

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-543567

(P2009-543567A)

(43) 公表日 平成21年12月10日(2009.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 14/52 (2006.01)	C07K 14/52	4B024
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B063
A61K 31/713 (2006.01)	A61K 31/713	4C086
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 31/7088	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-519869 (P2009-519869)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月18日 (2007.7.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月19日 (2009.3.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/006387
 (87) 国際公開番号 W02008/009437
 (87) 国際公開日 平成20年1月24日 (2008.1.24)
 (31) 優先権主張番号 06014957.2
 (32) 優先日 平成18年7月18日 (2006.7.18)
 (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】 SDF-1 結合核酸

(57) 【要約】

本発明は A 型核酸分子、B 型核酸分子、C 型核酸分子、ならびに配列番号 142、配列番号 143、および配列番号 144 のいずれかに記載の核酸配列を有する核酸分子を含む群から選択され、好ましくは SDF-1 に結合する核酸分子に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A型核酸分子、B型核酸分子、C型核酸分子、ならびに配列番号142、配列番号143、および配列番号144のいずれかの核酸配列を有する核酸分子を含む群から選択され、好ましくはSDF-1に結合する核酸分子。

【請求項 2】

前記A型核酸分子が下記のコアヌクレオチド配列、

5' AAAGYRACAHGUMAAX_AUGAAAAGGUARC3' (配列番号19)
(式中、X_Aは不在またはAである)を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記A型核酸分子が、

5' AAAGYRACAHGUMA AUGAAAAGGUARC3' (配列番号20)

5' AAAGYRACAHGUMA AUGAAAAGGUARC3' (配列番号21)、

および、

5' AAAGYAACA HGUCAAUGAAAAGGUARC3' (配列番号22)

を含む群から選択されるコアヌクレオチド配列を含み、好ましくは前記コアヌクレオチド配列が5' AAAGYAACA HGUCAAUGAAAAGGUARC3' (配列番号22)を含む、請求項2に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記核酸分子が、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第1のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第2のストレッチを含む、請求項2および3のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記核酸分子が、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第2のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第1のストレッチを含む、請求項2および3のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記核酸分子が前記ヌクレオチドの第1のストレッチおよび前記ヌクレオチドの第2のストレッチを含み、前記ヌクレオチドの第1のストレッチおよび前記ヌクレオチドの第2のストレッチが任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに2本鎖構造が形成される、請求項4または5に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記2本鎖構造が4~6塩基対、好ましくは5塩基対からなる、請求項4~6のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' X₁X₂NNBV3' (配列番号44)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' BNB NX₃X₄3' (配列番号45)のヌクレオチド配列を含む、請求項4~7のいずれかに記載の核酸分子

(式中、X₁は不在もしくはRであり、X₂はSであり、X₃はSであり、X₄は不在もしくはYであるか、

または、

X₁は不在であり、X₂は不在もしくはSであり、X₃は不在もしくはSであり、X₄は不在である)。

【請求項 9】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' RSHRYR3' (配列番号23)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' YRYDSY3' (配列番号24)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のストレッチが5' GCUGUG3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' CGCAGC3'のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列を含む、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチが 5' X₂ B B B S 3' (配列番号 42) のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第 2 のストレッチが 5' S B B V X₃ 3' (配列番号 43) のヌクレオチド配列を含み (式中、X₂ は不在または S であり、X₃ は不在または S である)、

好ましくは、前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチは 5' C U 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 のストレッチは 5' C G C A G 3' のヌクレオチド配列を含むか、または前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチは 5' G C G U G 3' のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第 2 のストレッチは 5' C G C G C 3' のヌクレオチド配列を含む、請求項 4 ~ 8 のいずれかに記載の核酸分子。

10

【請求項 11】

前記核酸分子が配列番号 5 ~ 18、25 ~ 41、133、137、139 ~ 141 のいずれかの核酸配列を有する、請求項 2 ~ 10 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記 B 型核酸分子が下記のコアヌクレオチド配列、

5' G U G U G A U C U A G A U G U A D W G G C U G W U C C U A G U Y A G G 3' (配列番号 57)

を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記 B 型核酸分子が、

5' G U G U G A U C U A G A U G U A D U G G C U G A U C C U A G U C A G G 3' (配列番号 58)

のコアヌクレオチド配列を含む、請求項 12 に記載の核酸分子。

20

【請求項 14】

前記核酸分子が、5' 3' の方向に、ヌクレオチドの第 1 のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第 2 のストレッチを含む、請求項 12 および 13 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記核酸分子が、5' 3' の方向に、ヌクレオチドの第 2 のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第 1 のストレッチを含む、請求項 12 および 13 のいずれかに記載の核酸分子。

30

【請求項 16】

前記核酸分子が前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチおよび前記ヌクレオチドの第 2 のストレッチを含み、前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチおよび前記ヌクレオチドの第 2 のストレッチが任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに 2 本鎖構造が形成される、請求項 14 または 15 に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記 2 本鎖構造が 4 ~ 6 塩基対、好ましくは 5 塩基対からなる、請求項 14 ~ 16 のいずれかに記載の核酸分子。

40

【請求項 18】

前記ヌクレオチドの第 1 のストレッチが 5' X₁ X₂ S V N S 3' (配列番号 77) のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第 2 のストレッチが 5' B V B S X₃ X₄ 3' (配列番号 78) のヌクレオチド配列を含み (式中、X₁ は不在もしくは A であり、X₂ は G であり、X₃ は C であり、X₄ は不在もしくは U であるか、

または、

X₁ は不在であり、X₂ は不在もしくは G であり、X₃ は不在もしくは C であり、X₄ は不在である)、請求項 14 ~ 17 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 19】

50

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' X₁ G C R W G 3' (配列番号59)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' K R Y S C X₄ 3' (配列番号60)のヌクレオチド配列を含む(式中、X₁は不在またはAであり、X₄は不在またはUである)、請求項14~18のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項20】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' X₁ G C G U G 3' (配列番号75)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' U A C G C X₄ 3' (配列番号76)のヌクレオチド配列を含み(式中、X₁は不在またはAであり、X₄は不在またはUである)、

好ましくは、前記ヌクレオチドの第1のストレッチは5' A G 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のストレッチは5' U A C G C U 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項14~19のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項21】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' X₂ S S B S 3' (配列番号73)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' B V S S X₃ 3' (配列番号74)のヌクレオチド配列を含み(式中、X₂は不在またはGであり、X₃は不在またはCである)、

好ましくは、前記ヌクレオチドの第1のストレッチは5' G C G U G 3'のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチは5' U A C G C 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項14~18のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項22】

前記核酸分子が配列番号46~56、61~72、および132のいずれかの核酸配列を有する、請求項12~21のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項23】

前記C型核酸分子が、

G G U Y A G G G C U H R X_A A G U C G G (配列番号90)

(式中、X_Aは不在またはAである)のコアヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項24】

前記C型核酸分子が、

5' G G U Y A G G G C U H R A A G U C G G 3' (配列番号91)、

5' G G U Y A G G G C U H R A G U C G G 3' (配列番号92)、および、

5' G G U U A G G G C U H G A A G U C G G 3' (配列番号93)

を含む群から選択されるコアヌクレオチド配列を含み、好ましくは前記コアヌクレオチド配列が5' G G U U A G G G C U H G A A G U C G G 3' (配列番号93)を含む、請求項23に記載の核酸分子。

【請求項25】

前記核酸分子が、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第1のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第2のストレッチを含む、請求項23および24のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項26】

前記核酸分子が、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第2のストレッチ、前記コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第1のストレッチを含む、請求項23および24のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項27】

前記核酸分子が前記ヌクレオチドの第1のストレッチおよび前記ヌクレオチドの第2のストレッチを含み、前記ヌクレオチドの第1のストレッチの少なくとも一部分および前記ヌクレオチドの第2のストレッチの少なくとも一部分が任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに2本鎖構造が形成される、請求項25または26に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記第1のストレッチの長さおよび前記第2のストレッチの長さが個別に独立して0～17ヌクレオチド、好ましくは4～10ヌクレオチド、より好ましくは4～6ヌクレオチドである、請求項25～27のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 29】

前記2本鎖構造が、4～10塩基対、好ましくは4～6塩基対、より好ましくは5塩基対を含む、請求項27および28のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 30】

前記2本鎖構造が、連続する4～10塩基対、好ましくは連続する4～6塩基対、より好ましくは連続する5塩基対を含む、請求項29に記載の核酸分子。

10

【請求項 31】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' R K S B U S N V G R 3' (配列番号120)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' Y Y N R C A S S M Y 3' (配列番号121)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のストレッチが5' R K S B U G S V G R 3' (配列番号122)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' Y C N R C A S S M Y 3' (配列番号123)のヌクレオチド配列を含む、請求項25～30のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 32】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' X_S S S S V 3' (配列番号124)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' B S S S X_S 3' (配列番号125)のヌクレオチド配列を含む(式中、X_Sは不在またはSである)、請求項25～30のいずれかに記載の核酸分子。

20

【請求項 33】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' S S S S R 3' (配列番号130)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' Y S B S S 3' (配列番号131)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のストレッチが5' S G G S R 3' (配列番号126)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' Y S C C S 3' (配列番号127)のヌクレオチド配列を含む、請求項25～30および32のいずれかに記載の核酸分子。

30

【請求項 34】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' G C S G G 3' (配列番号128)のヌクレオチド配列を含み、前記ヌクレオチドの第2のストレッチが5' C C K G C 3' (配列番号129)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のストレッチが5' G C C G 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のストレッチが5' C C G G C 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項25～30、32および33のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 35】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' C G U G C G C U U G A G A U A G 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のストレッチが5' C U G A U U C U C A C G 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項25～30のいずれかに記載の核酸分子。

40

【請求項 36】

前記ヌクレオチドの第1のストレッチが5' U G A G A U A G 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のストレッチが5' C U G A U U C U C A 3'のヌクレオチド配列を含む、請求項25～30のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 37】

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

50

配列を含む、請求項 25 ~ 30 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 38】

前記核酸分子が配列番号 79 ~ 89、94 ~ 119、および 134 ~ 136 のいずれかの核酸配列を有する、請求項 23 ~ 37 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 39】

前記核酸分子が配列番号 142 ~ 144 のいずれかの核酸配列を有する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 40】

前記核酸分子が SDF - 1 に対するアンタゴニストである、請求項 1 ~ 39 のいずれかに記載の核酸分子。

10

【請求項 41】

前記核酸分子が SDF - 1 受容体系のアンタゴニストであり、好ましくは SDF - 1 受容体系の SDF - 1 受容体が CXCR4 受容体である、請求項 1 ~ 39 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 42】

前記 SDF - 1 がヒト SDF - 1 であり、および / または前記 SDF - 1 受容体系の前記 SDF - 1 受容体がヒト SDF - 1 受容体である、請求項 1 または 41 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 43】

前記 SDF - 1 が配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 42 のいずれかに記載の核酸分子。

20

【請求項 44】

前記核酸分子が修飾を含む、請求項 1 ~ 43 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 45】

前記修飾が HES 部分および PEG 部分を含む群から選択される、請求項 44 に記載の核酸分子。

【請求項 46】

前記修飾が直鎖または分枝鎖の PEG からなる PEG 部分であり、前記 PEG 部分の分子量は好ましくは約 2 ~ 180 kD であり、より好ましくは約 60 ~ 140 kD であり、最も好ましくは約 40 kD である、請求項 45 に記載の核酸分子。

30

【請求項 47】

前記修飾が HES 部分であり、好ましくは前記 HES 部分の分子量が約 10 ~ 130 kD であり、より好ましくは約 30 ~ 130 kD であり、最も好ましくは約 100 kD である、請求項 45 に記載の核酸分子。

【請求項 48】

前記核酸の前記ヌクレオチドが L - ヌクレオチドであり、好ましくは配列番号 19、20、21、22、57、58、90、91、92 および 93 のいずれかの配列のヌクレオチドである、請求項 1 ~ 47 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 49】

請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸と任意選択的にさらなる構成成分とを含む医薬組成物であって、前記構成成分が、薬学的に許容可能な賦形剤と薬学的活性剤とを含む群から選択される医薬組成物。

40

【請求項 50】

薬物の製造のための請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸の使用。

【請求項 51】

前記薬物が疾患または障害の治療および / または予防のためのものであり、該疾患または障害が SDF - 1 により媒介され、好ましくは該疾患または障害は眼底の疾患、例えば糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性；乳房、卵巣、前立腺、膵臓、甲状腺、鼻咽頭、結腸、肺および胃の癌；骨肉腫；黒色腫；神経膠腫；髓芽腫および神経芽腫；白血病；WHIM 症候群；免疫不全症候群；病的血管形成；炎症；多発性硬化症；慢性関節リウマチ /

50

変形性関節症および腎炎を含む群から選択される、請求項 50 に記載の使用。

【請求項 52】

前記薬物が血管新生、血管形成、炎症および転移を抑制するためのものである、請求項 50 に記載の使用。

【請求項 53】

診断手段の製造のための請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸の使用。

【請求項 54】

前記診断手段が疾患の診断のためのものであり、該疾患が SDF - 1 により媒介され、好ましくは該疾患は眼底の疾患、例えば糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性；乳房、卵巣、前立腺、膵臓、甲状腺、鼻咽頭、結腸、肺および胃の癌；骨肉腫；黒色腫；神経膠腫；髓芽腫および神経芽腫；白血病；WHIM 症候群；免疫不全症候群；病的血管新生；炎症；多発性硬化症；慢性関節リウマチ / 変形性関節症および腎炎を含む群から選択される、請求項 53 に記載の使用。

10

【請求項 55】

前記診断手段が血管新生、血管形成、炎症および / または転移の診断のためのものである、請求項 53 に記載の使用。

【請求項 56】

SDF - 1 と、請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸とを含む複合体であって、好ましくは前記複合体が結晶性の複合体である複合体。

【請求項 57】

SDF - 1 の検出のための請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸の使用。

20

【請求項 58】

候補 SDF - 1 アンタゴニストおよび / または候補 SDF - 1 アゴニストを提供するステップと、

請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸を提供するステップと、

SDF - 1 アンタゴニストおよび / または SDF - 1 アゴニストの存在下でシグナルを与える試験系を提供するステップと、

前記候補 SDF - 1 アンタゴニストが SDF - 1 アンタゴニストであるかどうか、および / または前記候補 SDF - 1 アゴニストが SDF - 1 アゴニストであるかどうかを決定するステップと

30

を含む、SDF - 1 アンタゴニストまたは SDF - 1 アゴニストをスクリーニングするための方法。

【請求項 59】

相、好ましくは固相に固定化された SDF - 1 を提供するステップと、

請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸、好ましくは標識された請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸を提供するステップと、

候補 SDF - 1 アゴニストおよび / または候補 SDF - 1 アンタゴニストを添加するステップと、

前記候補 SDF - 1 アゴニストが SDF - 1 アゴニストであるかどうか、および / または前記候補 SDF - 1 アンタゴニストが SDF - 1 アンタゴニストであるかどうかを決定するステップと

40

を含む、SDF - 1 アゴニストおよび / または SDF - 1 アンタゴニストをスクリーニングするための方法。

【請求項 60】

前記核酸が前記候補 SDF - 1 アゴニストにより、または候補 SDF - 1 アンタゴニストにより置き換えられているかどうかを評価されるように前記決定を実施することを特徴とする、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

