 nmol ~ 0.6 pmol の cAMP / ウェルの範囲のアッセイ / 溶解緩衝液で標準曲線を作成する。アッセイ / 溶解緩衝液で希釈した細胞溶解物および標準曲線を、ヤギ抗ウサギ IgG で予め被覆したマイクロプレートに添加する。cAMP アルカリ性ホスファターゼ共役体および抗 cAMP 抗体を試料に添加し、室温で 60 分インキュベートする。その後、プレートを洗浄し、化学発光基質を添加する。30 分後、化学発光を FLUOstar OPTIMA プレート読取り機ユニット (BMG Labtech) で測定する。cAMP - Screen (商標) ELISA システムは、競合的イムノアッセイフォーマットである。したがって、光信号強度は、試料または標準調製物中における cAMP レベルと反比例する。このアッセイシステムを使用して、本明細書中に記載されている実施例 1 および 7 の範囲内のスピーゲルマーを試験した。結果を図 7 および 8 に示す。産生された cAMP の量を対照の百分率として示す。対照と比較して cAMP 産生の 50% 阻害に必要なスピーゲルマーの濃度が阻害定数 IC₅₀ を規定する。結果を図 7A および 7B に示す。

10

【0254】

20

[実施例 6 : アミリンにより誘導される cAMP 産生の阻害]

CGRP 結合スピーゲルマーのヒトまたはラットの アミリン に対する 交差反応性を以下のように分析した。

【0255】

MCF - 7 ヒト乳癌細胞 (ACC 115、DSMZ、Braunschweig) を基底の 96 - ウェルプレート (Greiner) に 5×10^4 個の細胞 / ウェルで播種し、10% 熱不活性化したウシ胎仔血清 (FCS)、4 mM の L - アラニル - L - グルタミン (GLUTAMAX)、50 単位 / ml のペニリシンおよび 50 μ g / ml のストレプトマイシンを添加した 100 μ l の DMEM (1000 mg / L のグルコース、インビトロゲン) 中において 37 °C および 5% CO₂ にて 24 時間培養した。

30

【0256】

刺激溶液 (3 nM のヒトまたはラットの L - アミリン (Bachem) + 漸増濃度のスピーゲルマー) を、V 底の 0.2 ml ロープロファイル 96 - ウェルプレートを使用して、1 mg / ml の BSA および 20 mM の HEPES を添加した HBSS (Gibco) で三重反復試験として調製し、全体で 60 分にわたり 37 °C でインキュベートした。ブランク値 (L - アミリンなし、スピーゲルマーなし) および対照値 (1 nM の L - アミリン、スピーゲルマーなし) を三重反復試験として含めた。刺激の 20 分前に、1 mM のホスホジエステラーゼ阻害剤 3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン (IBMX、Sigma; HBSS / BSA / HEPES で希釈した DMSO 中での 50 mM ストック) を細胞および刺激溶液に添加した。

40

【0257】

刺激するために細胞培養培地を細胞から除去し、100 μ l の予めインキュベートした刺激溶液で置換した。細胞を 37 °C、5% CO₂ で 30 分刺激した。刺激溶液の除去後、50 μ l / ウェルの溶解緩衝液 (Applied Biosystems、Tropix cAMP - Screen™ Systemキット) を 37 °C で 30 分添加することにより、細胞を溶解した。

【0258】

その後、上記で簡単に記載されているように、ウェル当たりの cAMP の産生量を、製造業者の指示書に従って Tropix cAMP - Screen (商標) ELISA Systemキット (Applied Biosystems) を使用して測定した。

50

【0259】

このアッセイシステムを使用して、本明細書中に記載されている実施例7の範囲内のスピーゲルマーを試験した。結果を図10に示す。産生されたcAMPの量を対照の百分率として示す。対照と比較してcAMP産生の50%阻害に必要なスピーゲルマーの濃度が阻害定数 IC_{50} を規定する。

【0260】

[実施例7：CGRP結合スピーゲルマーNOX-L41のCGRPとアミリンとの識別]

図9は、4つのC-末端アミド化ペプチドであるヒトアルファCGRP、ラットアルファCGRP、ヒトアミリンおよびラットアミリンのアラインメントを示す。4つ全てのペプチドは、保存されているCys2-Cys7ジスルフィド架橋を有する。

10

【0261】

スピーゲルマーNOX-L41(226-F2-001-D41-5'40kDa-PEGとも称される)およびそのペグ化されていない形態226-F2-001-D41は、それらの密接に関連したペプチドを識別し、ヒトまたはラットのアルファCGRPに選択的に結合する。NOX-L41は0.39nMの IC_{50} で、ヒトアルファCGRPにより誘導されるcAMP産生を阻害する(図9)。対照的に、ヒトアミリンによる細胞活性化は、1 μ M以下の濃度でNOX-L41によって阻害されない(図10)。アミリン結合スピーゲルマー(配列：5'-40kDa-PEG-GGACUGAUGGC GGUC CU AUUACGCCGAUAGGGUGAGGGGA、[配列番号135])は、ヒトアミリンにより誘導されるcAMP産生を阻害する(図10)。一致するように、226-F2-001-D41がヒトアミリンに結合しないことを、動的Biacore測定により検出した(図9)。226-F2-001-D41のヒトCGRPに対する親和性(K_D)は0.55nMであった(図9)。したがって、NOX-L41は、1000を超える係数でヒトアルファCGRPとヒトアミリンとを識別する。ラットアルファCGRPとヒトアミリンとの識別は、75を超える識別係数に対応するそれぞれ3.6nMおよび283nMの IC_{50} ではあまりはっきりしない(図9)。

20

【0262】

阻害濃度および親和性の関係から、アミノ酸残基がスピーゲルマー結合に関与し得ることを大まかに推定することができる。

30

【0263】

ラットアミリンは測定可能な IC_{50} を有するNOX-L41により阻害されるが、ヒトアミリンの阻害を検出できなかった(図9および10)。ラットアミリンとヒトアミリンとで異なるのはアミノ酸残基のみ、すなわちアミノ酸残基18および29である。ヒトアミリンからの各変化はR18HおよびP29Sである。したがって、R18もしくはP29のいずれかまたは両方が、最小の結合エピトープの部分である。P29の場合には、ペプチドの主鎖においてプロリンにより誘導される湾曲が隣接する保存残基の適切な認識に必要であるかもしれない。文献から、核酸アプタマーは好ましくはアルギニンを標的とすることが知られている。さらに、アプタマーによって結合する標的分子のエピトープは通常、全体の親和性に寄与する多数の弱い接触を有する複数のアミノ酸を含む。したがって、この場合にはまた、R18は、CGRPと比較してラットアミリンへの弱い結合を説明する結合事象に寄与する隣接残基によるスピーゲルマー結合において中心的役割を果たす。