請求項 1 ~ 48 のいずれかに記載の核酸を含む SDF - 1 の検出のためのキット。

【請求項 62】

50

請求項 58 ~ 60 のいずれかに記載の方法により得られる SDF - 1 アンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は C X C ケモカイン間質細胞誘導因子 - 1 (SDF - 1) に結合する核酸、および薬物の製造におけるその使用、および診断薬の製造におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ケモカインは 8 ~ 14 k D a の構造的に関連するヘパリン結合塩基性小型タンパク質のファミリーである。機能的にはそれらは炎症誘発性の機能、ホメオスタシスの機能、または二重の機能として分類できる (M o s e r , W o l f e t a l . , 2 0 0 4) 。炎症性のケモカインは病原体、サイトカイン、または成長因子により誘導され、感染、炎症、組織傷害および腫瘍の部位にエフェクター白血球を補充する。そのようなケモカインは白血球の補充、活性化、および増殖を調節する (S c h a l l a n d B a c o n , 1 9 9 4 ; S p r i n g e r , 1 9 9 5 ; B a g g i o l i n i , 1 9 9 8) 。ケモカインは好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、肥満細胞、T細胞およびB細胞の化学遊走を選択的に誘導する。その化学遊走作用に加えて、それらは応答性の細胞において他の作用、例えば細胞形状の変化、細胞内遊離カルシウムイオンの濃度の一過性の上昇、脱顆粒化、インテグリンのアップレギュレーション、生物活性脂質 (ロイコトリエン、プロスタグランジン、トロンボキサン) の形成、または呼吸バースト (病原性の生物または腫瘍細胞の破壊のための反応性酸素種の放出) を選択的に発揮することができる。即ち、別の炎症誘発性のメディエーターの放出、化学遊走、および感染症部位または炎症部位に向かう白血球の血管外溢出を惹起することにより、ケモカインは炎症応答の上昇を誘発する。一方ホメオスタシスケモカインは骨髄組織およびリンパ様組織において優先的に発現され、造血、免疫監視機構、および適応免疫応答に関与している (G o d e s s a r t , 2 0 0 5) 。

【0003】

4つの保存されたシステイン残基の最初の2つの配置に基づいて、ケモカインは4つのクラス、即ち、システインが直列になっている C C または (例えば) - ケモカイン、それらが1つの追加的なアミノ酸残基により分離されている C X C または - ケモカイン、ジスルフィド架橋1つのみを有する X C または ケモカイン (現在まで唯一示されているリンホタクチン / X C L 1) 、およびシステイン間の3つのアミノ酸残基を特徴とする C X 3 C - ケモカイン (唯一のクラスメンバーとしての膜結合フラクタルカイン (B a z a n , B a c o n e t a l . , 1 9 9 7)) に分類される。

【0004】

C X C ケモカイン、特にそのアミノ末端上にアミノ酸配列 E L R を担持している C X C ケモカインは主に好中球に作用する。好中球に対して活性である C X C ケモカインの例は I L - 8 / C X C L 8 、 G R O / C X C L 1 、 G R O / C X C L 2 、 および G R O / C X C L 3 、 N A P - 2 / C X C L 7 、 E N A - 7 8 / C X C L 5 、 S D F - 1 / C X C L 1 2 および G C P - 2 / C X C L 6 である。C C ケモカインはより大型種の白血球、例えば単球、マクロファージ、好酸球、好塩基球、並びに T および B リンパ球に作用する (O p p e n h e i m , Z a c h a r i a e e t a l . , 1 9 9 1 ; M i l l e r a n d K r a n g e l , 1 9 9 2 ; B a g g i o l i n i , D e w a l d e t a l . , 1 9 9 4 ; J o s e , G r i f f i t h s - J o h n s o n e t a l . , 1 9 9 4 ; P o n a t h , Q i n e t a l . , 1 9 9 6) 。これらの例は I - 3 0 9 / C C L 1 、 M C P - 1 / C C L 2 、 M C P - 2 / C C L 8 、 M C P - 3 / C C L 7 、 M C P - 4 / C C L 1 3 、 M I P - 1 / C C L 3 、 M I P - 1 / C C L 4 、 R A N T E S / C C L 5 、 および エオタキシ / C C L 1 1 である。

【0005】

ケモカインは7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体のスーパーファミリーに属する受容

体を介して作用する (GPCR; (Murphy, Baggiolini et al., 2000))。一般的に、ケモカインおよびケモカイン受容体の相互作用は、1つのケモカインが多くのケモカイン受容体と結合でき、逆に単一のケモカイン受容体は数種のケモカインと相互作用できるという点において無差別的な傾向を有する。CXCKケモカインに対する一部の公知の受容体は、GRO、GCP-2およびIL-8に結合するCXCR1と、GRO、GRO、GRO、ENA-78およびIL-8を含むケモカインに結合するCXCR2と、PF4、MIG、IP-10、およびI-TACを含むケモカインに結合するCXCR3と、SDF-1に応答してシグナルを送ることのみ現時点で公知のCXCR4と、BCA-1に応答してシグナルを送ることが分かっているCXCR5とを含む (Godessart, 2005)。

10

【0006】

SDF-1 (間質細胞由来因子-1であり、同義語はCXCL12、PBSF [プレB細胞成長刺激因子]、TPAR-1 [TPA抑制遺伝子1]、SCYB12、TLSF [胸腺リンパ腫細胞刺激因子]、HIRH [ヘパトーマにおいて低減するヒトインタークリン]である)はGタンパク質共役受容体CXCR4に結合して活性化するIL-8様ケモカイン (Salcedo, Wasserman et al., 1999; Salcedo and Oppenheim, 2003)に典型的なELRモチーフを含有しない血管新生性のCXCKケモカインである。ケモカインはN末端シグナル配列を担持するcDNAをクローニングすることによる (Tashiro, Tada et al., 1993)か、間質細胞株PA6により発現される場合に早期B細胞前駆体を刺激するその能力による (Nagasawa, Kikutani et al., 1994)か、またはタンパク質キナーゼC活性化物質テトラデカノイルホルボールアセテート (TPA)で処理したマウス胚線維芽細胞から構築したcDNAからの単離による (Jiang, Zhou et al., 1994)かのいずれかにより、独立して3つのグループにより発見されている。

20

【0007】

選択的スプライシングの結果として、SDF-1の2つの形態、即ちSDF-1 (68AA)およびC末端に4つの追加的残基を担持しているSDF-1が存在する (Shirozu, Nakano et al., 1995)。これらの2つのスプライス変形の生物学的意味は完全には理解されていない。

30

【0008】

異なる種に由来するSDF-1の間の配列の保存は顕著であり、ヒトSDF-1 (配列番号1)およびネズミSDF-1 (配列番号2)は実質的に同一である。18位にVからIへの単一の保存的变化があるのみである (Shirozu, Nakano et al., 1995)。SDF-1を大部分の他のケモカインと区別させる他の通常ではない特徴は選択性である。実際、SDF-1および受容体CXCR4は一對一の受容体-リガンド対を含むと考えられる。

【0009】

SDF-1 [8-68]にはあるNMR構造モデルが存在する (PDBアクセス、1SDF)。SDF-1は無秩序なN末端領域を有する単量体であることが分かっている。他のケモカインとの相違は、疎水性のコアの充填および表面電荷分布において主に観察されている (Crump, Gong et al., 1997)。

40

【0010】

SDF-1の生理学的活性。SDF-1受容体CXCR4は白血球、成熟樹状細胞、内皮細胞、脳細胞、および巨核球上で広範に発現するため、SDF-1の活性は多面的である。このケモカインは現在までに発見されているいずれの他のものよりも、最大範囲の生物学的機能を、特に免疫系外において示す。SDF-1の最も顕著な機能的作用を以下に示す。

【0011】

網膜の脈絡膜部分の血管形成部位への上皮細胞の帰巢および結合。SDF-1は眼組織

50

内の血管形成の間の脈絡膜への上皮細胞の帰巢に関与していることが分かっている。これらの細胞の厳密な役割はなお研究中であるが、公開されている仮説は、上皮細胞が異常な血管の形成に関与しているということである (Sengupta, Caballero et al., 2005)。

【0012】

造血。SDF-1は成人の骨髄における造血前駆 (CD34+) 細胞を維持するために必要である。AMD3100、即ち選択的CXCR4アンタゴニストは造血幹細胞移植のためにCD34+を動員させるために使用できる。CD34+細胞は間質細胞により生産されるSDF-1の勾配の方へインビトロおよびインビボで遊走する (Aiuti, Webb et al., 1997)。

10

【0013】

B細胞の発達および化学遊走。SDF-1はプレB細胞の増殖を支援し、骨髄B細胞前駆体の成長を増強する (Nagasawa, Kikutani et al., 1994)。それはプレB細胞およびプロB細胞の特定の遊走を誘導するが、成熟B細胞に対しては顕著な化学誘引物質としては作用しない (D'Apuzzo, Rolink et al., 1997; Bleul, Schultze et al., 1998)。SDF-1は二次リンパ様組織内のB細胞の位置決めのために重要であると推測される。

【0014】

T細胞化学遊走。SDF-1は最も効率的なT細胞走化性因子の1つであり；多くのT細胞サブセット上に存在する (Bleul, Farzan et al., 1996)。

20

【0015】

胚の発生。SDF-1およびその受容体CXCR4は胚の発生に必須である。SDF-1およびCXCR4のノックアウトマウスは周産期に死亡し、それらはB細胞と骨髄様前駆体の減数以外に心室隔壁欠損または異常な小脳の発達も呈する (Nagasawa, Hirota et al., 1996; Ma, Jones et al., 1998; Zou, Kottmann et al., 1998)。SDF-1はまた胚形成の間の血液の発生の正常な個体発生のためにも必要である (Juarez and Bendall, 2004)。

【0016】

HIV感染。SDF-1はまたCXCR4を有する細胞株内へのT細胞向性HIV-1進入を抑制することができ、ヒトSDF-1遺伝子の多形がエイズの発症に影響を与えることから、SDF-1の発現はエイズの病因に対して重要な関連性を有すると考えられる (Bleul, Farzan et al., 1996)。

30

【0017】

SDF-1またはその受容体CXCR4の改変された発現レベルまたはこれらの分子に対する改変された応答は多くのヒトの疾患、例えば網膜症 (Brooks, Caballero et al., 2004; Butler, Guthrie et al., 2005; Meleth, Agron et al., 2005)、乳癌 (Muller, Homey et al., 2001; Cabioglu, Sahin et al., 2005)、卵巣癌 (Scotton, Wilson et al., 2002)、膵臓癌 (Koshihara, Hosotani et al., 2002)、甲状腺癌 (Hwang, Chung et al., 2003)、鼻咽頭癌 (Wang, Wu et al., 2005)、神経膠腫 (Zhou, Larsen et al., 2002)、神経芽種 (Geminder, Sagi-Assif et al., 2001)、B細胞慢性リンパ性白血病 (Burger, Tsukada et al., 2000)、WHIM症候群 (疣贅、低グロブリン血症、感染症、骨髄カテクシス (myelokathexis)) (Gulino, Moratto et al., 2004; Balabaniyan, Lagane et al., 2005; Kawai, Choi et al., 2005)、免疫不全症候群 (Arya, Ginsberg et al., 1999; Marechal, Arenzana-Seisdedos et al., 1999;

40

50

Soriano, Martinez et al., 2002)、病的血管形成 (Salvucci, Yao et al., 2002; Yamaguchi, Kusano et al., 2003; Grunewald, Avraham et al., 2006)、炎症 (Murdoch, 2002; Fedyk, Jones et al., 2001; Wang, Guan et al., 2001)、多発性硬化症 (Krumbholz, Theil et al., 2006); 慢性関節リウマチ/変形性関節症 (Buckley, Amft et al., 2000; Kanbe, Takagishi et al., 2002; Grassi, Cristino et al., 2004) に関連している。

【0018】

実験動物のセッティングにおいては、SDF-1 またはその受容体のアンタゴニストは異なる起源、例えば、膵臓 (Guleng, Tateishi et al., 2005; Saur, Seidler et al., 2005)、結腸 (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2003; Guleng, Tateishi et al., 2005)、乳房 (Muller, Homey et al., 2001; Lapteva, Yang et al., 2005)、肺 (Phillips, Burdick et al., 2003)、神経膠芽腫/髄芽腫 (Rubin, Kung et al., 2003)、前立腺 (Sun, Schneider et al., 2005)、骨肉腫 (Perissinotto, Cavalloni et al., 2005)、黒色腫 (Takenaga, Tamamura et al., 2004)、胃 (Yasumoto, Koizumi et al., 2006)、多発性骨髄腫 (Menu, Asosingh et al., 2006) に由来するヒト癌細胞の成長および/または転移拡張をブロックするために効率的であることが分かっている。

【0019】

更にまた、抗SDF-1療法は網膜の血管形成 (Butler, Guthrie et al., 2005)、腎炎 (Balabanian, Couderc et al., 2003) および関節炎 (Matthys, Hatse et al., 2001; Tamamura, Fujisawa et al., 2004; De Klerck, Geboes et al., 2005) を予防する場合に動物モデルにおいて有益であった。

【0020】

SDF-1 は眼底の疾患、例えば糖尿病性網膜症 (DR) (Fong, Aiello et al., 2004) および加齢性黄斑変性 (AMD) (Ambati, Anand et al., 2003) の病状においても役割を果たしている。これらの疾患は両者とも眼を損傷し、徐々に視力を喪失させ、最悪の場合は盲目に至る。損傷は脈絡膜血管形成 (CNV) として知られているプロセスである眼底の血管の不適切な成長に起因する。CNVの間、脈絡膜から発生した新しい血管がブルーフ膜を經由して網膜下色素上皮 (サブRPE) または網膜下腔に遊走する。

【0021】

異常な血管は網膜下で出血 (網膜内出血) または液体漏出を起こす場合がある。これが瘢痕を残し、黄斑を上昇させ、視界を歪曲する。

【0022】

SDF-1 は、眼への内皮前駆細胞 (EPC) の補充を介してCNVにおいて役割を果たしていると考えられる。これらの前駆細胞が次に異常な血管における重要な構成成分となる。

【0023】

糖尿病性網膜症は糖尿病の主要な続発症であり、1型および2型の両方の糖尿病患者において頻発する。米国には約1600万人の糖尿病患者が存在し、うち約8百万人は糖尿病性網膜症の何らかの形態を有する。増殖性の糖尿病性網膜症 (PDR) が未治療のまま放置されると、患者の約60%は5年以内に片方または両方の眼が失明する。北米、欧州

10

20

30

40

50

および多くの新興国において糖尿病の発症が激増しているため、患者人口は急速に増加している。例えば失明の発生率は一般集団よりも糖尿病患者において25倍高い値である。更にまた、糖尿病性網膜症(DR)は中年において失明の最も一般的な原因であり、毎年米国における全ての新症例の少なくとも12パーセントに相当している。糖尿病患者の視力をモニタリングし、使用可能な治療が随時提供できるようにスクリーニングプログラムが設けられている。

【0024】

糖尿病性網膜症の直接の原因はほとんど理解されていないが、疾患は原因の組み合わせ、即ち網膜血流の自己調節の減損、網膜細胞内部のソルビトールの蓄積、および細胞外液中の進行型グリコシル化最終生成物の蓄積に起源を有すると考えられている。これらの要因の全ては血流中の糖の存在量である高血糖に直接または間接的に関係している。

10

【0025】

DRの症状はAMDの症状と同様である。患者は網膜内の細胞を喪失し、網膜の基底膜内に微小動脈瘤(血流)が生じる。更にまた、VEGF、IGF-1および他の血液媒介の因子が、恐らくはSDF-1も含めて、新しい血管細胞を誘引し、損傷性血管の形成を支援する。

【0026】

加齢性黄斑変性(AMD)は人間の中心視野を破壊する。疾患の早期の段階は、症状が患者間で変動するため認識できない場合さえある。ある場合は、患者は片目のみ罹患する。あるいは、両眼の視力が減損するが、顕著ではない場合もある。疾患は歪曲または誤った色彩知覚をもたらす。視野の中心に暗部が生じる場合が多い。

20

【0027】

疾患の病因(経過)はほとんど理解されていない。AMDはしばしば網膜の最外層の加齢と考えられている。物理的改変が、最も鋭い視覚を担っている網膜の部分である黄斑としても知られている網膜の中心部に生じる。

【0028】

湿性のAMDは疾患の乾性形態の続発症として始まる。患者のほぼ90%がAMDの乾性形態に罹患し、これは黄斑組織の薄片化およびその色素沈着の攪乱をもたらす。残りは湿性形態を有し、これは上記の出血を伴っている。

【0029】

AMDの湿性形態は新規な治療方法の理想的な市場であり、既に55歳超の人々における失明の最大原因であるAMDは65~74歳の米国人口の推定4%~5%および75歳以上の約10%が罹患している。この疾患を有する80歳超の人々は米国単独で既に5百万人が存在し、更に5百万人が2020年までに罹患すると推定される。

30

【0030】

腫瘍は癌細胞の単なる塊ではなく、免疫細胞による腫瘍の浸潤が癌の1つの特徴である。多くのヒトの癌はこの浸潤の程度および表現型、並びに腫瘍の成長、生存および遊走、および血管新生に影響する複雑なケモカインネットワークを有する。大部分の固形腫瘍は多くの非悪性の間質細胞を含む。実際、間質細胞は場合により癌細胞より多数となる場合がある。癌において見出される主要な間質細胞はマクロファージ、リンパ球、内皮細胞および線維芽細胞である。

40

【0031】

異なる種々の癌の型に由来する悪性の細胞は、ケモカイン受容体発現の異なるプロファイルを有するが、SDF-1受容体CXCR4はマウスおよびヒトにおいて最も一般的に見出され、上皮、間葉および造血を原発とするヒト癌の少なくとも23の異なる種類の型に由来する腫瘍細胞はCXCR4を発現する(Balkwill, 2004)。SDF-1はCXCR4に関する唯一の既知のリガンドである。これが構成的に発現する骨髄および二次リンパ様組織の他に、SDF-1はリンパ腫における原発腫瘍部位(Corcione, Ottoneillo et al., 2000)および神経細胞株および星状細胞株の両方の脳腫瘍において見出される。更にまた、これは卵巣癌(Scotton, Wi

50

lson et al., 2002) および膵臓癌 (Koshihara, Hosotani et al., 2000) 並びに乳癌の転移部位 (Muller, Homey et al., 2001) および甲状腺癌 (Hwang, Chung et al., 2003)、神経芽腫および悪性血液疾患 (Geminder, Sagi-Assif et al., 2001) において高レベルで存在する。これとは対照的に、CXCR4の発現は正常な乳房 (Muller, Homey et al., 2001)、卵巣 (Scotton, Wilson et al., 2002) および前立腺の上皮 (Sun, Schneider et al., 2005) においては低値であるか存在しない。即ちCXCR4の発現は悪性上皮細胞の一般的特徴であり、その正常な対応物においては一般的特徴ではないと考えられる。

10

【0032】

腫瘍細胞上のケモカイン受容体シグナリングを抑制することは、成長停止またはアポトーシスを誘導し、侵襲および転移をインビボで予防するという潜在性を有する。

【0033】

siRNAによるCXCR4のノックダウンは、乳癌の成長を停止させた (Lapteva, Yang et al., 2005)。CXCR4の表面発現を防止する構築物でトランスフェクトしたTハイブリドーマ細胞は、マウスに静脈内注射した場合に遠位の臓器にはもはや転移できなかった (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2001)。結腸直腸癌細胞を用いた同様の実験において肺および肝臓への転移が大きく低減された (Zeelenberg, Ruuls-Van Stalle et al., 2003)。抗CXCR4抗体はリンパ節への乳癌異種移植片の拡張を抑制した (Muller, Homey et al., 2001)。抗CXCR4抗体または抗SDF-1抗体を用いたリンパ芽球様細胞の治療は (NOD) / SCIDマウスにおける腫瘍成長を遅延させた (Bertolini, Dell'Agnoia et al., 2002)。抗SDF-1抗体は非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞の臓器転移の発生を抑制した (Phillips, Burdick et al., 2003)。CXCR4アンタゴニストAMD3100 (Anormed) の全身投与は頭蓋内神経膠芽腫および髄芽腫の異種移植片の成長を抑制し、24時間以内の腫瘍細胞アポトーシスを増大させた (Rubin, Kung et al., 2003)。抗SDF-1抗体は癌腫関連線維芽細胞と混合したMCF-7乳癌細胞の成長を抑制した (Orimo, Gupta et al., 2005)。抗体によるCXCR4の中和は骨部位における前立腺癌の転移および成長をブロックした (Sun, Schneider et al., 2005)。骨肉腫細胞の注射後の肺転移の発生はペプチドCXCR4アンタゴニストT134の投与により予防された (Perissinotto, Cavalloni et al., 2005)。

20

30

【0034】

別の著者らはSDF-1 / CXCR4系にターゲティングすることは癌患者に対して新しい治療の選択肢を提供し得ると結論付けている。

【0035】

ヒト卵巣腫瘍はSDF-1を強力に発現することに加えて、VEGFもより低レベルで発現する。両方のタンパク質は腫瘍における低酸素により誘発される。タンパク質単独のいずれの病理学的濃度もインビボで血管新生を誘導するために十分ではなかったが、併用されれば病理学的濃度のSDF-1とVEGFは血管形成を効率的かつ相乗作用的に誘導している。即ち、VEGF単独よりはむしろこの相乗作用的な系を遮断することが、癌治療のための新規で効率的な抗血管新生の方策となり得る (Kryczek, Lange et al., 2005)。

40

【0036】

乳癌細胞株は、オートクリンSDF-1 / CXCR4シグナリング経路を備えているとき攻撃的な挙動を呈する。これにはより高速の成長を伴った侵襲性と遊走の増大が包含される。即ちSDF-1 / CXCR4系は攻撃的な性質を予測するための重要な情報を与え

50

得るものであり、ヒト乳癌における重要な治療標的を構成する (Kang, Watkins et al., 2005)。

【0037】

高レベルのCXCR4を発現する小細胞肺癌 (SCLC) 細胞の遊走および転移はSDF-1により調節される。CXCR4の活性化は、腫瘍の微小環境内における補助細胞 (例えば間質細胞) および細胞外マトリックス分子への接着を増進する。これらの接着相互作用は化学療法へのSCLC細胞の抵抗性の増大をもたらす。即ち、SDF-1/CXCR4系の抑制剤は、SCLC細胞の化学療法感受性を増大させ、SCLCを有する患者に対する新しい治療法をもたらす場合がある (Hartmann, Burger et al., 2004)。

10

【0038】

SDF-1/CXCR4系は身体における幹細胞の種々の型のトラフィックングの中核的調節物質として生じる。全てではないが大部分の悪性疾患は幹細胞/前駆細胞のコンパートメントから発生しているため、癌の幹細胞もまたその表面上でCXCR4を発現し、その結果、SDF-1/CXCR4系はそのトラフィックング/転移をSDF-1を発現する臓器 (例えばリンパ節、肺、肝臓、骨) に指向させることに関与している。結果として、SDF-1/CXCR4系を調節することを目標とした方策は、組織に正常な幹細胞を送達するための再生医療における場合、癌幹細胞の転移を抑制するための臨床的腫瘍学における場合の双方において、重要な臨床用途を有する (Kucia, Reca et al., 2005)。

20

【0039】

本発明に潜在的に存在する課題はSDF-1に対する特異的アンタゴニストを提供することである。本発明に潜在的に存在する課題の別の態様はSDF-1およびCXCR4受容体がそれぞれ関与する疾患および障害の治療のための化合物を提供することである。

【0040】

本発明に潜在的に存在する別の課題はSDF-1の特異的検出のための方法を提供することである。

【0041】

本発明に潜在的に存在する課題は独立請求項の構成要件により解決される。好ましい実施形態は独立請求項から誘導される。

30

【0042】

第1の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は、A型核酸分子、B型核酸分子、C型核酸分子、ならびに配列番号142、配列番号143、および配列番号144のいずれかの核酸配列を有する核酸分子を含む群から選択され、好ましくはSDF-1に結合する核酸分子により解決される。

【0043】

ある実施形態において、A型核酸分子は下記のコアヌクレオチド配列、
5' AAAGYRACAHGUMAAX_AUGAAAGGUARC3' (配列番号19)
(式中、X_Aは不在またはAである)を含む。

【0044】

好ましい実施形態においては、A型核酸分子は、
5' AAAGYRACAHGUMA AUGAAAGGUARC3' (配列番号20)、
5' AAAGYRACAHGUMA AUGAAAGGUARC3' (配列番号21)、
および、
5' AAAGYAACA HGUCA AUGAAAGGUARC3' (配列番号22)
を含む群から選択されるコアヌクレオチド配列を含み、好ましくはコアヌクレオチド配列が5' AAAGYAACA HGUCA AUGAAAGGUARC3' (配列番号22)を含む。

40

【0045】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第1のス

50

トレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第2のストレッチを含む。

【0046】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第2のストレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第1のストレッチを含む。

【0047】

好ましい実施形態においては、核酸分子はヌクレオチドの第1のストレッチおよびヌクレオチドの第2のストレッチを含み、該ヌクレオチドの第1のストレッチおよび該ヌクレオチドの第2のストレッチは任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに2本鎖構造が形成される。

【0048】

別の好ましい実施形態においては、2本鎖構造は4~6塩基対、好ましくは5塩基対からなる。

【0049】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₁ X₂ N N B V 3' (配列番号44)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' B N B N X₃ X₄ 3' (配列番号45)のヌクレオチド配列を含む (式中、X₁は不在もしくはRであり、X₂はSであり、X₃はSであり、X₄は不在もしくはYであるか、

または、

X₁は不在であり、X₂は不在もしくはSであり、X₃は不在もしくはSであり、X₄は不在である)。

【0050】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' R S H R Y R 3' (配列番号23)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' Y R Y D S Y 3' (配列番号24)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のストレッチは5' G C U 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のストレッチは5' C G C A G C 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0051】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₂ B B B S 3' (配列番号42)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' S B B V X₃ 3' (配列番号43)のヌクレオチド配列を含み、 (式中、X₂は不在またはSであり、X₃は不在またはSである)

好ましくは、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' C U 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のストレッチは5' C G C A G 3'のヌクレオチド配列を含むか、またはヌクレオチドの第1のストレッチは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のストレッチは5' C G C G C 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0052】

ある実施形態においては、核酸分子は配列番号5~18、25~41、133、137、139~141のいずれかに記載の核酸配列を有する。

【0053】

ある実施形態においては、B型核酸分子は下記のコアヌクレオチド配列、
5' G U G U G A U C U A G A U G U A D W G G C U G W U C C U A G U Y A G G 3' (配列番号57)を含む。

【0054】

好ましい実施形態においては、B型核酸分子は、
G U G U G A U C U A G A U G U A D U G G C U G A U C C U A G U C A G G (配列番号58)

10

20

30

40

50

のコアヌクレオチド配列を含む。

【0055】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第1のストレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第2のストレッチを含む。

【0056】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第2のストレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第1のストレッチを含む。

【0057】

好ましい実施形態においては、核酸分子はヌクレオチドの第1のストレッチおよびヌクレオチドの第2のストレッチを含み、該ヌクレオチドの第1のストレッチおよび該ヌクレオチドの第2のストレッチは任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに2本鎖構造が形成される。

10

【0058】

ある実施形態においては、2本鎖構造は4~6塩基対、好ましくは5塩基対からなる。

【0059】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₁ X₂ S V N S 3' (配列番号77)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' B V B S X₃ X₄ 3' (配列番号78)のヌクレオチド配列を含む (式中、X₁は不在もしくはAであり、X₂はGであり、X₃はCであり、X₄は不在もしくはUであるか、

20

または、

X₁は不在であり、X₂は不在もしくはGであり、X₃は不在もしくはCであり、X₄は不在である)。

【0060】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₁ G C R W G 3' (配列番号59)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' K R Y S C X₄ 3' (配列番号60)のヌクレオチド配列を含む (式中、X₁は不在またはAであり、X₄は不在またはUである)。

【0061】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₁ G C G U G 3' (配列番号75)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' U A C G C X₄ 3' (配列番号76)のヌクレオチド配列を含み (式中、X₁は不在またはAであり、X₄は不在またはUである)、

30

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

【0062】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X₂ S S B S 3' (配列番号73)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' B V S S X₃ 3' (配列番号74)のヌクレオチド配列を含み (式中、X₂は不在またはGであり、X₃は不在またはCである)、

40

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

【0063】

ある実施形態においては、核酸分子は配列番号46~56、61~72、および132のいずれかの核酸配列を有する。

【0064】

ある実施形態においては、C型核酸分子は下記、

G G U Y A G G G C U H R X_A A G U C G G (配列番号90)

50

(式中 X_A は不在または A である) のコアヌクレオチド配列を含む。

【0065】

好ましい実施形態においては、C型核酸分子は下記、

5'GGUYAGGGCUHRAAGUCGG3' (配列番号91)、

5'GGUYAGGGCUHRAAGUCGG3' (配列番号92)、および、

5'GGUUAGGGCUHGAAGUCGG3' (配列番号93)

を含む群から選択されるコアヌクレオチド配列を含み、好ましくはコアヌクレオチド配列は5'GGUUAGGGCUHGAAGUCGG3' (配列番号93)を含む。

【0066】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第1のストレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第2のストレッチを含む。

【0067】

ある実施形態においては、核酸分子は、5' 3'の方向に、ヌクレオチドの第2のストレッチ、コアヌクレオチド配列、およびヌクレオチドの第1のストレッチを含む。

【0068】

好ましい実施形態においては、核酸分子はヌクレオチドの第1のストレッチおよびヌクレオチドの第2のストレッチを含み、該ヌクレオチドの第1のストレッチの少なくとも一部分および該ヌクレオチドの第2のストレッチの少なくとも一部分は任意選択的に相互にハイブリダイズし、これによりハイブリダイゼーションのときに2本鎖構造が形成される。

【0069】

ある実施形態においては、第1のストレッチの長さおよび第2のストレッチの長さは個別に独立して0~17ヌクレオチド、好ましくは4~10ヌクレオチド、より好ましくは4~6ヌクレオチドである。

【0070】

ある実施形態においては、2本鎖構造は、4~10塩基対、好ましくは4~6塩基対、より好ましくは5塩基対を含む。

【0071】

好ましい実施形態においては、2本鎖構造は、連続する4~10塩基対、好ましくは連続する4~6塩基対、より好ましくは連続する5塩基対を含む。

【0072】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5'RKSBUSNVGR3' (配列番号120)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5'YYNRCASSMY3' (配列番号121)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のストレッチは5'RKSBUGSVGR3' (配列番号122)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5'YCNRCASSMY3' (配列番号123)のヌクレオチド配列を含む。

【0073】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' X_S SSSV3' (配列番号124)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5'BSSS X_S 3' (配列番号125)のヌクレオチド配列を含む(式中、 X_S は不在またはSである)。

【0074】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5'SSSSR3' (配列番号130)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5'YSBSS3' (配列番号131)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のストレッチは5'SGGSR3' (配列番号126)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5'YSCCS3' (配列番号127)のヌクレオチド配列を含む。

【0075】

10

20

30

40

50

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' G C S G G 3' (配列番号128)のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' C C K G C 3' (配列番号129)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のストレッチは5' G C C G G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' C C G G C 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0076】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' C G U G C G C U U G A G A U A G G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' C U G A U U C U C A C G 3'のヌクレオチド配列を含む。

10

【0077】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' U G A G A U A G G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' C U G A U U C U C A 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0078】

ある実施形態においては、ヌクレオチドの第1のストレッチは5' G A G A U A G G 3'のヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチドの第2のストレッチは5' C U G A U U C U C 3'のヌクレオチド配列を含む。

【0079】

ある実施形態においては、核酸分子は配列番号79~89、94~119、および134~136のいずれかの核酸配列を有する。

20

【0080】

ある実施形態においては、核酸分子は配列番号142~144のいずれかの核酸配列を有する。

【0081】

ある実施形態においては、核酸分子はSDF-1に対するアンタゴニストである。

【0082】

ある実施形態においては、核酸分子はSDF-1受容体系のアンタゴニストであり、好ましくはSDF-1受容体系のSDF-1受容体はCXCR4受容体である。

【0083】

ある実施形態においては、SDF-1はヒトSDF-1であり、および/またはSDF-1受容体系のSDF-1受容体はヒトSDF-1受容体である。

30

【0084】

ある実施形態においては、SDF-1は配列番号1に記載のアミノ酸配列を含む。

【0085】

ある実施形態においては、核酸分子は修飾を含む。

【0086】

好ましい実施形態においては、修飾はHES部分およびPEG部分を含む群から選択される。

【0087】

別の好ましい実施形態においては、修飾は直鎖または分枝鎖のPEGからなるPEG部分であり、PEG部分の分子量は好ましくは約2~180kDであり、より好ましくは約60~140kDであり、最も好ましくは約40kDである。

40

【0088】

ある実施形態においては、修飾はHES部分であり、好ましくはHES部分の分子量は約10~130kDであり、より好ましくは約30~130kDであり、最も好ましくは約100kDである。