40

【0264】

[参考文献]

その開示が参照により本明細書に組み込まれる、本明細書に列挙した文献の完全な書誌データは、そうでないことを示さない場合は以下の通りである。

【表 2 A】

- Adwanikar, H., G. Ji, et al. (2007). "Spinal CGRP1 receptors contribute to supraspinally organized pain behavior and pain-related sensitization of amygdala neurons." *Pain* 132(1-2): 53-66.
- Alessandri, M., L. Massanti, et al. (2006). "Plasma changes of calcitonin gene-related peptide and substance P in patients with dialysis headache." *Cephalalgia* 26(11): 1287-93.
- Altschul, S.F., Gish, W., et al. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3):403-10.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17):3389-402. 10
- Amara, S. G., V. Jonas, et al. (1982). "Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products." *Nature* 298(5871): 240-4.
- Ambalavanar, R., M. Moritani, et al. (2006). "Deep tissue inflammation upregulates neuropeptides and evokes nociceptive behaviors which are modulated by a neuropeptide antagonist." *Pain* 120(1-2): 53-68.
- Antunez, C., M. J. Torres, et al. (2009). "Calcitonin gene-related peptide modulates interleukin-13 in circulating cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive T cells in patients with atopic dermatitis." *Br J Dermatol* 161(3): 547-53.
- Bennett, A. D., K. M. Chastain, et al. (2000). "Alleviation of mechanical and thermal allodynia by CGRP(8-37) in a rodent model of chronic central pain." *Pain* 86(1-2): 163-75. 20
- Bourdu, S., M. Dapoigny, et al. (2005). "Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats." *Gastroenterology* 128(7): 1996-2008.
- Breeze, A. L., T. S. Harvey, et al. (1991). "Solution structure of human calcitonin gene-related peptide by 1H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics." *Biochemistry* 30(2): 575-82.
- Chen, Y., H. H. Willcockson, et al. (2008). "Increased expression of CGRP in sensory afferents of arthritic mice--effect of genetic deletion of the vanilloid receptor TRPV1." *Neuropeptides* 42(5-6): 551-6.
- Connor, K. M., R. E. Shapiro, et al. (2009). "Randomized, controlled trial of telcagepant for the acute treatment of migraine." *Neurology* 73(12): 970-7. 30
- Damha, M.J., Ogilvie, K.K., et al. (1993). "Oligoribonucleotide synthesis. The silyl-phosphoramidite method." *Methods Mol Biol* 20:81-114.
- Denekas, T., M. Troltsch, et al. (2006). "Inhibition of stimulated meningeal blood flow by a calcitonin gene-related peptide binding mirror-image RNA oligonucleotide." *Br J Pharmacol* 148(4): 536-43.
- Diener, H. C., P. Barbanti, et al. (2011). "BI 44370 TA, an oral CGRP antagonist for the treatment of acute migraine attacks: results from a phase II study." *Cephalalgia* 31(5): 573-84.

【表 2 B】

- Dirmeier, M., S. Capellino, et al. (2008). "Lower density of synovial nerve fibres positive for calcitonin gene-related peptide relative to substance P in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis." *Rheumatology (Oxford)* 47(1): 36-40.
- Edvinsson, L. and T. W. Ho (2010). "CGRP receptor antagonism and migraine." *Neurotherapeutics* 7(2): 164-75.
- Edvinsson, L., E. Nilsson, et al. (2007). "Inhibitory effect of BIBN4096BS, CGRP(8-37), a CGRP antibody and an RNA-Spiegelmer on CGRP induced vasodilatation in the perfused and non-perfused rat middle cerebral artery." *Br J Pharmacol* 150(5): 633-40.
- Ferreira-Gomes, J., S. Adaes, et al. (2010). "Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats." *Arthritis Rheum* 62(12): 3677-85. 10
- Field, B. C., O. B. Chaudhri, et al. (2010). "Bowels control brain: gut hormones and obesity." *Nat Rev Endocrinol* 6(8): 444-53.
- Frese, A., M. Schilgen, et al. (2005). "Calcitonin gene-related peptide in cervicogenic headache." *Cephalalgia* 25(9): 700-3.
- Gabra, B. H. and P. Sirois (2004). "Pathways for the bradykinin B1 receptor-mediated diabetic hyperalgesia in mice." *Inflamm Res* 53(12): 653-7.
- Gallai, V., P. Sarchielli, et al. (1995). "Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally." *Cephalalgia* 15(5): 384-90.
- Goadsby, P. J. (2003). "Migraine: diagnosis and management." *Intern Med J* 33(9-10): 436-42. 20
- Goadsby, P. J. and L. Edvinsson (1994). "Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies." *Brain* 117 (Pt 3): 427-34.
- Goadsby, P. J., L. Edvinsson, et al. (1990). "Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache." *Ann Neurol* 28(2): 183-7.
- Gram, D. X., A. J. Hansen, et al. (2005). "Plasma calcitonin gene-related peptide is increased prior to obesity, and sensory nerve desensitization by capsaicin improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats." *Eur J Endocrinol* 153(6): 963-9.
- Han, N., D. Y. Zhang, et al. (2010). "Calcitonin gene-related peptide induces proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression via extracellular signal-regulated kinase activation in rat osteoblasts." *Chin Med J (Engl)* 123(13): 1748-53. 30
- Hay, D. L., C. S. Walker, et al. (2011). "Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges." *Endocr Relat Cancer* 18(1): C1-14.
- Ho, T. W., L. Edvinsson, et al. (2010). "CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology." *Nat Rev Neurol* 6(10): 573-82.
- Ho, T. W., M. D. Ferrari, et al. (2008). "Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial." *Lancet* 372(9656): 2115-23. 40
- Hou, Q., T. Barr, et al. (2011). "Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide beta: implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms." *Pain* 152(9): 2036-51.
- Huang, J., L. L. Stohl, et al. (2011). "Calcitonin Gene-related Peptide Inhibits Chemokine Production by Human Dermal Microvascular Endothelial Cells." *Brain Behav Immun*.