【0089】

ある実施形態においては、核酸のヌクレオチドはL-ヌクレオチド、好ましくは配列番号19、20、21、22、57、58、90、91、92および93のいずれかの配列

50

のヌクレオチドである。

【 0 0 9 0 】

第 2 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は第 1 の態様に記載の核酸と任意選択的にさらなる構成成分とを含む医薬組成物であって、構成成分が薬学的に許容可能な賦形剤と薬学的活性剤とを含む群から選択される上記医薬組成物により解決される。

【 0 0 9 1 】

第 3 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は薬物の製造のための第 1 の態様に記載の核酸の使用により解決される。

【 0 0 9 2 】

第 3 の態様のある実施形態において、薬物は疾患または障害の治療および / または予防のためのものであり、該疾患または障害は S D F - 1 により媒介され、好ましくは該疾患または障害は眼底の疾患、例えば糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性；乳房、卵巣、前立腺、膵臓、甲状腺、鼻咽頭、結腸、肺および胃の癌；骨肉腫；黒色腫；神経膠腫；髓芽腫および神経芽腫；白血病；W H I M 症候群；免疫不全症候群；病的血管形成；炎症；多発性硬化症；慢性関節リウマチ / 変形性関節症および腎炎を含む群から選択される。

10

【 0 0 9 3 】

第 3 の態様のある実施形態において、薬物は血管新生、血管形成、炎症および転移を抑制するためのものである。

【 0 0 9 4 】

第 4 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は診断手段の製造のための第 1 の態様に記載の核酸の使用により解決される。

20

【 0 0 9 5 】

第 4 の態様のある実施形態において、診断手段は疾患の診断のためのものであり、該疾患は眼底の疾患、例えば糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性；乳房、卵巣、前立腺、膵臓、甲状腺、鼻咽頭、結腸、肺および胃の癌；骨肉腫；黒色腫；神経膠腫；髓芽腫および神経芽腫；白血病；W H I M 症候群；免疫不全症候群；病的血管形成；炎症；多発性硬化症；慢性関節リウマチ / 変形性関節症および腎炎を含む群から選択される。

【 0 0 9 6 】

第 4 の態様のある実施形態において、診断手段は血管新生、血管形成、炎症および / または転移の診断のためのものである。

30

【 0 0 9 7 】

第 5 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は、S D F - 1 と、第 1 の態様に記載の核酸とを含む複合体であって、好ましくは複合体が結晶性の複合体である上記複合体により解決される。

【 0 0 9 8 】

第 6 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は S D F - 1 の検出のための第 1 の態様に記載の核酸の使用により解決される。

【 0 0 9 9 】

第 7 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は、
候補 S D F - 1 アンタゴニストおよび / または候補 S D F - 1 アゴニストを提供するステップと、

40

第 1 の態様に記載の核酸を提供するステップと、

S D F - 1 アンタゴニストおよび / または S D F - 1 アゴニストの存在下にシグナルを与える試験系を提供するステップと、

候補 S D F - 1 アンタゴニストが S D F - 1 アンタゴニストであるかどうか、および / または候補 S D F - 1 アゴニストが S D F - 1 アゴニストであるかどうかを決定するステップと

を含む S D F - 1 アンタゴニストまたは S D F - 1 アゴニストをスクリーニングするための方法により解決される。

【 0 1 0 0 】

50

第 8 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は、

相、好ましくは固相に固定化された S D F - 1 を提供するステップ、

第 1 の態様に記載の核酸、好ましくは標識された第 1 の態様に記載の核酸を提供するステップと、

候補 S D F - 1 アゴニストおよび / または候補 S D F - 1 アンタゴニストを添加するステップと、

候補 S D F - 1 アゴニストが S D F - 1 アゴニストであるかどうか、および / または候補 S D F - 1 アンタゴニストが S D F - 1 アンタゴニストあるかどうかを決定するステップと、

を含む S D F - 1 アゴニストおよび / または S D F - 1 アンタゴニストをスクリーニングするための方法により解決される。

10

【 0 1 0 1 】

第 8 の態様のある実施形態において、核酸が候補 S D F - 1 アゴニストにより、または候補 S D F - 1 アンタゴニストにより置き換えられているかどうかの評価されるように決定が実施される。

【 0 1 0 2 】

第 9 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は第 1 の態様に記載の核酸を含む S D F - 1 の検出のためのキットにより解決される。

【 0 1 0 3 】

第 1 0 の態様において、本発明に潜在的に存在する課題は第 7 の態様または第 8 の態様に記載の方法により得られる S D F - 1 アンタゴニストにより解決される。

20

【 0 1 0 4 】

本発明は S D F - 1 に特異的に、高親和性で結合する核酸を形成することができるという意外な発見に基づいている。

S D F - 1 は配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する塩基性ペプチドである。S D F - 1 の計算された p I は 9 . 7 0 である。本明細書においては、S D F - 1 という用語ははいずれかの S D F - 1、例えば限定しないが哺乳類 S D F - 1 を指す。好ましくは、哺乳類 S D F - 1 はマウス S D F - 1、ラット S D F - 1、ウサギ S D F - 1、ハムスター S D F - 1、サル S D F - 1 およびヒト S D F - 1 を含む群から選択される。最も好ましくは、S D F - 1 はヒト S D F - 1 (配列番号 1) である。

30

【 0 1 0 5 】

S D F - 1 に対する高親和性結合核酸が識別可能であったという発見は、E a t o n e t a l . (E a t o n , G o l d e t a l . , 1 9 9 7) の観察によれば塩基性タンパク質に指向されたアプタマーの生成、即ち標的分子への D - 核酸の結合が、この種の標的が高い値ではあるが非特異的な信号対雑音比を生じるために一般的には非常に困難であったことからすれば、現時点において意外なことである。この高い信号対雑音比は S D F - 1 のような塩基性の標的に対する核酸により示される高値の非特異的親和性に起因している。

【 0 1 0 6 】

本発明による核酸の本明細書に記載する性質は、核酸を単独またはいずれかの組み合わせにおいて使用する本発明のいずれかの態様において理解することができる。

40

【 0 1 0 7 】

特定の理論に制約されないが、本発明者等は本発明による S D F - 1 結合核酸の観察された特異性が、何らかの構造的性質、および、特に、図 1 ~ 8 および実施例 1 を参照しながら後に詳細に考察するコア配列とも称するヌクレオチド配列の 1 つを共有すると推定する。しかしながら該図および実施例は本発明による核酸の各々およびいずれかにおいて必ずしも理解する必要はない該構造的性質のいくつかを組み込んでいる。

【 0 1 0 8 】

特許請求の範囲および実施例 1 においてより詳細に概説する通り、種々のヒト S D F - 1 結合核酸分子はそれぞれボックスおよびいくつかの構造的性質および要素に基づいて類

50

別できる。即ち定義される種々の分類は、本明細書においては型、より具体的にはA型、B型およびC型とも称する。

【0109】

好ましい実施形態においては、本発明による核酸は単一の核酸分子である。別の実施形態においては、単一の核酸分子は多数の単一の核酸分子として存在する。好ましくは核酸および核酸分子という用語は相反する指示が無い限り本明細書においては互換的に使用する。

【0110】

当業者に知られているように、好ましくは、本発明による核酸分子は、ホスホジエステル結合またはホスホジエステル結合部を好ましくは介して相互に共有結合されたヌクレオチドからなる。

10

【0111】

本発明による核酸はまた本明細書に開示した特定の配列と本質的に相同である核酸を含む。本質的に相同という用語は、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95%、96%、97%、98%、または99%を超える場合と理解してよい。

【0112】

本発明による核酸中に存在する相同なヌクレオチドの実際のパーセンテージは、該核酸中に存在するヌクレオチドの総数に依存する。パーセントの修正は核酸中に存在するヌクレオチドの総数に基づることができる。

20

【0113】

相同性は当分野で既知の通りに測定できる。より具体的には、配列比較アルゴリズムにより、指定のプログラムパラメータに基づいて参照配列と比較した場合の試験配列のパーセント配列同一性を計算する。試験配列は、好ましくはそれが別の核酸分子と相同であるというべき、または相同であるかどうか、相同であればどの程度であるかを試験すべき配列または核酸分子であり、そのような別の核酸分子も参照配列と称される。ある実施形態においては、参照配列は本明細書に記載した核酸分子、より好ましくは、配列番号5~144のいずれかの配列を有する核酸分子である。比較のための配列の最適なアライメントは例えばSmith & Watermanの局所相同性アルゴリズム(Smith & Waterman, 1981)によるか、Needleman & Wunschの相同性アライメントアルゴリズム(Needleman & Wunsch, 1970)によるか、Pearson & Lipmanの類似法に関する検索(Pearson & Lipman, 1988)によるか、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)によるか、または目視による検査により実施できる。

30

【0114】

パーセント配列同一性を測定するために適しているアルゴリズムの一例はベーシックローカルアライメント検索ツール(以降「BLAST」)において使用されているアルゴリズムであり、例えばAltschul et al. (Altschul et al., 1990、およびAltschul et al., 1997)を参照できる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアはNational Center for Biotechnology Information(以降「NCBI」)を介して公的に入手できる。NCBIから入手できるソフトウェア、例えばBLASTN(ヌクレオチド配列用)およびBLASTP(アミノ酸配列用)を用いて配列同一性を測定する場合に使用されるデフォルトパラメータはMcGinnis et al. (McGinnis et al., 2004)に記載されている。

40

【0115】

本発明の核酸という用語、または本発明による核酸という用語は、本明細書に開示して

50

いる核酸配列またはその部分を、好ましくは核酸または該部分がSDF-1への結合に関与する程度まで含む核酸を含む。そのような核酸は例えばトランケーションにより本明細書に開示するものから誘導してよい。トランケーションは本明細書に開示する通り核酸の末端の一方または両方に関わるものであってよい。また、トランケーションはヌクレオチドの内部の配列に関わるものであってよく、即ちそれはそれぞれ5'末端および3'末端のヌクレオチドの間のヌクレオチドに関わるものであってよい。更にまた、トランケーションは本明細書に開示した核酸の配列から単一ほどの少数のヌクレオチドの欠失を含む。トランケーションはまた本発明の核酸の1つより多いストレッチに関わるものであってよく、その場合、ストレッチは1ヌクレオチド長ほど短くてもよい。本発明による核酸の結合は通常の実験を用いて当業者により、または本明細書に記載した方法、好ましくは実施例の部分において本明細書に記載した方法を用いるか適合させることにより測定できる。

10

20

30

40

50

【0116】

本発明による核酸はD-核酸またはL-核酸のいずれかであってよい。好ましくは、本発明の核酸はL-核酸である。更にまた、核酸の1つまたはいくつかがD-核酸として存在するか、または核酸の少なくとも1つまたは複数の部分がL-核酸であることも可能である。核酸の「部分」という用語は1つ程度の少数のヌクレオチドを意味する場合もある。そのような核酸は本明細書においては一般的にそれぞれD-核酸およびL-核酸と称する。従って、特に好ましい実施形態においては、本発明による核酸はL-ヌクレオチドよりなり、少なくとも1つのD-ヌクレオチドを含む。そのようなD-ヌクレオチドは好ましくは本発明による核酸を定義するストレッチとは異なる部分、好ましくは核酸の他の部分との相互作用が関与している核酸の部分に結合する。好ましくは、そのようなD-ヌクレオチドは、それぞれストレッチおよび本発明による任意の核酸の任意の末端に結合する。別の好ましい実施形態においては、そのようなD-ヌクレオチドは本発明による核酸にPEGおよびHESのような修飾部を好ましくは結合させるスペーサーまたはリンカーとして機能する。

【0117】

本明細書に記載した核酸分子の各々およびいずれかは、その核酸配列の観点で、その全体において、特定のヌクレオチド配列に限定されることも本発明に含まれる。換言すれば、「含む (comprising)」または「含む (comprise(s))」という用語は含有する、または、からなるという意味においてそのような実施形態では解釈される。

【0118】

本発明による核酸はより長い核酸の部分であり、このより長い核酸は複数の部分を含み、少なくとも1つのそのような部分は本発明による核酸またはその部分である。これらのより長い核酸の他の部分は、1つまたはいくつかのD-核酸またはL-核酸のいずれかであることができる。いかなる組み合わせも本発明と関連して使用してよい。より長い核酸のこれらの他の部分は結合とは異なる機能、好ましくはSDF-1への結合とは異なる機能を呈することができる。1つの可能な機能は他の分子との相互作用を可能にすることであり、この場合、そのような他の分子は好ましくは、例えば固定化、架橋結合、検出または増幅に関して、SDF-1とは異なる。本発明の別の実施形態においては、本発明による核酸は、本発明の核酸のいくつかを個々の、または複合された部分として含む。本発明の核酸のいくつかを含むそのような核酸もまたより長い核酸という用語に包含される。

【0119】

L-核酸とは、本明細書においてはL-ヌクレオチドからなり、好ましくは完全にL-ヌクレオチドからなる核酸である。

【0120】

D-核酸とは、本明細書においてはD-ヌクレオチドからなり、好ましくは完全にD-ヌクレオチドからなる核酸である。

【0121】

核酸および核酸分子という用語は、相反する指示が無い限り本明細書においては互換的

に使用される。

【0122】

更にまた相反する指示が無い限り、いかなるヌクレオチド配列も本明細書においては5' 3'の方向に記載する。

【0123】

本発明の核酸がD-ヌクレオチド、L-ヌクレオチド、または、両方の組み合わせであって、該組み合わせがランダムな組み合わせであるか、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所定の配列である組み合わせであるかどうかにかかわらず、核酸はデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはこれらの組み合わせからなるものであってよい。

10

【0124】

L-核酸として本発明の核酸を設計することはいくつかの理由により好都合である。L-核酸は天然に存在する核酸のエナンチオマーである。しかしながらD-核酸は水溶液中、および特に生物系または生物試料中においては、ヌクレアーゼの広範な存在により、それほど安定ではない。天然に存在するヌクレアーゼ、特に動物細胞由来のヌクレアーゼはL-核酸を分解することができない。このため、L-核酸の生物学的半減期は、動物およびヒトの身体を含む生物系の中においては顕著に増大する。L-核酸の生物分解性が存在しないことにより、ヌクレアーゼ分解生成物が生成されず、このため、それより生じる副作用は観察されない。この点で、L-核酸は、SDF-1の存在が関与している疾患および/または障害の治療において使用されている事実上全ての他の化合物から区別される。ワトソクリック塩基対形成とは異なる機序を介して標的分子に特異的に結合するL-核酸、または部分的または完全にL-ヌクレオチドからなるアプタマー、特に標的分子へのアプタマーの結合に関与するアプタマーの部分をも有するアプタマーは、シュピーゲルマー(spiegelmers)とも称される。

20

【0125】

コアヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチドの第1のストレッチおよび第2のストレッチは原則として相互にハイブリダイズできるということも本発明の範囲内に包含される。そのようなハイブリダイゼーションでは2本鎖構造が形成される。当業者に知られているように、そのようなハイブリダイゼーションは特にインビトロおよび/またはインビボの条件下において起こる場合と起こらない場合がある。更にまた、そのようなハイブリダイゼーションの場合、必ずしも2つのストレッチの全長にわたってハイブリダイゼーションが起こるわけではなく、その場合、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、それによる2本鎖構造の形成が起こってよい。好ましくは本明細書においては、2本鎖構造は2つ以上の別個の鎖により形成される分子または構造の一部であり、ここで少なくとも1つ、好ましくは2つ以上の塩基対が存在し、それらは好ましくはワトソクリック塩基対形成規則に従って塩基対形成している。当業者に知られているように、他の塩基対形成、例えばフーグスティーン塩基対形成がそのような2本鎖構造中に存在するか、フーグスティーン塩基対が形成してもよい。

30

【0126】

本発明の核酸は、それらがD-核酸、L-核酸、またはD、L-核酸として存在するかどうかに関わらず、あるいはそれらがDNAであるかRNAであるかに関わらず、1本鎖または2本鎖の核酸として存在してよい。典型的には本発明の核酸は一次配列に起因する所定の二次構造を呈し、これにより三次構造も形成してよい1本鎖核酸である。しかしながら本発明の核酸はまた、相互に相補的であるか、部分的に相補的である2つの鎖が相互にハイブリダイズするという意味において2本鎖であってもよい。これにより核酸に安定性が付与され、2本鎖は特に核酸がL型ではなく天然に存在するD型で存在する場合に好都合である。