【表 2 C】

- Juhász, G., T. Zsombok, et al. (2003). "NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release." *Pain* 106(3): 461-70.
- Juhl, L., L. Edvinsson, et al. (2007). "Effect of two novel CGRP-binding compounds in a closed cranial window rat model." *Eur J Pharmacol* 567(1-2): 117-24.
- Klussmann S. (2006). "The Aptamer Handbook – Functional Oligonucleotides and their Applications." Edited by S. Klussmann. WILEY-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-31059-2
- Kopp, S. (2001). "Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders." *J Orofac Pain* 15(1): 9-28. 10
- Kusser, W. (2000). "Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution." *J Biotechnol* 74(1): 27-38.
- Lassen, L. H., P. A. Haderslev, et al. (2002). "CGRP may play a causative role in migraine." *Cephalalgia* 22(1): 54-61.
- Lee, M., B. J. Kim, et al. (2009). "Complete Freund's adjuvant-induced intervertebral discitis as an animal model for discogenic low back pain." *Anesth Analg* 109(4): 1287-96.
- Lee, S. E. and J. H. Kim (2007). "Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat." *Neurosci Res* 58(3): 245-9. 20
- Limmroth, V., Z. Katsarava, et al. (2001). "An in vivo rat model to study calcitonin gene related peptide release following activation of the trigeminal vascular system." *Pain* 92(1-2): 101-6.
- Liu, L. S., M. Shenoy, et al. (2011). "Substance P and Calcitonin Gene Related Peptide Mediate Pain in Chronic Pancreatitis and Their Expression is Driven by Nerve Growth Factor." *JOP* 12(4): 389-94.
- Lutz, T. A. (2006). "Amylinergic control of food intake." *Physiol Behav* 89(4): 465-71.
- Lutz, T. A., E. Del Prete, et al. (1994). "Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin." *Physiol Behav* 55(5): 891-5.
- Ma, W. and R. Quirion (2006). "Increased calcitonin gene-related peptide in neuroma and invading macrophages is involved in the up-regulation of interleukin-6 and thermal hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy." *J Neurochem* 98(1): 180-92. 30
- Maintz, L., E. Wardelmann, et al. (2011). "Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis." *Allergy*.
- Mairal T., Ozalp V.C., Lozano Sánchez P., et al. (2008). "Aptamers: molecular tools for analytical applications." *Anal Bioanal Chem* 390(4):989-1007
- McDougall, J. J. (2006). "Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain." *Arthritis Res Ther* 8(6): 220.
- McGinnis, S., Madden, T.L. et al. (2004). "BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools." *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue):W20-5.
- McLatchie, L. M., N. J. Fraser, et al. (1998). "RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor." *Nature* 393(6683): 333-9. 40
- Mikami, N., K. Watanabe, et al. (2012). "Calcitonin gene-related peptide enhances experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting Th17-cell functions." *Int Immunol* 24(11): 681-91.
- Minamiyama, M., M. Katsuno, et al. (2012). "Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract." *Nat Med* 18(10): 1531-8.

【表 2 D】

- Mishima, T., Y. Ito, et al. (2011). "Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300(2): H431-9.
- Mogil, J. S., F. Miermeister, et al. (2005). "Variable sensitivity to noxious heat is mediated by differential expression of the CGRP gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(36): 12938-43.
- Monteith, T. S. and P. J. Goadsby (2011). "Acute migraine therapy: new drugs and new approaches." *Curr Treat Options Neurol* 13(1): 1-14.
- Morley, J. E., J. F. Flood, et al. (1994). "Modulation of food intake by peripherally administered amylin." *Am J Physiol* 267(1 Pt 2): R178-84.
- Needleman and Wunsch (1970). "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." *J Mol Biol* 48(3):443-53. 10
- Nitzan-Luques, A., M. Devor, et al. (2011). "Genotype-selective phenotypic switch in primary afferent neurons contributes to neuropathic pain." *Pain* 152(10): 2413-26.
- Nohr, D., M. K. Schafer, et al. (1999). "Calcitonin gene-related peptide gene expression in collagen-induced arthritis is differentially regulated in primary afferents and motoneurons: influence of glucocorticoids." *Neuroscience* 93(2): 759-73.
- Olesen, J., H. C. Diener, et al. (2004). "Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine." *N Engl J Med* 350(11): 1104-10.
- Ostrowski, S. M., A. Belkadi, et al. (2011). "Cutaneous Denervation of Psoriasiform Mouse Skin Improves Acanthosis and Inflammation in a Sensory Neuropeptide-Dependent Manner." *J Invest Dermatol*. 20
- Ottosson, A. and L. Edvinsson (1997). "Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide." *Cephalalgia* 17(3): 166-74.
- Pearson and Lipman (1988). "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444
- Powell, K. J., W. Ma, et al. (2000). "Blockade and reversal of spinal morphine tolerance by peptide and non-peptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonists." *Br J Pharmacol* 131(5): 875-84.
- Puttfarcken, P. S., P. Han, et al. (2010). "A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model." *Pain* 150(2): 319-26. 30
- Raddant, A. C. and A. F. Russo (2011). "Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation." *Expert Rev Mol Med* 13: e36.
- Saxler, G., F. Loer, et al. (2007). "Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties." *Eur J Pain* 11(1): 67-74.
- Schweizerhof, M., S. Stosser, et al. (2009). "Hematopoietic colony-stimulating factors mediate tumor-nerve interactions and bone cancer pain." *Nat Med* 15(7): 802-7.
- Sink, K. S., D. L. Walker, et al. (2011). "Calcitonin gene-related Peptide in the bed nucleus of the stria terminalis produces an anxiety-like pattern of behavior and increases neural activation in anxiety-related structures." *J Neurosci* 31(5): 1802-10. 40
- Smith and Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Stepien, A., P. Jagustyn, et al. (2003). "[Suppressing effect of the serotonin 5HT1B/D receptor agonist rizatriptan on calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration in migraine attacks]." *Neurol Neurochir Pol* 37(5): 1013-23.