40

【0127】

本発明の核酸は修飾されていてもよい。そのような修飾は核酸の単一のヌクレオチドに関するものであってよく、当分野で周知である。そのような修飾の例は、例えばVenk

50

atesan et al. (Venkatesan, Kim et al., 2003) および Kusser (Kusser, 2000) に記載されている。そのような修飾は、核酸を構成している個々のヌクレオチドの 2' 位における H 原子、F 原子、または O-CH₃ 基または NH₂ 基であることができる。更にまた、本発明による核酸は少なくとも 1 つの LNA ヌクレオチドを含むことができる。ある実施形態においては、本発明による核酸は LNA ヌクレオチドからなる。

【0128】

ある実施形態において、本発明による核酸は多分岐核酸であってよい。多分岐核酸とは本明細書においては少なくとも 2 つの核酸鎖からなる核酸である。これらの少なくとも 2 つの核酸鎖は機能的単位を形成し、ここで機能的単位は標的分子に対するリガンドである。少なくとも 2 つの核酸鎖は、本発明の核酸のいずれかから核酸を切断して 2 つの鎖を生成することによるか、または本発明の、即ち全核酸の第 1 の部分に相当するある核酸、および全核酸の第 2 の部分に相当する別の核酸を合成することにより、誘導してよい。当然ながら、切断および合成は両者ともに、上記例示したように、2 つより多い鎖が存在する多分岐核酸を生成するために適用してよい。換言すれば、少なくとも 2 つの核酸鎖は、種々の核酸部分の間に特定の範囲の相補性が存在してよいが、典型的には相互に相補でありハイブリダイズする 2 つの鎖とは異なる。

10

【0129】

最後に、本発明による核酸の完全に閉鎖した、即ち環状の構造も実現されること、即ち本発明による核酸は好ましくは共有結合部を介して閉鎖されることも本発明の範囲に包含され、この場合、より好ましくはそのような共有結合部は本明細書に開示する通り核酸配列の 5' 末端および 3' 末端の間に生じる。

20

【0130】

本発明者等は本発明による核酸が極めて好都合な K_d 値範囲を呈することを発見した。

【0131】

結合定数を求める可能性は、いわゆる Biacore 装置 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) の使用による表面プラズモン共鳴測定であり、これも当業者に知られている。本明細書で好ましく使用される親和性はまた、実施例に記載する「プルダウン結合試験」の使用により計測した。核酸と、この場合は SDF-1 である標的との間の結合の強度を表示するための適切な尺度は、いわゆる K_d 値であり、K_d 値、及びその測定のための方法は当業者の知る通りである。

30

【0132】

本発明による核酸は、特定の K_d 値により特徴づけられる。好ましくは本明細書による核酸により示される K_d 値は 1 μM 未満である。約 1 μM の K_d 値は、標的への核酸の非特異的結合に特徴的であると言える。当業者に知られるように、本発明による核酸のような化合物群の K_d 値は特定の範囲内にある。約 1 μM の上記 K_d は、K_d 値の好ましい上限である。標的結合核酸の K_d の好ましい下限は約 10 pM 以上であることができる。グレリンに結合する個々の核酸の 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。好ましい範囲はこの範囲内のいずれかの第 1 の数、およびこの範囲内のいずれかの第 2 の数を選択することにより定義できる。好ましい高い方の値は 250 nM および 100 nM であり、好ましい低い方の値は 50 nM、10 nM、1 nM、100 pM および 10 pM である。

40

【0133】

本発明による核酸分子は、それらがなお標的分子に結合できる限りにおいて、いかなる長さを有してもよい。当業者に知られるように、本発明による核酸には好ましい長さがある。典型的には長さは 15 ~ 120 ヌクレオチドである。当業者に知られるように、15 と 120 との間の整数は本発明による核酸の可能な長さである。本発明による核酸の長さのより好ましい範囲は、約 20 ~ 100 ヌクレオチド、約 20 ~ 80 ヌクレオチド、約 20 ~ 60 ヌクレオチド、約 20 ~ 50 ヌクレオチド、および約 20 ~ 40 ヌクレオチドの長さである。

50

【0134】

本明細書に開示した核酸が、好ましくは高分子量の部分であり、および/または好ましくは特に動物の体、好ましくはヒトの体における滞留時間の点において核酸の特性を修飾でき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、本発明による核酸のPEG化およびHES化である。本明細書においては、PEGとはポリ(エチレングリコール)を意味し、HESはヒドロキシエチル澱粉を意味する。本明細書において好ましく使用されるPEG化は、本発明による核酸の修飾であって、修飾が本発明による核酸に結合したPEG部分からなる修飾である。本明細書において好ましく使用されるHES化は、本発明による核酸の修飾であって、修飾が本発明による核酸に結合したHES部分からなる修飾である。これらの修飾及びそのような修飾を用いて核酸を修飾するプロセスは、引用することにより本明細書の一部をなすものとする欧州特許出願第EP1306382号に記載されている。

10

【0135】

好ましくは高分子量の部分からなる、または高分子量の部分を含む修飾の分子量は、特にPEGがそのような高分子量の部分である場合は、約2,000~200,000Da、好ましくは40,000~120,000Daであり、特にHESがそのような高分子量の部分である場合は、好ましくは約3,000~180,000Da、より好ましくは60,000~140,000Daである。HES修飾のプロセスは、例えば引用することにより本明細書の一部をなすものとする独国特許出願第DE12004006249.8号に記載されている。

20

【0136】

PEGおよびHESのいずれかを、特許出願第WO2005074993号およびPCT/EP02/11950において更に記載されている通り直鎖または分枝鎖の形態において使用してよいことも本発明の範囲内である。そのような修飾は原則として本発明の核酸分子に対し、そのいずれかの位置において行うことができる。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'ヌクレオチドの間のいずれかのヌクレオチドに対して行う。

【0137】

修飾、および好ましくはPEGおよび/またはHES部分は、直接にまたはリンカーを介して本発明の核酸分子に結合できる。本発明による核酸分子が1つ以上の修飾、好ましくは1つ以上の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。ある実施形態においては、個々のリンカー分子は1つより多いPEG部分またはHES部分を本発明による核酸分子に結合させる。本発明に関連して使用されるリンカーはそれ自体は直鎖または分枝鎖であることができる。この種のリンカーは当業者の知る通りであり、特許出願第WO2005074993号およびPCT/EP02/11950において更に記載されている通りである。

30

【0138】

特定の理論に制約されないが、重合体、更に好ましくは本明細書に開示する重合体であって、好ましくは生理学的に許容されるもののような高分子量の部分を用いて本発明による核酸を修飾することにより、排出動態が変化すると考えられる。より詳細には、そのような修飾された本発明の核酸分子量の増大に起因して、特にL型の場合には核酸が代謝に付されないことに起因して、動物の体から、好ましくは哺乳類の体から、より好ましくはヒトの体からの排出が低下するように思われる。排出は典型的には腎臓を介して起こるため、本発明者等は、このように修飾された核酸の糸球体濾過速度は、体内の滞留時間を増大させるこの種の高分子量修飾を有さない核酸と比較して、有意に低減されると推定する。このことに関連して、そのような高分子量の修飾にも関わらず、本発明による核酸の特異性は損なわれる方向には影響を受けていないことは重要である。現時点で本発明による核酸は、除放性をもたらすために除放性を与える医薬品製剤を必ずしも必要としないような、通常であれば薬学的活性化化合物からは期待されない意外な特性を有する。高分子量の部分を含む修飾された形態の本発明による核酸はむしろ、それ自体が既に除放性製剤として

40

50

使用できる。現時点で、本明細書に開示した核酸分子の修飾、およびそのように修飾された核酸分子およびこれを含むいずれかの組成物は、明確に異なる薬物動態およびその生体分布、好ましくは制御された薬物動態およびその生体分布を与え得ると考えられる。これはまた組織への循環および分布における滞留時間を含む。そのような修飾は P C T / E P 0 2 / 1 1 9 5 0 において更に記載されている。

【 0 1 3 9 】

しかしながら、本明細書に開示した核酸がいかなる修飾も含まず、特に P E G 化または H E S 化のような高分子量の修飾を有さないことも本発明の範囲に含まれる。そのような実施形態は、投与後の体からの核酸の急速なクリアランスが望ましい場合に特に好ましい。そのような急速なクリアランスは本発明による核酸またはこれを含む薬物を用いたインビボの画像化、または特定の治療投薬の条件の場合に望ましいものとなる。

10

【 0 1 4 0 】

即ち本明細書においては本発明による核酸および/または本発明によるアンタゴニストとも称する本発明の核酸は、薬物の生成または製造のために使用してよい。そのような薬物は本発明の核酸の少なくとも1つを、任意選択的に別の薬学的活性化化合物と共に含有しており、この場合、本発明の核酸自体が好ましくは薬学的活性化化合物として作用する。そのような薬物は好ましい実施形態においては少なくとも薬学的に許容可能な担体を含む。そのような担体は、例えば水、緩衝液、P B S、グルコース溶液、スクロース溶液、マンノース溶液、好ましくは5%スクロース平衡化溶液、澱粉、糖、ゼラチンまたはいずれかの他の許容される担体物質であってよい。そのような担体は一般的に当業者には公知である。当分野で公知の通り、本発明の薬物のいずれかの実施形態、使用および態様、または本発明の薬物に関連するいずれかの実施形態、使用および態様は、本発明の医薬組成物にも適用されてもよく、適用されなくてもよい。

20

【 0 1 4 1 】

本発明に従った核酸、医薬組成物および薬物、または本発明に従って調製された核酸、医薬組成物および薬物を用いて治療および/または予防される適応症、疾患および障害は、それぞれの病因機序における S D F - 1 の直接または間接的な関与に起因する。

【 0 1 4 2 】

当然ながら、本発明による S D F - 1 結合核酸はヒトまたはネズミの S D F - 1 と相互作用するか、これに結合するため、本発明による S D F - 1 結合核酸は、本明細書に記載したヒトおよび動物のいずれかの疾患の治療、予防および/または診断のために容易に使用できることは、当業者は通常理解するだろう。

30

【 0 1 4 3 】

そのような薬物を使用して治療および/または予防される疾患および/または障害および/または疾患状態は、眼底の疾患、例えば網膜症、糖尿病性網膜症および加齢性黄斑変性の乾性および湿性の形態；癌；乳房、卵巣、前立腺、膵臓、甲状腺、鼻咽頭、結腸、肺および胃の癌；骨肉腫；黒色腫；神経膠腫；髄芽腫および神経芽腫；白血病；B細胞慢性リンパ性白血病；多発性骨髄腫；リンパ腫；W H I M 症候群；免疫不全症候群；病的血管新生；炎症；多発性硬化症；慢性関節リウマチ、変形性関節症および腎炎を含むが、これらに限定されない。

40

【 0 1 4 4 】

別の実施形態において、薬物は別の薬学的活性剤を含む。そのような別の薬学的活性剤は当業者には公知のものであり、好ましくはケモカインアンタゴニストまたはサイトカインアンタゴニスト、コルチコステロイド等を含む群から選択される。本発明による核酸により本発明に従って対象とすることができる種々の適応症が存在する場合、上記の別の薬学的活性剤は、原則としてそのような疾患の治療および/または予防に適するいずれかのものであってよいことは、当業者には理解される。特に薬物として存在または使用する場合の本発明による核酸分子は、好ましくは V E G F 抑制剤、例えば P f i z e r O p t h a l m i c s の M a c u g e n (ペガタニブ)、N o v a r t i s O p t h a l m i c s の L u c e n t i s (ラニチツマブ)、R o c h e の A v a s t i n (

50

ベバシツマブ) (オフラベル使用)、または光力学的療法、例えばNovartis OphthalmicsのVisudyne (バルテポルフィン) および硝子体内注射可能なコルチゾン誘導体、例えばAlcon Inc. のRetane (アネコルタプアセテート) と組み合わせる。

【0145】

あるいは、または追加的に、そのような別の薬学的活性剤は本発明による別の核酸である。あるいは、薬物はSDF-1とは異なる標的分子に結合する核酸が、本発明による核酸の1つとは異なる機能を呈する核酸を少なくとも1つ含む。

【0146】

当業者に知られるように、SDF-1に対するアンタゴニストをこのようなアンタゴニストの必要な患者に投与することができる場合であって、このようなアンタゴニストが疾患または障害の原因を除去するため、または疾患または障害に起因する作用を少なくとも低減するために適する場合のいずれかの疾患において、本発明の核酸を実際に使用してよい。そのような作用は、病的な血管形成、炎症および転移を含むが、これらに限定されない。これらおよび他の疾患または障害に関連した本発明による核酸の適用性は、特に、不必要な繰り返しを回避するため引用することにより本明細書の一部をなすものとする本明細書の序論部分において概説した通り、SDF-1の関与に起因している。

【0147】

薬物は原則として、開示した疾患のいずれかの治療のための薬物の使用と関連して該疾患の予防のために、代替的または追加的に使用されことも本発明の範囲内である。従って、それぞれのマーカー、即ちそれぞれの疾患に対するそれぞれのマーカーは当業者に知られている。好ましくはそれぞれのマーカーはSDF-1である。あるいは、および/または追加的に、それぞれのマーカーはフェリシアニドの膜貫通還元酵素(TMR)、ソルビトールの後蓄積を含むソルビトール経路の活性増大、細胞質ゾルのNADH/NAD比の増大、NADPHの枯渇およびフラクトースの蓄積とその結果として生じる進行グリケーション最終生成物(AGES)の非酵素的生産およびその結果として生じるタンパク質キナーゼCの活性化、MAPキナーゼ活性化のようなニトロソおよび酸化ストレス媒介性の下流の事象を含む酸化ストレスマーカー；例えばICAM-1、VCAM-1、RANTES、ハプトグロビン、またはC反応性タンパク質を含む炎症マーカー；および、例えばエリスロポエチンまたはVEGFを含むプロ血管新生マーカーの群から選択される。これを鑑みれば、該マーカーは本発明による核酸分子のいずれかを用いてある対象または患者を治療できるかどうかを調べるために使用することができる。従って、別の態様において、本発明はそのような方法に関し、そのような方法においてそれぞれのマーカーの存在または不在、より具体的には濃度を測定する。該マーカーの検出および任意選択的にその定量をするための方法、並びに、対象または患者が該疾患のいずれかに罹患しているか、またはそのような疾患を発症する危険性を有するかどうか、適宜に本発明に従って治療してよいかどうかを決定するためにそれぞれのマーカーが存在または不在であるべき範囲は当業者には知られている。

【0148】

本発明の薬物の1つの実施形態において、そのような薬物は本明細書に開示した疾患のいずれかの他の治療、特に本発明の薬物を使用すべき治療と組み合わせ使用される。

【0149】

「併用療法(または「同時療法」)」は、本発明の薬物および少なくとも1つの第2の薬剤の投与を、これらの治療薬、即ち本発明の薬物および該第2の薬剤の同時作用から得られる有利な作用をもたらすことを意図した特定の治療計画の部分として行うことを含む。組み合わせの有利な作用は、治療薬の組み合わせに起因する薬物動態または薬力学的な同時作用を包含するがこれらに限定されない。組み合わせにおけるこれらの治療薬の投与は、典型的には所定の時間(選択された組み合わせに応じて通常は数分、数時間、数日、または数週間)にわたって実施される。

【0150】

一般的とはいえないが「併用療法」は、偶然にまたは任意の本発明の組み合わせが生じるような、別個の単剤治療計画の部分としてこれらの治療薬の2種以上の投与を包含することを意図してよい。「併用療法」は、逐次的にこれらの治療薬の投与、即ち各治療薬を異なる時間に投与する場合、並びに実質的に同時にこれらの治療薬または治療薬の少なくとも2種の投与を包含することを意図している。実質的同時投与は例えば各治療薬の固定した比率を有する単一のカプセル、または治療薬各々に対する多数の単カプセルにおいて患者に投与することにより達成することができる。

【0151】

各治療薬の逐次的投与または実質的同時投与は、局所経路、経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、および粘膜組織を経由する直接の吸収を含むいずれかの適切な経路により行うことができるが、これらに限定されない。治療薬は同じ経路により、または異なる経路により投与できる。例えば選択された組み合わせの第1の治療薬を注射により投与し、組み合わせの別の治療薬を局所投与してよい。