【表 2 E】

- Summ, O., A. P. Andreou, et al. (2010). "A potential nitrenergic mechanism of action for indomethacin, but not of other COX inhibitors: relevance to indomethacin-sensitive headaches." *J Headache Pain* 11(6): 477-83.
- Szadek, K. M., P. V. Hoogland, et al. (2010). "Possible nociceptive structures in the sacroiliac joint cartilage: An immunohistochemical study." *Clin Anat* 23(2): 192-8.
- Tan, K. K., M. J. Brown, et al. (1995). "Calcitonin gene-related peptide as an endogenous vasodilator: immunoblockade studies in vivo with an anti-calcitonin gene-related peptide monoclonal antibody and its Fab' fragment." *Clin Sci (Lond)* 89(6): 565-73.
- Tanaka, H., A. Shimaya, et al. (2011). "Enhanced insulin secretion and sensitization in diabetic mice on chronic treatment with a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist." *Life Sci*. 10
- Tfelt-Hansen, P. and H. Le (2009). "Calcitonin gene-related peptide in blood: is it increased in the external jugular vein during migraine and cluster headache? A review." *J Headache Pain* 10(3): 137-43.
- Tfelt-Hansen, P. and M. Ashina (2010). "Extracranial source of increased CGRP in migraine children?" *Cephalalgia* 30(3): 380-1.
- Toda, M., T. Suzuki, et al. (2008). "Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(36): 13550-5. 20
- Tvedskov, J. F., K. Lipka, et al. (2005). "No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine." *Ann Neurol* 58(4): 561-8.
- van Rossum, D., U. K. Hanisch, et al. (1997). "Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors." *Neurosci Biobehav Rev* 21(5): 649-78.
- Vater, A., F. Jarosch, et al. (2003). "Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX." *Nucleic Acids Res* 31(21): e130.
- Venkatesan, N., S. J. Kim, et al. (2003). "Novel phosphoramidite building blocks in synthesis and applications toward modified oligonucleotides." *Curr Med Chem* 10(19): 1973-91.
- Wacnik, P. W., C. M. Baker, et al. (2005). "Tumor-induced mechanical hyperalgesia involves CGRP receptors and altered innervation and vascularization of DsRed2 fluorescent hindpaw tumors." *Pain* 115(1-2): 95-106. 30
- Wang, L., X. Shi, et al. (2010). "Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption." *Bone* 46(5): 1369-79.
- Wang, Z., W. Ma, et al. (2009). "Cell-type specific activation of p38 and ERK mediates calcitonin gene-related peptide involvement in tolerance to morphine-induced analgesia." *FASEB J* 23(8): 2576-86.
- Wick, E. C., S. G. Hoge, et al. (2006). "Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5): G959-69. 40
- Wincott, F., DiRenzo, A, et al. (1995). "Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes." *Nucleic Acids Res* 23(14):2677-84.
- Winston, J. H., Z. J. He, et al. (2005). "Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain." *Pain* 117(1-2): 214-22.
- Xie, W., J. T. Fisher, et al. (2011). "CGRP induction in cystic fibrosis airways alters the submucosal gland progenitor cell niche in mice." *J Clin Invest* 121(8): 3144-58.

【表 2 F】

Xu, X., Z. Li, et al. (2012). "High Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P in Esophageal Mucosa of Patients with Non-Erosive Reflux Disease." *Dig Dis Sci*.

Zeller, J., K. T. Poulsen, et al. (2008). "CGRP function-blocking antibodies inhibit neurogenic vasodilatation without affecting heart rate or arterial blood pressure in the rat." *Br J Pharmacol* 155(7): 1093-103.

Zhang, C. and J. J. McDougall (2006). "Stimulation of sensory neuropeptide release by nociceptin/orphanin FQ leads to hyperaemia in acutely inflamed rat knees." *Br J Pharmacol* 148(7): 938-46.

Zhang, Z., F. Gong, et al. (2012). "Plasma level of calcitonin gene-related peptide in patients with polycystic ovary syndrome and its relationship to hormonal and metabolic parameters." *Peptides*.

Zheng, L. F., R. Wang, et al. (2008). "Calcitonin gene-related peptide dynamics in rat dorsal root ganglia and spinal cord following different sciatic nerve injuries." *Brain Res* 1187: 20-32.

Zheng, S., W. Li, et al. (2010). "Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase." *Am J Physiol Cell Physiol* 299(6): C1485-92.

10

【 0 2 6 5 】

明細書、特許請求の範囲および/または図面において開示されている本発明の特徴は、その様々な形態において、別個で、および任意の組み合わせの両方で、本発明を実現化するための材料とすることができる。

20

【 図 1 A 】

名称	配列番号	nt.	配列: 5'-3'	結合 (APM)
212-G1-001	001	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	=
226-F2-001	002	50	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	+
212-F1-001	003	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	=
224-B2-001	004	50	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	=
224-E1-001	005	48	GCAUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	=
226-A2-002	006	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	--
226-A3-001	007	50	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	+
226-G2-002	008	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	--
226-C2-002	009	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	--
226-E1-002	010	48	CGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	--
226-F1-001	011	50	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	=
226-C3-001	012	50	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGG	+

nt.:ヌクレオチドの数。 G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである。
 □で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す。
 結合(APM)を示した配列の分子を、基準としての212-G1-001に対するフルダウン結合的結合アッセイにおいてアブタマー(D-核酸)として試験した。
 +:212-G1-001よりも良好な結合親和性; -:212-G1-001と同様の結合親和性; -:212-G1-001よりも大幅に弱い結合親和性

図 1A

【 図 1 B 】

名称	配列番号	nt.	配列: 5'-3'	結合 (APM)
231-A1-001	013	52	GUCAUGUCUGCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	+
231-G2-001	014	52	GCCAUUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	--
231-C1-001	015	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	+
231-C2-001	016	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	+
231-D1-001	017	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	--
231-F1-001	018	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	+
231-E1-001	019	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	+
231-B3-001	020	54	CACCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGG	--
231-A2-001	021	54	GCCCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGG	+
231-E2-001	022	52	CCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGG	+
231-H2-001	023	52	GCCGUCUGUCGGAGACUACUCGUCGAGUGAUAUAGGUCUCCUCGACGGC	--

nt.:ヌクレオチドの数。 G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである。
 □で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す。
 結合(APM)を示した配列の分子を、基準としての212-G1-001に対するフルダウン結合的結合アッセイにおいてアブタマー(D-核酸)として試験した。
 +:212-G1-001よりも良好な結合親和性; -:212-G1-001と同様の結合親和性; -:212-G1-001よりも大幅に弱い結合親和性

図 1B

【 図 2 】

名称	配列番号	nt.	配列: 5'-3'	融合 (APM)
226-F2-001	002	50	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	=
226-F2-003	024	50	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	+
226-F2-004	025	50	ggctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	=
226-F2-005	026	50	gcctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	=

nt.: スクレオチドの数; G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである;

□で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す; 融合 (APM) 示した配列の分子を、基準として226-F2-001に対するブルダウン親合的結合アッセイにおいてアプタマー(D-核糖)として試験した;

=:226-F2-001と同様の結合親和性;+:226-F2-001よりも良好な結合親和性

図2

【 図 3 B 】

226-F2-001の誘導体

名称	配列番号	配列: 5'-3'	x倍改善された結合親和性	Biacore (SPM) K _s [nM]
226-F2-001-D24	036	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.70	1.53
226-F2-001-D25	037	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.50	1.73
226-F2-001-D26	038	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	5.65	0.46
226-F2-001-D28	039	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.21	0.81
226-F2-001-D30	040	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.63	1.60
226-F2-001-D33	041	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	2.30	1.13
226-F2-001-D34	042	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.41	0.59
226-F2-001-D37	043	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.06	0.64
226-F2-001-D39	044	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.87	1.39

□で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す; SPM: スピーグマー G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである; dg, dc, dtおよびdAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチド(desoxy ribonucleotide)である;

x倍改善された結合親和性: 共有結合的に固定化されたヒトL-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴により測定した; 226-F2-001に対して改善されたスピーグマー(L-核糖)の解離定数K_s、示した配列の分子を、ピオチン化L-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴として測定したスピーグマー(L-核糖)として試験した。

図3B

【 図 3 A 】

226-F2-001の誘導体

名称	配列番号	配列: 5'-3'	x倍改善された結合親和性	Biacore (SPM) K _s [nM]
226-F2-001	002	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.0	2.6
226-F2-001-D03	027	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.06	0.64
226-F2-001-D05	028	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.25	0.80
226-F2-001-D08	029	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.64	0.56
226-F2-001-D09	030	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.38	0.77
226-F2-001-D14	031	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.21	0.81
226-F2-001-D16	032	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	1.78	1.46
226-F2-001-D19	033	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	8.39	0.31
226-F2-001-D22	034	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	2.11	1.60
226-F2-001-D23	035	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.48	0.58

□で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す; SPM: スピーグマー G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである; dg, dc, dtおよびdAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチド(desoxy ribonucleotide)である;

x倍改善された結合親和性: 共有結合的に固定化されたヒトL-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴により測定した; 226-F2-001に対して改善されたスピーグマー(L-核糖)の解離定数K_s、示した配列の分子を、ピオチン化L-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴として測定したスピーグマー(L-核糖)として試験した。

図3A

【 図 3 C 】

226-F2-001の誘導体

名称	配列番号	配列: 5'-3'	x倍改善された結合親和性	Biacore (SPM) K _s [nM]
226-F2-001-D41	045	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	5.2	0.50
226-F2-001-D42	046	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	5.00	0.52
226-F2-001-D44	047	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	6.34	0.41
226-F2-001-D45	048	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	5.00	0.52
226-F2-001-D46	049	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.06	0.64
226-F2-001-D47	050	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.77	0.69
226-F2-001-D48	051	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.64	0.56
226-F2-001-D49	052	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	4.00	0.65
226-F2-001-D50	053	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	3.17	0.82
226-F2-001-D41/D44	054	ccctc <u>g</u> ctg <u>g</u> ccgagagacua <u>g</u> ccgucgagagaa <u>u</u> aggg <u>g</u> cc <u>g</u> cc <u>g</u> ccg	13.00	0.20

□で線取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す; SPM: スピーグマー G, C, UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである; dg, dc, dtおよびdAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチド(desoxy ribonucleotide)である;

x倍改善された結合親和性: 共有結合的に固定化されたヒトL-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴により測定した; 226-F2-001に対して改善されたスピーグマー(L-核糖)の解離定数K_s、示した配列の分子を、ピオチン化L-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共鳴として測定したスピーグマー(L-核糖)として試験した。

図3C

【 図 3 D 】

226-F2-001の誘導体

名称	配列番号	配列: 5'-3'	x倍改善された結合親和性	Biacore (SPM) K_D [nM]
226-F2-001-D41-dU20	126	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	37.14	0.07
226-F2-001-D41-dU28	127	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	12.38	0.21
226-F2-001-D41-dU20-28	128	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	4.19	0.62
226-F2-001-D41/D44-dU20	129	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	6.34	0.41
226-F2-001-D41/D44-dU28	130	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	7.03	0.37
226-F2-001-D41/D44-dU20-28	131	CCGUGCUGUCGGAGAGACUAUCUUCGUCGAGUAGAAAUAAGGUCGCCUCCACGG	7.88	0.33

□で標取られているヌクレオチドは、CGRP-結合モチーフを示す。 SPM: スピーグルマー (ribonucleotide)である。 G、C、UおよびAのいずれかはリボヌクレオチドである。 dG、dC、dUおよびdAのいずれかは2'-デオキシリボヌクレオチド(desoxy ribonucleotide)である。 x倍改善された結合親和性: 共有結合的に固定化されたヒトL-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共振により測定した。 226-F2-001に対して改善されたスピーグルマー(L-核糖)の解離定数 K_D 、示した配列の分子を、ヒオニン化L-CGRPへの直接結合を使用したBiacore上での表面プラズモン共振として測定したスピーグルマー(L-核糖)として試験した。