10

【0152】

あるいは、例えば全ての治療薬を局所投与してよく、または全ての治療薬を注射により投与してよい。治療薬を投与する順序は、特別の記載が無い限り狭小に厳密とならない。「併用療法」はまた上記した治療薬を更に他の生物学的活性成分と組み合わせることも包含できる。併用療法が非薬物の治療をさらに含む場合は、非薬物の治療は治療薬と非薬物治療の組み合わせの同時作用から有利な作用が達成される限り、いずれかの適当な時期に実施してよい。例えば適切な場合においては、有利な作用は、非薬物治療を一時的に、おそらくは数日または数週間、治療薬投与とは切り離れた場合にもなお達成される。

20

【0153】

上記の一般的用語において概説したとおり、本発明による薬物は原則として当分野で知られたいかなる形態においても投与することもできる。好ましい投与経路は全身投与、より好ましくは非経口投与、好ましくは注射によるものである。あるいは、薬物は局所投与してよい。他の投与経路は、筋肉内、腹腔内、および皮下、経口、鼻腔内、気管内、または肺への投与を含み、侵襲性が最少であり効力を確保できる投与経路が優先的に扱われる。

【0154】

非経口投与は一般的に皮下、筋肉内、または静脈内の注射または注入のために使用される。更にまた、非経口投与の1つの方策は緩徐放出または除放性の系の移植を採用し、これは一定レベルの投薬が維持されることを確保するものであり、当分野で周知である。

30

【0155】

更に、本発明の好ましい薬物は、適当な鼻腔内ビヒクル、吸入剤の局所的使用を介した経鼻投与形態で、または当分野で良く知られている経皮用皮膚パッチの形態を用いた経皮経路により、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は投薬は当然ながら投薬計画全体にわたって断続的というよりもむしろ、連続的なものとなる。他の好ましい局所用調製品は、クリーム、軟膏、ローション、エアロゾルスプレーおよびゲルを含み、活性成分の濃度は典型的には0.01%~15%w/wまたはw/vの範囲である。

40

【0156】

本発明の薬物は、一般的に薬学的に許容可能な媒体に溶解または分散させた治療活性成分、例えば限定しないが本発明の核酸分子の有効量を含むことになる。薬学的に許容可能な媒体または担体は、任意の全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗カビ剤、等張剤および吸収遅延剤等も含む。薬学的活性物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は当分野で周知である。補助的な活性成分もまた本発明の薬物中に配合できる。

【0157】

別の態様において、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を少なくとも1つと、好ましくは薬学的に許容可能な結合剤とを含む。そのような

50

結合剤は当分野で使用される、および/または知られる任意の結合剤であってもよい。より詳細には、そのような結合剤は本明細書に開示する薬物の製造に関連して考察するいずれかの結合剤である。別の実施形態においては、医薬組成物は別の薬学的活性剤を含む。

【0158】

薬物および医薬組成物の調製は、本開示を鑑みれば当業者に理解され得るものである。そのような組成物は、典型的には、注射可能な液体の溶液または懸濁液のいずれか、注射前に液体中の溶液または懸濁液とするのに適した固体形態として、錠剤または他の経口投与用の固体として、持続放出カプセルとして、または、現在使用されているいずれかの他の形態（点眼薬、クリーム、ローション、軟膏類、吸入剤等を含む）として、製造してよい。手術現場において特定の部位を処理するための外科医、医師または医療従事者による滅菌された製剤の使用、例えば食塩水をベースとする洗浄剤の使用も特に有用である。組成物はまたマイクロデバイス、微粒子またはスポンジを介して送達してもよい。

10

【0159】

製剤に際しては、薬物は投薬製剤に適合した方法で、薬理的に有効な量で投与することになる。製剤は種々の剤型、例えば上記した注射用溶液の型において容易に投与されるが、薬物放出カプセル等も使用できる。

【0160】

この点に関して、投与すべき活性成分の量および組成物の体積は治療すべき個体または対象に応じたものとなる。投与のために必要な活性化合物の特定の量は専門家の判断によるものであり、各個体に特有のものとなる。

20

【0161】

活性化合物を分散させるために必要な薬物の最小体積を典型的には使用する。投与のための適当な計画もまた変動するが、先ず化合物を投与し、結果をモニタリングし、次に別の時間間隔で別の調整された用量を投与することにより典型化される。

【0162】

例えば、錠剤またはカプセル（例えばゼラチンカプセル）の形態での経口投与のためには、活性薬品成分、即ち本発明の核酸分子および/または本明細書において治療薬または活性化合物と称するいずれかの別の薬学的活性剤を、経口用の非毒性の薬学的に許容可能な不活性の担体、例えばエタノール、グリセロール、水等と組み合わせることができる。更にまた、所望または必要に応じて、適当な結合剤、潤滑剤、崩壊剤、および着色剤も混合物に配合できる。適当な結合剤は、澱粉、マグネシウムアルミニウムシリケート、澱粉ペースト、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/またはポリビニルピロリドン、天然の糖類、例えばグルコースまたはラクトース、コーン甘味料、天然および合成のガム類、例えばアカシア、トラガカントまたはアルギン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ワックス等を含む。これらの剤型中で使用される潤滑剤は、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、シリカ、タルク、ステアリン酸、そのマグネシウムまたはカルシウム塩、および/またはポリエチレングリコール等を含む。崩壊剤は、澱粉、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガム澱粉、寒天、アルギン酸またはそのナトリウム塩、または発泡性混合物などを包含するが、これらに限定されない。希釈剤は、例えばラクトース、デキストロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロースおよび/またはグリシンを含む。

30

40

【0163】

本発明の薬物はまた、持続放出性および除放性の錠剤またはカプセル、丸薬、粉末、顆粒、エリキシル、チンキ剤、懸濁剤、シロップおよびエマルジョンのような経口用剤型で投与できる。坐薬は、好都合には脂肪のエマルジョンまたは懸濁液から製造する。

【0164】

医薬組成物または薬物は滅菌し、および/または補助剤、例えば保存料、安定化剤、水和剤または乳化剤、溶液促進剤、浸透圧調節用の塩、および/または緩衝剤を含有してよい。更に、これらは他の治療上価値がある物質を含有してよい。組成物は、従来の混合方

50

法、顆粒化方法、またはコーティング方法に従って調製され、典型的には活性成分を約 0.1% ~ 75%、好ましくは約 1% ~ 50% を含有する。

【0165】

液体、特に注射用組成物は溶解、分散等により調製できる。活性化合物を薬学的に純粋な溶媒、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノール等に溶解するかこれらと混合し、これにより注射用の溶液または懸濁液を作る。更に、注射の前に液体に溶解するために適する固体形態を製剤できる。

【0166】

固体組成物に関しては、賦形剤は医薬品等級のマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等を含む。上記定義した活性化合物はまた、例えばポリアルキレングリコール、ポリエチレングリコールを担体として使用し、坐薬として製剤してもよい。一部の実施形態においては、坐薬は脂肪エマルジョンまたは懸濁液から製造される。

【0167】

本発明の薬物および核酸分子はそれぞれ、リポソーム送達系、例えば小型単層小胞、大型単層小胞および多層小胞の形態でも投与できる。リポソームはコレステロール、ステアリンアミン、またはホスファチジルコリンを含有する種々のリン脂質から形成できる。一部の実施形態においては、脂質成分のフィルムを薬剤の水溶液中で水和させることにより薬剤をカプセル化した脂質層の形態とし、これは当分野で良く知られている。例えば本明細書に記載した核酸分子は、当分野で知られた方法を用いて構築された親油性の化合物または非免疫原性の高分子量化合物との複合体として、提供することができる。更に、リポソームは、ターゲティングおよび細胞殺傷を媒介するための細胞毒性剤を内在させて運搬するために、それ自体の表面上にそのような核酸分子を担持してよい。核酸に関連する複合体の例は米国特許第 6,011,020 号に記載されている。

【0168】

本発明の薬物および核酸分子はそれぞれ、ターゲティング可能な薬物担体としての可溶性重合体にカップリングしてもよい。そのような重合体はポリビニルピロリドン、ピラン共重合体、ポリヒドロキシプロピル-メタクリルアミド-フェノール、ポリヒドロキシエチルアスパナミドフェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリエチレンオキシドポリリジンを含む。更に、本発明の薬物および核酸分子はそれぞれ、薬剤の制御された放出を達成するために有用な生体分解性重合体のクラス、例えばポリ乳酸、ポリイブシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアクリレート、およびヒドロゲルの架橋共重合体またはヒドロゲルの両親媒性ブロック共重合体にカップリングさせてよい。

【0169】

所望により、投与すべき医薬組成物および薬品は、それぞれ少量の非毒性の補助物質、例えば水和剤または乳化剤、pH 緩衝剤、および他の物質、例えば酢酸ナトリウム、およびオレイン酸トリエタノールアミンも含有してよい。

【0170】

本発明の核酸分子および薬物をそれぞれ利用する投薬計画は、患者の型、種、年齢、体重、性別および医学的状態を含む種々の要因、治療すべき状態の重症度、投与経路、患者の腎機能および肝機能、および使用する特定の Aptamer またはその塩に従って選択される。当業者であれば状態の進行を予防、阻止または停止するために必要な薬品の有効量を容易に決定および処方できる。

【0171】

本発明による核酸の有効血漿中レベルは、好ましくは本明細書に開示した疾患の任意の治療において 500 fM ~ 500 μM の範囲である。

【0172】

本発明の核酸分子および薬物は、それぞれ好ましくは 1 日単回の投与で、2 日毎または

10

20

30

40

50

3日毎に、週1回、隔週に、1月1回の投与で、または3カ月毎に投与してよい。

【0173】

本明細書に記載した薬物が本明細書に開示した医薬組成物を構成することは本発明の範囲に包含される。

【0174】

更に別の態様において、本発明は治療を必要とする対象のそのような治療のための方法に関し、この方法は少なくとも1つの本発明による核酸の薬学的に活性な量の投与を含む。ある実施形態において、対象は疾患に罹患しているか、そのような疾患を発症する危険性を有しており、疾患は本明細書に開示したもののいずれか、特に薬物の製造のための本発明による核酸のいずれかの使用に関して開示した疾患のいずれかである。

10

【0175】

本明細書において好ましく使用されるものとして、診断または診断薬または診断手段は本明細書に記載した種々の障害および疾患に関連して本明細書に記載したSDF-1を直接または間接的に検出するのに適している。診断は本明細書に記載したいずれかの障害および疾患のそれぞれの検出および/またはフォローアップのために適している。そのような検出はSDF-1に対する本発明による核酸の結合を介して可能となる。そのような結合は直接または間接的に検出できる。それぞれの方法および手段は当業者には公知である。特に、本発明による核酸は、本発明による核酸、好ましくはSDF-1に結合する核酸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、酵素的および蛍光性の標識を含む群から選択される。原則として、抗体に関して開発された全ての公知の試験法を本発明による核酸に適合させることができるが、標的結合抗体は標的結合核酸に置き換える。未標識の標的結合抗体を使用する抗体試験では、検出は、好ましくは放射性、酵素的および蛍光性の標識により修飾されている二次抗体であって、そのFcフラグメントにおいて標的結合抗体に結合する二次抗体により行う。核酸、好ましくは本発明による核酸の場合は、核酸はそのような標識により修飾され、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、または抗Cy5抗体により検出されるか、または標識がビオチンである場合は、標識はビオチンに天然に結合するストレプトアビジンまたはアビジンにより検出される。今度はそのような抗体、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標識、例えば放射性、酵素的および蛍光性の標識により修飾される(二次抗体の場合と同様)。

20

30

【0176】

別の実施形態においては本発明による核酸分子は第2の検出手段により検出または分析され、ここで該検出手段は分子ビーコンである。分子ビーコンの方法論は当業者の知る通りである。概すれば分子ビーコンとも称する核酸プローブは検出すべき核酸試料に対して逆相補であり、このため検出すべき核酸試料の一部にハイブリダイズする。核酸試料への結合により分子ビーコンの蛍光団が分離し、これが蛍光シグナルの変化、好ましくは強度の変化をもたらす。この変化は存在する核酸試料の量に相関している。

【0177】

SDF-1とこれに対応する受容体との間には、本明細書において概説した関係があるため、本発明の核酸分子を使用して診断できる疾患および状態は、原則として該疾患の治療および/または予防のための該核酸分子の使用に関連して本明細書に記載したものと全く同じである。

40

【0178】

上記以外に、本発明による核酸分子の別の使用は、造血の低下、侵襲または転移の低下、B細胞の発生および化学遊走の低下、T細胞の化学誘引の低下および成長停止およびアポトーシスの誘導にある。

【0179】

SDF-1の検出に関連し、好ましい方法は以下のステップ、
(a) SDF-1の存在を試験すべき試料を準備するステップと、

50

(b) 本発明による核酸を準備するステップと、
(c) 核酸と試料とを、好ましくは反応容器中で反応させるステップと
を含み、ここでステップ(a)はステップ(b)の前に実施でき、あるいはステップ(b)
はステップ(a)の前に実施できる。

【0180】

好ましい実施形態においては、別のステップd)が設けられ、ステップd)は核酸との試料の反応の検出を含む。好ましくは、ステップb)の核酸は表面に固定化される。表面は反応容器、例えば試験管、プレートのウェルの表面、または、例えばビーズのような反応容器中に含有されるデバイスの表面であってよい。表面への核酸の固定化は当分野で知られたいずれかの手段、非共有結合または共有結合により行うことができるが、これらに限定されない。好ましくは結合は表面と核酸との間の共有結合性の化学結合を介して樹立される。しかしながら、核酸を表面に間接的に固定化することも本発明の範囲内であり、そのような間接的な固定化においては別の成分または一对の相互作用パートナーを使用する。そのような別の成分は、好ましくは相互作用パートナーとも称する固定化されるべき核酸と特異的に相互作用し、これにより表面への核酸の結合を媒介する化合物である。相互作用パートナーは、好ましくは核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含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核酸はアプタマー、シュビーゲルマー、および核酸に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。別の代替的な実施形態においては、表面への核酸の結合は多数の部分からなる相互作用パートナーにより媒介される。そのような多数の部分からなる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、または第1のメンバーおよび第2のメンバーからなる相互作用パートナーであり、ここで第1のメンバーは核酸に含まれるか結合し、第2のメンバーは表面に結合しているか含まれる。多数の部分からなる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

【0181】

そのような方法の好ましい結果はSDF-1と核酸との固定化された複合体の形成であり、より好ましくは該複合体を検出する。複合体からSDF-1を検出することはある実施形態に含まれる。

30

【0182】

SDF-1の検出のための方法は、ステップc)を実施するために好ましくは使用されている反応容器から試料を取り出すことをも含む。

【0183】

本方法は、別の実施形態においては表面、好ましくは上記定義した表面上にSDF-1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において定義され、好ましくはそれぞれの方法に関連する上記の通り定義され、より好ましくは種々の実施形態における核酸、ポリペプチド、タンパク質および抗体を含む。本実施形態においては、特に好ましい検出手段は本発明による核酸であり、そのような核酸は好ましくは標識されているか、未標識であってよい。そのような核酸が標識されている場合は、核酸は直接または間接的に検出できる。そのような検出はまた、好ましくは本明細書に記載した種々の実施形態において核酸、ポリペプチド、タンパク質および実施形態を含む群から選択される第2の検出手段を使用する。そのような検出手段は好ましくは本発明による核酸に特異的である。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。核酸または第2の検出手段のいずれかまたは両方が好ましい実施形態においては検出標識を含んでよい。検出標識は、好ましくはビオチン、プロモデスオキシウリジン標識、ジゴキシゲニン標識、蛍光標識、UV標識、放射標識、およびキレート形成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、好ましくは核酸に含有されるか、含ま

40

50

れるか、または結合された検出標識と相互作用する。特に好ましい組み合わせは以下の通りである。

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はビオチンに対する抗体であるか、

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はアビジンまたはアビジン担持分子であるか、

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はストレプトアビジンまたはストレプトアビジン担持分子であるか、

検出標識はビオチンであり、第2の検出手段はニュートラアビジンまたはニュートラアビジン担持分子であるか、または、

検出標識はプロモデオキシウリジンであり、第2の検出手段はプロモデオキシウリジンに対する抗体であるか、または、

検出標識はジゴキシゲニンであり、第2の検出手段はジゴキシゲニンに対する抗体であるか、または、

検出標識はキレート剤であり、第2の検出手段は放射性核種であり、ここで該検出標識が核酸に結合していることが好ましい。当然ながら、この種の組み合わせはまた核酸が表面に結合している実施形態にも適用される。そのような実施形態において、検出標識は相互作用パートナーに結合していることが好ましい。