【 図 5 】

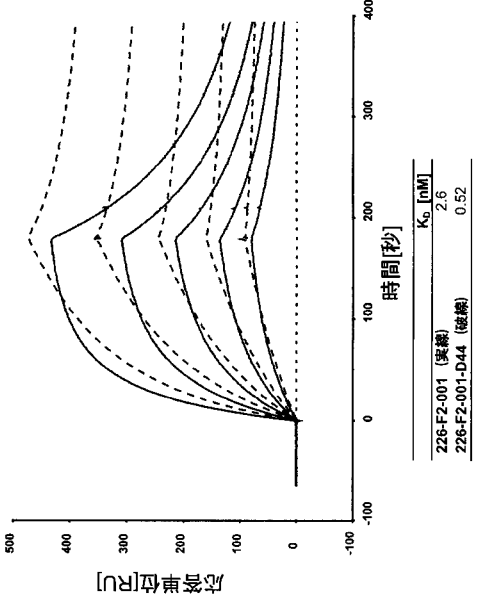


図5

【 図 4 】

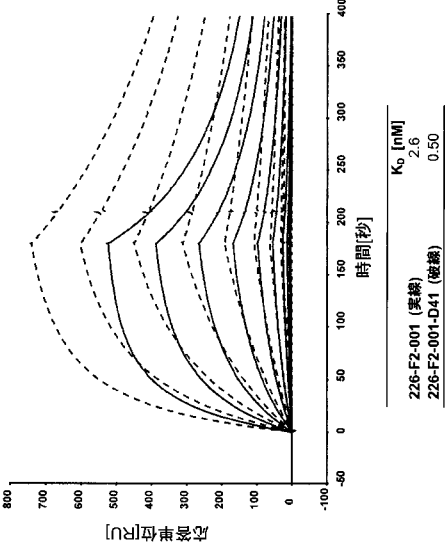


図4

【 図 6 】

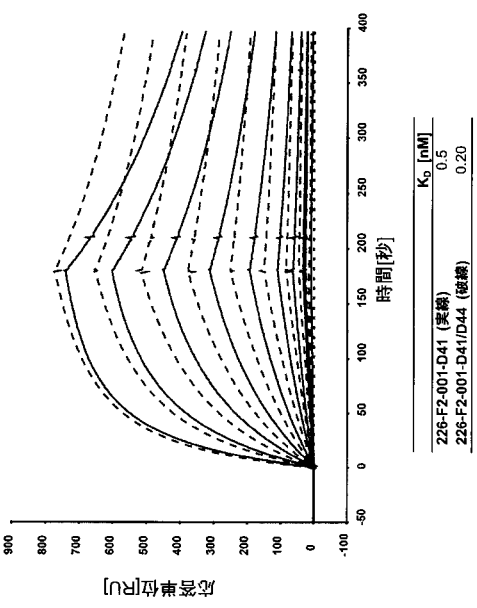


図6

【 図 7 A - 7 B 】

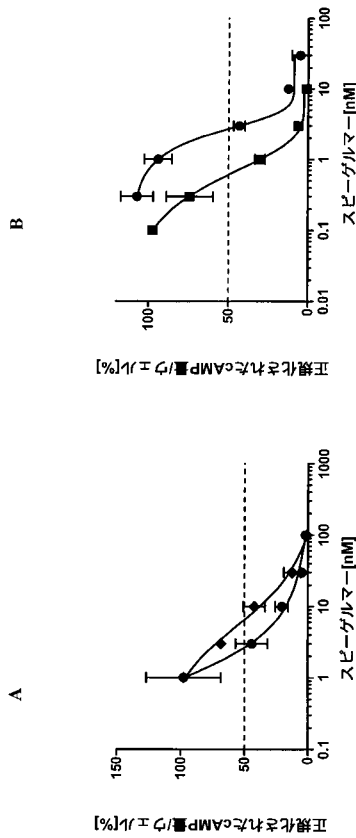


図7

【 図 9 】

	IC ₅₀ (NOX-L41) (226-F2-001-D41)	K _d
h-αCGRP	0.39 nM	0.55 nM
h-βCGRP	3.6 nM	0.57 nM
α-アミノリン	283 nM	データなし
h-βアミノリン	>1000 nM	結合なし

図9

【 図 8 A - 8 B 】

- A**
- ヒトアルファ-CGRP: AC-DTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSKAF [配列番号82]
 - ヒトベータ-CGRP: AC-NTATCV THRLAGLLSR SGNVKSINFV PTNVGSKAF [配列番号83]
 - ヒトアミノリン: KC-NTATCA TORLANFLVH SNNFGAILLS STNVGSNTV [配列番号84]
 - ヒトカシトニン: -CGNLSTCM LGTYTODFNK FHT----PP QTAICVGAP [配列番号85]
 - ヒトアドレノメデュリン: YRQSMNFGILRFQC-RRGTCT YQKLAHQIYQ FTDKDKDVA PRSKISFQGY [配列番号86]
 - ヒトインテルメジン: TORQLLRVGC-VLGTQ VQNLSHRIMO LMGFAGRODS APVDPSSPHSY [配列番号87]
- B**
- 由来のアルファ-CGRP
- ヒト: ACDTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSKAF [配列番号82]
 - アカガザル: ACDTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSKAF [配列番号82]
 - ラット: SCNTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSEAF [配列番号89]
 - マウス: SCNTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSEAF [配列番号89]
 - イノシシ: SCNTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTDVGSSEAF [配列番号91]
 - ヒツジ: SCNTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSOAF [配列番号92]
 - イヌ: SCNTATCV THRLAGLLSR SGGVYKKNFV PTNVGSEAF [配列番号93]