【0184】

最後に、第2の検出手段が第3の検出手段を使用して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の検出手段の検出時に酵素反応を示すものであるか、または第3の検出手段は放射線、より好ましくは放射性核種から発射された放射線を検出する手段である。好ましくは、第3の検出手段は第2の検出手段の特異的検出および/または第2の検出手段との相互作用を行う。

【0185】

また、SDF-1の相互作用パートナーが表面上に固定化され、本発明による核酸が好ましくは相互作用パートナーとSDF-1との間に形成された複合体に添加される実施形態においては、試料は反応から、より好ましくはステップc)および/またはステップb)を実施する反応容器から取り出すことができる。

【0186】

ある実施形態においては、本発明の核酸は蛍光部分を含み、蛍光部分の蛍光は核酸とSDF-1の間の複合体形成時と遊離SDF-1とで異なっている。

【0187】

別の実施形態においては、核酸は本発明による核酸の誘導体であり、その場合、核酸の誘導体はアデノシン置換アデノシンの蛍光誘導体少なくとも1つを含む。好ましい実施形態においてはアデノシンの蛍光誘導体はエテノアデノシンである。

【0188】

別の実施形態においては、本発明による核酸の誘導体およびSDF-1からなる複合体を蛍光を用いて検出する。

【0189】

本方法のある実施形態においては、シグナルはステップ(c)およびステップ(d)において発生し、好ましくはシグナルは試料中のSDF-1の濃度に相関している。

【0190】

好ましい態様において、試験は96ウェルプレートにおいて実施してよく、成分は上記した通り反応容器に固定化し、ウェルが反応容器として機能する。

【0191】

本発明の核酸は更に薬剤設計のための材料として使用してよい。基本的には2つの可能な手法が存在する。1つの手法は化合物ライブラリのスクリーニングであり、そのような化合物ライブラリは好ましくは低分子量化合物ライブラリである。ある実施形態においてはスクリーニングは高スループットスクリーニングである。好ましくは高スループットスクリーニングは、標的に基づくアッセイにおける化合物の高速で効率的な試行錯誤による

10

20

30

40

50

評価である。

【0192】

最良の場合においては、分析は比色測定により行う。これに関連して使用されるライブラリは当業者には公知である。

【0193】

あるいは、本発明による核酸は合理的薬剤設計のために使用してよい。好ましくは合理的薬剤設計は薬学的リード構造の設計である。X線結晶分析または核磁気共鳴スペクトル分析のような方法により典型的には同定される標的の3次元構造から出発して、多くの異なる化合物構造を含むデータベースによって検索するためにコンピュータプログラムを用いる。選択はコンピュータにより行われ、同定された化合物をその後、実験室で試験することができる。

10

【0194】

合理的薬剤設計は本発明による核酸のいずれかから出発してよく、構造、好ましくは3次元構造を用いるものであり、その構造は、本発明の核酸の構造と類似であるか、本発明の核酸の構造の結合媒介部分と同一である。いずれの場合においても、そのような構造はなお本発明の核酸と同じか類似の結合特性を示す。合理的薬剤設計の別のステップにおいて、または代替のステップとして、神経伝達物質に結合する核酸の部分の好ましくは3次元構造は、ヌクレオチドおよび核酸とは異なる化学基により模倣される。この模倣により、核酸とは異なる化合物を設計できる。そのような化合物は、好ましくは小分子またはペプチドである。

20

【0195】

当分野で知られた競合試験等を用いて行われる化合物ライブラリのスクリーニングの場合には、適切なSDF-1類縁体、SDF-1アゴニストまたはSDF-1アンタゴニストを見出してよい。そのような競合試験は以下の通り設定してよい。本発明の核酸、好ましくは標的結合L-核酸であるシュピーゲルマーを固相にカップリングさせる。SDF-1類縁体を同定するためには、標識されたSDF-1を試験に添加してよい。潜在的類縁体はシュピーゲルマーに結合するSDF-1分子と競合することになり、この競合はそれぞれの標識により得られるシグナルの低下とともに進行する。アゴニストまたはアンタゴニストを得るためのスクリーニングでは、当分野で公知の細胞培養試験を使用する。

【0196】

本発明によるキットは本発明の核酸の少なくとも1つまたは数種を含んでよい。更にまた、キットは陽性対照または陰性対照の少なくとも1つまたは数種を含んでよい。陽性対照は、例えばSDF-1であり、特に、本発明の核酸が選択される対象となるか、本発明の核酸が好ましくは液体形態において結合するものであってよい。陰性対照は、例えばペプチドであってよく、これはSDF-1と類似する生物物理学的特性の観点から定義されるが、本発明の核酸により認識されない。更に、該キットは1つまたは数種の緩衝液を含んでよい。種々の成分が乾燥または凍結乾燥された形態において、または液体中に溶解された状態で、キットに含有されてよい。キットは、1つまたは数種の容器を含んでよく、この容器はキットの1つまたは数種の成分を順に含有してよい。別の実施形態においては、キットは説明書または小冊子を含み、これはキットおよびその種々の成分の使用方法に関するユーザー情報を与えるものである。

30

40

【0197】

本明細書において好ましくは、治療という用語は、好ましい実施形態において追加的または代替的に予防および/またはフォローアップを含む。

【0198】

本発明による核酸の薬学的および生物分析学的な測定は、基本的にはヒトおよび非ヒトの身体の数種の体液、組織および臓器の中のその薬物動態および生物力学的なプロファイルの測定のためのものである。そのような目的のためには本明細書に開示するか当分野で公知の検出方法のいずれかを使用してよい。本発明の別の態様において、本発明による核酸の検出のためのサンドイッチハイブリダイゼーション試験が提供される。検出試験内に

50

においては、キャプチャープローブおよび検出プローブを使用する。キャプチャープローブは本発明による核酸の第1の部分に対して相補的であり、検出プローブは第2の部分に対して相補的である。キャプチャープローブおよび検出プローブは両方とも、DNAヌクレオチド、修飾DNAヌクレオチド、修飾RNAヌクレオチド、RNAヌクレオチド、LNAヌクレオチドおよび/またはPNAヌクレオチドにより形成できる。

【0199】

従って、キャプチャープローブは本発明による核酸の5'末端に相補的である配列ストレッチを含み、検出プローブは本発明による核酸の3'末端に相補的である配列ストレッチを含む。この場合、キャプチャープローブは5'末端を介して表面またはマトリックスに固定化されることにより、キャプチャープローブはその5'末端において直接固定化することができるか、またはその5'末端および表面またはマトリックスの間のリンカーを介して固定化することができる。しかしながら、原則としてリンカーはキャプチャープローブの各ヌクレオチドに連結できる。リンカーは当分野の親水性リンカーにより、またはD-DNAヌクレオチド、修飾されたD-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、修飾されたD-RNAヌクレオチド、D-LNAヌクレオチド、PNAヌクレオチド、L-RNAヌクレオチド、L-DNAヌクレオチド、修飾されたL-RNAヌクレオチド、修飾されたL-DNAヌクレオチドおよび/またはL-LNAヌクレオチドにより形成できる。

10

【0200】

あるいは、キャプチャープローブは本発明による核酸の3'末端に相補的である配列ストレッチを含み、検出プローブは本発明による核酸の5'末端に相補的である配列ストレッチを含む。この場合、キャプチャープローブは3'末端を介して表面またはマトリックスに固定化されることにより、キャプチャープローブはその3'末端において直接固定化することができるか、またはその3'末端および表面またはマトリックスの間のリンカーを介して固定化することができる。しかしながら、原則としてリンカーは本発明による核酸に相補的である配列ストレッチの各ヌクレオチドに連結できる。リンカーは当分野の親水性リンカーにより、またはD-DNAヌクレオチド、修飾されたD-DNAヌクレオチド、D-RNAヌクレオチド、修飾されたD-RNAヌクレオチド、D-LNAヌクレオチド、PNAヌクレオチド、L-RNAヌクレオチド、L-DNAヌクレオチド、修飾されたL-RNAヌクレオチド、修飾されたL-DNAヌクレオチドおよび/またはL-LNAヌクレオチドにより形成できる。

20

30

【0201】

本発明による核酸にハイブリダイズしてよいキャプチャープローブおよび検出プローブのヌクレオチドの数は可変であり、キャプチャープローブおよび/または検出プローブおよび/または本発明による核酸自体のヌクレオチドの数に依存する場合がある。本発明による核酸にハイブリダイズしてよいキャプチャープローブおよび検出プローブのヌクレオチドの総数は、本発明による核酸に含まれるヌクレオチドの数を最大限とすべきである。検出プローブおよびキャプチャープローブのヌクレオチドの最小数(2~10ヌクレオチド)は、本発明による核酸のそれぞれ5'末端および3'末端へのハイブリダイゼーションを可能にしなければならない。本発明による核酸と分析される試料中に存在する他の核酸との間の高い特異性および選択性を実現するためには、キャプチャープローブおよび検出プローブのヌクレオチドの総数は本発明による核酸に含まれるヌクレオチドの数を最大限とすべきである。

40

【0202】

更に、検出プローブは、好ましくは本明細書において上記の通り検出できるマーカ分子または標識を担持する。標識またはマーカ分子は原則として検出プローブの各ヌクレオチドに連結できる。好ましくは標識またはマーカ分子は検出プローブの5'末端または3'末端に位置し、これにより、本発明による核酸に相補的である検出プローブ内のヌクレオチドと標識との間にリンカーを挿入することができる。リンカーは当分野の親水性リンカーにより、またはD-DNAヌクレオチド、修飾されたD-DNAヌクレオチド、D-

50

RNAヌクレオチド、修飾されたD-RNAヌクレオチド、D-LNAヌクレオチド、PNAヌクレオチド、L-RNAヌクレオチド、L-DNAヌクレオチド、修飾されたL-RNAヌクレオチド、修飾されたL-DNAヌクレオチドおよび/またはL-LNAヌクレオチドにより形成され得る。

【0203】

本発明による核酸の検出は以下の通り実施できる。本発明による核酸をその一端においてキャプチャープローブに、もう一端において検出プローブにハイブリダイズさせる。その後、未結合の検出プローブを、例えば1回または数回の洗浄工程により除去する。好ましくは標識またはマーカ分子を担持している結合した検出プローブの量をその後計測することができる。

10

【0204】

本明細書においては好ましくは、疾患および障害という用語は、相反する指示が無い限り本明細書においては互換的に使用する。

【0205】

本明細書においては、含むという用語は好ましくはその用語に続く要件またはその用語により説明される要件を限定する意図はない。しかしながら、別の実施形態においては、含むという用語はその用語に続く要件またはその用語により説明される要件を含有し、これによりそれを限定する意味において理解する。

【0206】

種々の配列番号、本明細書において使用する本発明による核酸分子および標的分子SDF-1の化学的性質、その実際の配列、および内部参照番号を以下の表にまとめる。

20

【0207】

核酸はアプタマー、即ちピオチニル化ヒトD-SDF-1(配列番号4)を有するD-核酸(D-RNA)レベルにおいて、またはシュピーゲルマーレベル、即ちSDF-1の天然の配置、L-SDF-1(ヒトSDF-1、配列番号1)を有するL-核酸(L-RNA)において特徴付けられていることに留意する。異なる種々の核酸が1つの内部参照名を共有するが、それぞれのD-RNA(アプタマー)分子に対しては1つの配列番号、L-RNA(シュピーゲルマー)分子に対して1つの配列番号である。

【0208】

【表 1】

表 1 (A)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
1	L-ペプチド	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNR QVCIDPKLKWIEYLEKALNK	ヒト/サル/ネコ SDF-1α ヒト/サル/ネコ SDF-1
2	L-ペプチド	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNR QVCIDPKLKWIEYLEKALNKRFKM	ヒト/サル/ネコ SDF-1β
3	L-ペプチド	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNR QVCIDPKLKWIEYLEKALNK	マウス SDF-1α マウス SDF-1
4	D-ペプチド	KPVSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNR QVCIDPKLKWIEYLEKALNKRFK-ビオチン	ビオチニル化 huD-SDF-1
5	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001
6	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-G10
7	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACACGUCUAUUGAAAAGGUAAACCAGC	192-F10
8	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACACGUCUAUUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-B11
9	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACUACAGC	192-C9
10	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACUACAGC	192-E10
11	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-C10
12	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCAGUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-D11
13	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACCACUGC	192-G11
14	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUAUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAAACCACUAGC	192-H11
15	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGCGAAAAGCGACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGCAGC	192-D10
16	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
17	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCUGUGAAAAGUAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9

10

20

30

40

【表 2】

表 1 (B)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
18	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AGCGUGAAAAGUAAACACGUAUUUUAGAAAAGGUAAACCACGC U	191-A6
19	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AAAGYRACAHGUMAAAX _n UGAAAAGGUARC; X _n =A 又は不在	A 型式-1
20	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AAAGYRACAHGUMAAUUGAAAAGGUARC	A 型式-2
21	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AAAGYRACAHGUMAAAUUGAAAAGGUARC	A 型式-3
22	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AAAGYAAACAHGUCAAUUGAAAAGGUARC	A 型式-4
23	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	RSHRYR	A 型式-5-5'
24	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	YRYDSY	A 型式-5-3'
25	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	CUGUAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGCAG	192-A10-002
26	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	UGUGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCGCA	192-A10-003
27	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-004
28	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	UGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCG	192-A10-005
29	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCC	192-A10-006
30	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	AAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGC	192-A10-007
31	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGCGC	192-A10-008
32	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGCGC	192-A10-015
33	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-014
34	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	CGUGAAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGCG	192-A10-016
35	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGCAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCGUGC	192-A10-017
36	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGCAAAGCAACAUGUCAAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-018

10

20

30

40

【表 3】

表 1 (C)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
37	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	CGCGAAAGCAACAUGUCAUAGAAAGGUAGCCGUG	192-A10-019
38	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GGCGAAAGCAACAUGUCAUAGAAAGGUAGCCGCC	192-A10-020
39	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GGCCAAAGCAACAUGUCAUAGAAAGGUAGCCGCC	192-A10-021
40	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GCCCAAAGCAACAUGUCAUAGAAAGGUAGCCGGCC	192-A10-022
41	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	CCCCAAAGCAACAUGUCAUAGAAAGGUAGCCGGGG	192-A10-023
42	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	X ₂ BBBS; X ₂ = S 又は不在	A 型式-6-5'
43	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	SBBVX ₃ ; X ₃ = S 又は不在	A 型式-6-3'
44	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	X ₁ X ₂ NNBV; X ₁ = R 又は不在, X ₂ = S 又は不在	A 型式-7-5'
45	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	BNBNX ₃ X ₄ ; X ₃ = R 又は不在, X ₄ = Y 又は不在	A 型式-7-3'
46	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG CU	193-C2-001
47	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG CU	193-G2-001
48	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG CU	193-F2-001
49	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GCGAGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG C	193-G1-002
50	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG C	193-D2-002
51	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GCAUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG C	193-A1-002
52	L-RNA (シユピ ^o ーゲルマ ^o ー)	GCGUGGUGUGAUCUAGAUGUAGUUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG C	193-D3-002

10

20

30

40

【表 4】

表 1 (D)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
53	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAGAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-B3-002
54	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAAAGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-H3-002
55	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGUUCUAGUCAGGU AUG C	193-E3-002
56	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUJAGGUACG C	193-D1-002
57	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGUAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGG	B 型式-1
58	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGUAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCCUAGUCAGG	B 型式-2
59	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	X ₁ GCRWG; X ₁ = A 又は不在	B 型式-3-5'
60	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	KRYSCX ₄ ; X ₄ = U 又は不在	B 型式-3-3'
61	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG C	193-C2-002
62	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	CGUGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACG	193-C2-003
63	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGUAC	193-C2-004
64	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	UGGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGU A	193-C2-005
65	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GGUGAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGGU	193-C2-006
66	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GUGUAUCUAGAUGAGUGGCUGAUCCUAGUCAGG	193-C2-007
67	L-RNA (シユピョーゲルマ一)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUJUGGCUGAUCCUAGUCAGGUACGC	193-G2-012