図8

【 図 10 】

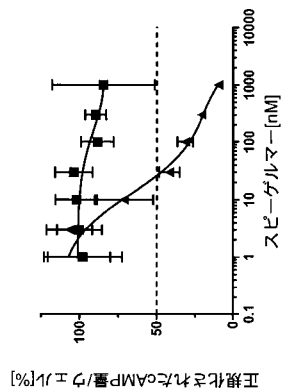


図10

【 図 1 1 A 】

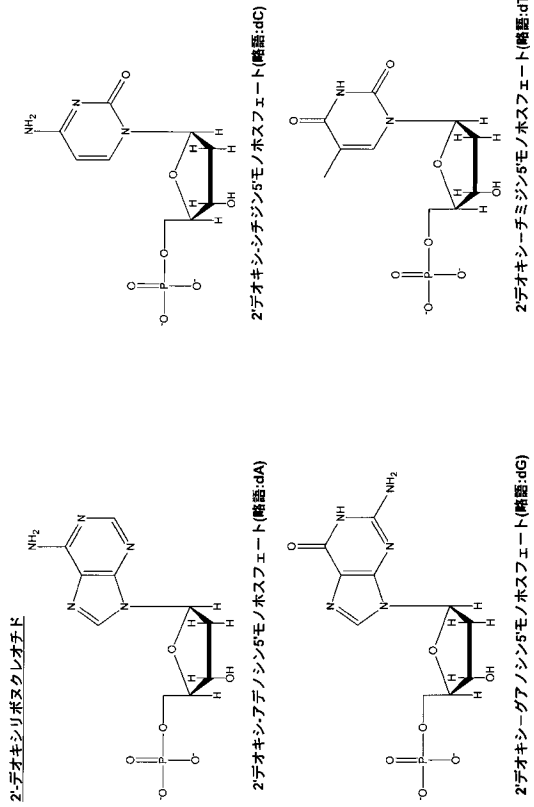


図11A

【 図 1 1 B 】

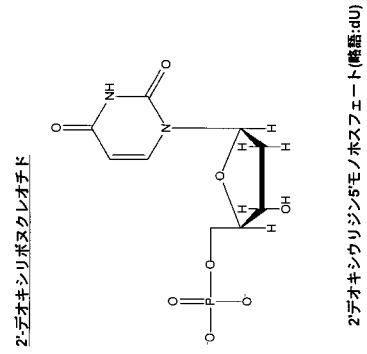


図11B

【 図 1 2 】

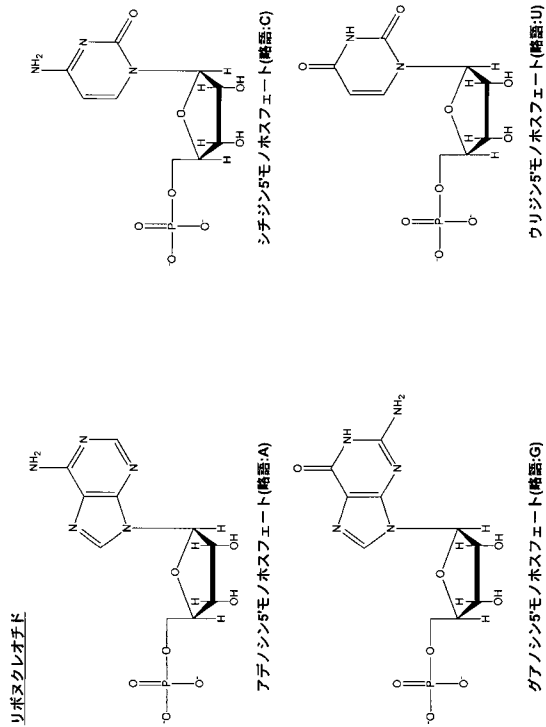
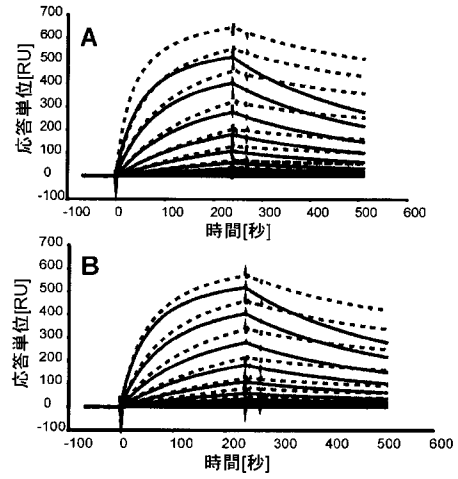


図12

【 図 1 3 】



	K_D [nM]
226-F2-001-D41 (AおよびB、実線)	0.5
226-F2-001-D41-dU20 (A、破線)	0.07
226-F2-001-D41-dU28 (B、破線)	0.21

図13

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/000055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N15/115 A61K31/7088 A61P25/06 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/093472 A2 (GRUENTHAL GMBH [DE]; NOXXON PHARMA AG [DE]; VATER AXEL [DE]; MAASCH) 13 November 2003 (2003-11-13) the whole document -----	1-54
Y	VATER AXEL ET AL: "Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 31, no. 21, 1 November 2003 (2003-11-01), pages e130-1, XP002524779, ISSN: 1362-4962, DOI: 10.1093/NAR/GNG130 figures 1,2,6 ----- -/--	1-54
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 April 2013		Date of mailing of the international search report 24/04/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/000055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EATON B E ET AL: "Post SELEX combinatorial optimization of aptamers", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 5, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 1087-1096, XP002985590, ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/S0968-0896(97)00044-8 page 1090 - page 1091 page 1095	1-54
Y	----- S. G. TREVINO ET AL: "Evolution of functional nucleic acids in the presence of nonheritable backbone heterogeneity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 33, 16 August 2011 (2011-08-16), pages 13492-13497, XP055021251, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1107113108 figure 2	1-54
Y	----- JUHL ET AL: "Effect of two novel CGRP-binding compounds in a closed cranial window rat model", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 567, no. 1-2, 24 May 2007 (2007-05-24), pages 117-124, XP022095320, ISSN: 0014-2999, DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2007.04.004 the whole document	1-54
Y	----- THOMAS DENEKAS ET AL: "Inhibition of stimulated meningeal blood flow by a calcitonin gene-related peptide binding mirror-image RNA oligonucleotide", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 148, no. 4, 24 April 2006 (2006-04-24), pages 536-543, XP55057955, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1038/sj.bjp.0706742 the whole document	1-54
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/000055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RECOBER ANA ET AL: "Calcitonin gene-related peptide: an update on the biology", CURRENT OPINION IN NEUROLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 22, no. 3, June 2009 (2009-06), pages 241-246, XP008119807, ISSN: 1350-7540, DOI: 10.1097/WCO.0B013E32832B2427 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>VATER A ET AL: "TOWARD THIRD-GENERATION APTAMERS: SPIEGELMERS AND THEIR THERAPEUTIC PROSPECTS", CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 6, no. 2, March 2003 (2003-03), pages 253-261, XP008031617, ISSN: 1367-6733 the whole document</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>BUNKA D H ET AL: "Development of aptamer therapeutics", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 10, no. 5, 17 July 2010 (2010-07-17), pages 557-562, XP027289412, ISSN: 1471-4892 [retrieved on 2010-09-15] table 1</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>ULRICH H: "RNA APTAMERS: FROM BASIC SCIENCE TOWARDS THERAPY", HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, no. 173, 2006, pages 305-326, XP001249105, ISSN: 0171-2004 figure 4</p> <p>-----</p>	1-54
A	<p>PAUL L. DURHAM: "Inhibition of Calcitonin Gene-Related Peptide Function: A Promising Strategy for Treating Migraine", HEADACHE, vol. 48, no. 8, September 2008 (2008-09), pages 1269-1275, XP55057969, ISSN: 0017-8748, DOI: 10.1111/j.1526-4610.2008.01215.x the whole document</p> <p>-----</p>	1-54

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/000055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JAGAT R. KANWAR ET AL: "Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery", CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 28 September 2011 (2011-09-28), pages 1-19, XP055058076, ISSN: 1040-9238, DOI: 10.3109/10409238.2011.614592 page 461; figure 1	1-54
X,P	----- WO 2012/095303 A1 (NOXXON PHARMA AG [DE]; JAROSCH FLORIAN [DE]; KLUSSMANN SVEN [DE]; SELL) 19 July 2012 (2012-07-19) example 2 -----	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/000055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03093472	A2	13-11-2003	
		AU 2003239841 A1	17-11-2003
		EP 1501929 A2	02-02-2005
		US 2006183700 A1	17-08-2006
		WO 03093472 A2	13-11-2003

WO 2012095303	A1	19-07-2012	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 25/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 0 1 A	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
	G 0 1 N 33/15 Z	

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

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(74)代理人 100154298

弁理士 角田 恭子

(74)代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74)代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74)代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(74)代理人 100179154

弁理士 児玉 真衣

(74)代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74)代理人 100184424

弁理士 増屋 徹

(72)発明者 シュルツヒェン, ジモーネ

ドイツ連邦共和国, 1 2 4 8 9 ベルリン, ホフマンシュトラッセ 7

(72)発明者 プルシュケ, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国, 1 3 3 5 9 ベルリン, ヴリーツェナー・シュトラッセ 3 0

(72)発明者 ヤロシュ, フロリアン
 ドイツ連邦共和国, 1 3 4 6 9 ベルリン, デュスターハウプトシュトラッセ 4 2

(72)発明者 ヘーリッヒ, カイ
 ドイツ連邦共和国, 1 0 3 1 7 ベルリン, カスケルシュトラッセ 5 3

(72)発明者 マーシュ, クリステリアン
 ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 9 ベルリン, エルンストシュトラッセ 2 7

(72)発明者 クルースマン, スヴェン
 ドイツ連邦共和国, 1 0 5 8 5 ベルリン, トラゾルトシュトラッセ 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB20 CB01 CB17 DA14 FA29
 FB02 FB08 FB15 GC10
 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 HA11 HA14 HA17
 4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 CC02 CC10 FA12 GA08 GB10
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QQ61 QQ79 QQ94
 QR32 QR35 QR41 QR48 QR55 QR72 QS32 QS34 QX01
 4C084 AA13 NA14 ZA082 ZA362 ZA962 ZB072 ZB112 ZB262 ZC412
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA08 ZA36 ZA96
 ZB07 ZB11 ZB26 ZC41
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA19 BA54 CA40 DA30 EA50

专利名称(译)	与CGRP特异性结合的核酸		
公开(公告)号	JP2015506174A	公开(公告)日	2015-03-02
申请号	JP2014551569	申请日	2013-01-10
申请(专利权)人(译)	Nokuson制药股份公司		
[标]发明人	シュルツヒエンジモーネ プルシュケヴェルナー ヤロシュフロリアン ヘーリツヒカイ マーシュクリスティアン クルースマンズヴェン		
发明人	シュルツヒエン,ジモーネ プルシュケ,ヴェルナー ヤロシュ,フロリアン ヘーリツヒ,カイ マーシュ,クリスティアン クルースマン,ズヴェン		
IPC分类号	C12N15/115 C12N15/09 C07K14/575 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P25/06 A61P25/04 A61P29/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P9/00 A61K31/7088 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61P19/02 A61P25/04 A61P25/06 A61P29/00 C12N15/115 C12N2310/16 C12N2310/344 C12N2310/351 C12N2320/10 C12Q1/6876 C12N2310/321 C12N2310/3531 C12N2310/322 C12N2320/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.H C12N15/00.F C07K14/575 C12Q1/68.Z C12Q1/68.A C12M1/00.A C12M1/34.Z A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00.111 A61P25/06 A61P25/04 A61P29/00 A61P37/02 A61P19/02 A61P9/00 A61K31/7088 G01N33/53.M G01N33/543.501.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA14 2G045/FA29 2G045/FB02 2G045/FB08 2G045/FB15 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC10 4B029/FA12 4B029/GA08 4B029/GB10 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ94 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA082 4C084/ZA362 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA08 4C086/ZA36 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA19 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/EA50		
代理人(译)	河村 英文 中村綾子 角田恭子 田中宇 徳本光一 渡边淳		
优先权	2012000105 2012-01-10 EP PCT/EP2012/000089 2012-01-10 WO		
其他公开文献	JP2015506174A5		

摘要(译)

本发明涉及一种能够与CGRP结合的核酸分子，该核酸分子包含核苷酸的中央延伸，核苷酸的中央延伸为5''HWn 1 n 2 YGGAn 3 An 4 UMn 5 n 6 Yn 7 n 8 n 9 n 10 n 11 Kn 12 Rn 13 ADn 14 n 15 ARn 16 Un 17 Cn 18 n 19 Un 20 n 21 3'[SEQ ID NO : 99]，包括H，W，Y，G，A，U，M，B，K，R，D，C是核糖核苷酸，n 1 是R或dG，n 2 是U或dT，n 3 是K或dG，n 4 是C或dC，n 5 是M或dC，n 6 是B或dU，n 7 是N或dG，n 8 是Y或dT，n 9 为N或dC，N 10 是R或dG，n 11 是V或dA，n 12 是K或dT或dU，N 13 是G或dG，n 14 是A或dA，n 15 是U或dT，n 16 是R或dG，n 17 是Y或dC，n 18 是C或dC，n 19 是B或dC，n 20 是C或dC，n 21 是C或dC，dG，dT，dC，dA和dU是2'-脱氧核糖核苷酸。

序列号	序列	核苷酸	序列
001	212-C1-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
002	226-F2-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
003	212-F1-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
004	224-F4-001	L-RNA	GCCTCCCTCCGAACTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
005	224-F1-001	L-RNA	GCAGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
006	226-F4-002	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
007	226-F3-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
008	226-C2-002	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
009	226-C2-002	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
010	226-F4-002	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
011	226-F1-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
012	226-C3-001	L-RNA	CCGCGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
013	231-F1-001	L-RNA	GCAGCTGTCGAGACCTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
014	231-F2-001	L-RNA	GCCTCCCTCCGAACTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
015	231-C1-001	L-RNA	GCCTCCCTCCGAACTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG
016	231-C2-001	L-RNA	GCCTCCCTCCGAACTACCTGTCGAGTGGAAATGAGTCCCTCCACG