10

20

30

40

【表 5】

表 1 (E)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
68	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGCGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUAGUCCUAGUCAGGGCGGC	193-G2-013
69	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGCGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUAGUCCUAGUCAGGGCGGC	193-G2-014
70	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGCGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUAGUCCUAGUCAGGGCGGC	193-G2-015
71	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGCGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUAGUCCUAGUCAGGGCGGC	193-G2-016
72	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCCCGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUAGUCCUAGUCAGGGCGGC	193-G2-017
73	L-RNA (シユピョーゲルマー)	X ₂ SSBS; X ₂ = G 又は不在	B 型式-4-5'
74	L-RNA (シユピョーゲルマー)	BVSSX ₃ ; X ₃ = C 又は不在	B 型式-4-3'
75	L-RNA (シユピョーゲルマー)	X ₁ GCGUG; X ₁ = A 又は不在	B 型式-5-5'
76	L-RNA (シユピョーゲルマー)	UACGCX ₄ ; X ₄ = U 又は不在	B 型式-5-3'
77	L-RNA (シユピョーゲルマー)	X ₁ X ₂ SVNS; X ₁ = A 又は不在, X ₂ = G 又は不在	B 型式-6-5'
78	L-RNA (シユピョーゲルマー)	BVBSX ₃ X ₄ ; X ₃ = C 又は不在, X ₄ = U 又は不在	B 型式-6-3'
79	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAAGAAGUCGGCCUAGCAGCAC	197-B2
80	L-RNA (シユピョーゲルマー)	AGCGUGCGGAGGUUAGGGCUAAGAAGUCGGUCCGACACGCU	191-D5-001
81	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGUUGCGGAGGUUAGGGCUAAGAAGUCGGUCCGACAGCAC	197-H1
82	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CGUGCUCUUGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC ACG	190-A3-001
83	L-RNA (シユピョーゲルマー)	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUAGGCUAGGCUAGCAGCACGCU	191-A5

10

20

30

40

【表 6】

表 1 (F)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
84	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCGAAAGUCGGCCCGCAGCA C	197-H3
85	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGUUCGGGGGUUAGGGCUUGAAAGUCGGCCCGCAGCA C	197-B1
86	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGUUGCAGGGGUUAGGGCUUGAAAGUCGGCCUGCAGCA C	197-E3
87	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUCAAAGUCGGCCUGCAGCA C	197-H2
88	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGCUGCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCA C	197-D1
89	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GUGCUGGGGUCAGGGCUAGAAAGUCGGCCUGCAGCA C	197-D2
90	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGUYAGGGCUHRX _A AGUCGG; X _A =A 又は不在	C 型式-1
91	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGUYAGGGCUHRAAGUCGG	C 型式-2
92	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGUYAGGGCUHRAGUCGG	C 型式-3
93	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGUUAAGGGCUHGAAGUCGG	C 型式-4
94	L-RNA (シユピョーゲルマー)	UGAGAUAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003
95	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GAGUAAGGGGUUAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
96	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GGGGUUAAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
97	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
98	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGUCGACACG	191-D5-003
99	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGUCGACCG	191-D5-004
100	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CGGGCGAGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGUCGACCG	191-D5-005

10

20

30

40

【表 7】

表 1 (G)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
101	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-006
102	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCCG	191-D5-007
103	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGCC	191-D5-010
104	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017
105	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-029
106	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCGCC	191-D5-024
107	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017-29a
108	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GCCGCGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-017-29b
109	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-019-29a
110	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-024-29a
111	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GGCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGCGG	191-D5-024-29b
112	L-RNA (シユピョーゲルマア)	UGCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG CA	197-B2-001
113	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GCUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG	197-B2-002
114	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CUGCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG	197-B2-003
115	L-RNA (シユピョーゲルマア)	UGCUGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG	197-B2-004
116	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GCGGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG	197-B2-005

10

20

30

40

【表 8】

表 1 (H)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
117	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GCCGGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
118	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GGCCGGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCGGC	197-B2-006-31a
119	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CGCCGGGGUUAGGGCUAGAAAGUCGGCCGGC	197-B2-006-31b
120	L-RNA (シユピョーゲルマア)	RKSBUSNVGR	C 型式-5-5'
121	L-RNA (シユピョーゲルマア)	YYNRCASSMY	C 型式-5-3'
122	L-RNA (シユピョーゲルマア)	RKSBUGSVGR	C 型式-6-5'
123	L-RNA (シユピョーゲルマア)	YCNRCASSMY	C 型式-6-3'
124	L-RNA (シユピョーゲルマア)	X _s SSSV; X _s = S 又は不在	C 型式-7-5'
125	L-RNA (シユピョーゲルマア)	BSSSX _s ; X _s = S 又は不在	C 型式-7-3'
126	L-RNA (シユピョーゲルマア)	SGGSV	C 型式-8-5'
127	L-RNA (シユピョーゲルマア)	YSCCS	C 型式-8-3'
128	L-RNA (シユピョーゲルマア)	GCSSG	C 型式-9-5'
129	L-RNA (シユピョーゲルマア)	CCKGC	C 型式-9-3'
130	L-RNA (シユピョーゲルマア)	SSSSR	C 型式-10-5'
131	L-RNA (シユピョーゲルマア)	YSBSS	C 型式-10-3'

10

20

30

40

【表 9】

表 1 (I)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
132	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGGUGUGAUCUAGAUGAUUUGGUGAUCUAGUCA GGUACGC	193-G2-012-5'-PEG
133	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-GCGUGAAAGCAACAUGUCAAUAGAAAGGUAGCCGCGC	192-A10-008-5'-PEG
134	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-CGGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCCCG	191-D5-007-5'-PEG
135	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-GCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCTGGC	197-B2-006-5'-PEG
136	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-CGCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGCCTGGC	197-B2-006-31b-5'-PEG
137	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-40 kDa-PEG-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUAGAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG 192-A10-001-5'-PEG40
138	L-RNA (シユピョーゲルマー)	UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGCUGGCAGAGCU	対照シユピョーゲルマー
139	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-30 kDa-PEG-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUAGAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-PEG30
140	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-100 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUAGAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-HES100
141	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-130 kDa-HES-GCUGUGAAAGCAACAUGUCAAUAGAAAGGUAGCCGCGCAGC	192-A10-001-5'-HES130
142	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CGUGGUCGGUUGUGUCAGGUCUAUUCGCCCCCGGUGCAGGGCAUCCCGC G	194-A2-001
143	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GCAGUGUGACGGGACGGUGAUAGGACAGAGCUGAUCGCCGUCAGGUG AG	196-B12-003
144	L-RNA (シユピョーゲルマー)	CAACAGCAGUGUGACGGGACGGUGAUAGGACAGAGCUGAUCGCCGUCAGC G	196-B12-004

10

20

30

40

【表 10】

表 1 (J)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
145	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCGCAGC	192-A10-001
146	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAAACCACAGC	192-G10
147	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACACCGUCAAAUGAAAAGGUAAACCCGCAGC	192-F10
148	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACACCGUCAAAUGAAAAGGUAAACCCACAGC	192-B11
149	D-RNA (アプタマー)	GCUGUAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAAACUACAGC	192-C9
150	D-RNA (アプタマー)	GCUGUAAAAGUAAACAAGUCAAAUGAAAAGGUAAACUACAGC	192-E10
151	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACAAGUCAAAUGAAAAGGUAAACCCACAGC	192-C10
152	D-RNA (アプタマー)	GCAGUGAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAAACCCACAGC	192-D11
153	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAAACCCACUAGC	192-G11
154	D-RNA (アプタマー)	GCUAUGAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAAACCAUAGC	192-H11
155	D-RNA (アプタマー)	GCUGCGAAAAGCGACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCGCAG C	192-D10
156	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCACAGC	192-E9
157	D-RNA (アプタマー)	GCUGUGAAAAGUAAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCGCAGC	192-H9
158	D-RNA (アプタマー)	AGCGUGAAAAGUAAACACCGUAAAAGUAAAAGGUAAACCCACGC U	191-A6
159	D-RNA (アプタマー)	CUGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCGCAG	192-A10-002
160	D-RNA (アプタマー)	UGUGAAAAGCAACAUGUCAAAUGAAAAGGUAGCCGCA	192-A10-003

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 (K)

配列番号	RNA/ヘアチド	配列	内部参照
161	D-RNA (アプタマー)	GUGAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-004
162	D-RNA (アプタマー)	UGAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCG	192-A10-005
163	D-RNA (アプタマー)	GAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCC	192-A10-006
164	D-RNA (アプタマー)	AAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGC	192-A10-007
165	D-RNA (アプタマー)	GCGUGAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-008
166	D-RNA (アプタマー)	GCGCGAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-015
167	D-RNA (アプタマー)	GCGGAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-014
168	D-RNA (アプタマー)	CGUGAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-016
169	D-RNA (アプタマー)	GCGCAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGUG	192-A10-017
170	D-RNA (アプタマー)	GUGCAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCCGC	192-A10-018
171	D-RNA (アプタマー)	CGCCAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGUG	192-A10-019
172	D-RNA (アプタマー)	GGGCAAAGCAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGCC	192-A10-020
173	D-RNA (アプタマー)	GGCCAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGCC	192-A10-021
174	D-RNA (アプタマー)	GCCCCAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGGC	192-A10-022
175	D-RNA (アプタマー)	CCCCAAAACAACAUGUCAUUGAAAAGGUAGCCGGG	192-A10-023
176	D-RNA (アプタマー)	AGCGUGGUGUGAUCUAGAUAGUAGUGGCUGAUCUAGUCAGGUACG CU	193-C2-001

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 (L)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
177	D-RNA (アブタマー)	AGCGGUGUGAUCUJAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG CU	193-G2-001
178	D-RNA (アブタマー)	AGCGGUGUGAUCUJAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG CU	193-F2-001
179	D-RNA (アブタマー)	GCGAGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-G1-002
180	D-RNA (アブタマー)	GCGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-D2-002
181	D-RNA (アブタマー)	GCAUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-A1-002
182	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAUUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-D3-002
183	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGAGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-B3-002
184	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAAGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-H3-002
185	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGUUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-E3-002
186	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUAGGUACG C	193-D1-002
187	D-RNA (アブタマー)	GCGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-C2-002
188	D-RNA (アブタマー)	CGUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUACG C	193-C2-003
189	D-RNA (アブタマー)	GUGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAC C	193-C2-004
190	D-RNA (アブタマー)	UGGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAC C	193-C2-005
191	D-RNA (アブタマー)	GGUGUGAUCUJAGAUGUAGUGGCUGAUCUCCUAGUCAGGUAC C	193-C2-006

10

20

30

40

【表 1 3】

表 1 (M)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
192	D-RNA (アプタマー)	GUGGAUCUAGAUGUAGGGCUGAUCCUAGUCAGG	193-C2-007
193	D-RNA (アプタマー)	GCGUGGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGUACGC	193-G2-012
194	D-RNA (アプタマー)	GCGCGGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGGC	193-G2-013
195	D-RNA (アプタマー)	GCGCGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGGC	193-G2-014
196	D-RNA (アプタマー)	GGCGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCC	193-G2-015
197	D-RNA (アプタマー)	GGCGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGCC	193-G2-016
198	D-RNA (アプタマー)	GCCCGUGAUCUAGAUGAUUUGGCUGAUCCUAGUCAGGCGGC	193-G2-017
199	D-RNA (アプタマー)	GUCUGCGGGGUJAGGGCUAGAAGUCGGCCUGCAGCAC	197-B2
200	D-RNA (アプタマー)	AGCGUGCGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACACGCU	191-D5-001
201	D-RNA (アプタマー)	GUGUUGCGGAGGUUAGGGCUAGAAGUCGGUCGACAGCAC	197-H1
202	D-RNA (アプタマー)	CGUGCGCUUGAGAUAGGGGUJAGGGCUUAAAGUCGGCUGAUUCUC ACG	190-A3-001
203	D-RNA (アプタマー)	AGCGUGAAGGGGUUAGGGCUCGAAAGUCGGCUGACACGCU	191-A5
204	D-RNA (アプタマー)	GUGCUGCGGGGUJAGGGCUCGAAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-H3
205	D-RNA (アプタマー)	GUGUCCCGGGGUJAGGGCUUAGAAGUCGGCCCGCAGCAC	197-B1

10

20

30

40

【表 1 4】

表 1 (N)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
206	D-RNA (アブタマ)	GUGUUCAGGGUUAGGGCUUUGAAGUCGGCCUCGACGCAC	197-E3
207	D-RNA (アブタマ)	GUGCUCGGGGUUAGGGCUCAAAGUCGGCCUCGACGCAC	197-H2
208	D-RNA (アブタマ)	GUGCUCGGGGUUAGGGCUAA-AGUCGGCCGACAGCAC	197-D1
209	D-RNA (アブタマ)	GUGCUGUGGGGUCAGGGCUAGAAAGUCGGCCUCGACGCAC	197-D2
210	D-RNA (アブタマ)	UGAGAUAGGGUUAGGGCUAAAAGUCGGCUGAUUCUCA	190-A3-003
211	D-RNA (アブタマ)	GAGAUAGGGUUAGGGCUAAAAGUCGGCUGAUUCUC	190-A3-004
212	D-RNA (アブタマ)	GGGUUAGGGCUAAAAGUCGGCUGAUUCU	190-A3-007
213	D-RNA (アブタマ)	GCGUGCGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACACGC	191-D5-002
214	D-RNA (アブタマ)	CGUGCGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACACCG	191-D5-003
215	D-RNA (アブタマ)	CGGCGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-004
216	D-RNA (アブタマ)	CGGCGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-005
217	D-RNA (アブタマ)	CGGCGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-006
218	D-RNA (アブタマ)	CGGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-007
219	D-RNA (アブタマ)	GGGAGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-010
220	D-RNA (アブタマ)	CCGCGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-017
221	D-RNA (アブタマ)	CCCGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-029
222	D-RNA (アブタマ)	GGCGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-024
223	D-RNA (アブタマ)	CCCGGGUUAGGGCUAAGUCGGUCGACCCG	191-D5-017-29a

10

20

30

40

【表 1 5】

表 1 (O)

配列番号	RNA/ヘアチド	配列	内部参照
224	D-RNA (ヘアタマー)	GCCGGGUUAGGGCUAGAAGUCGGGGCGG	191-D5-017-29b
225	D-RNA (ヘアタマー)	CCCCGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGGGGGG	191-D5-019-29a
226	D-RNA (ヘアタマー)	CGCGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGGGCCG	191-D5-024-29a
227	D-RNA (ヘアタマー)	GGCGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGGGCCC	191-D5-024-29b
228	D-RNA (ヘアタマー)	UGCUGGGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGCA	197-B2-001
229	D-RNA (ヘアタマー)	GCUGCGGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGAGC	197-B2-002
230	D-RNA (ヘアタマー)	CUGCGGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGAG	197-B2-003
231	D-RNA (ヘアタマー)	UGCUGGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCUCGCA	197-B2-004
232	D-RNA (ヘアタマー)	GCGGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCUCG	197-B2-005
233	D-RNA (ヘアタマー)	GCCGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCGGC	197-B2-006
234	D-RNA (ヘアタマー)	GGCCGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCC	197-B2-006-31a
235	D-RNA (ヘアタマー)	CGCCGGGUUAAGGGCUAGAAGUCGGCCGGCCG	197-B2-006-31b
236	D-RNA (ヘアタマー)	CGUGGUCCGUUGUGUCAGGGUCUAJUCGCCCCGGGUCAGGGCAUCCG CG	194-A2-001
236	D-RNA (ヘアタマー)	GCAGUGGACCGGGACCGUGUAAGGACAGAGCUGAUCCCGCUCAGGU GAG	196-B12-003
238	D-RNA (ヘアタマー)	CAACAGCAGUGUGACCGGGACCGUGUAAGGACAGAGCUGAUCCCGCUC AG	196-B12-004

10

20

30

40

【表 1 6】

表 1 (P)

配列番号	RNA/ペプチド	配列	内部参照
239	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-PEG-UAAGGAAACUCGGUCUGAUGCGGUAGCGGCUUGGCAGAGCU	PEG 化対照シユピョーゲルマー
240	L-RNA (シユピョーゲルマー)	GATCACACCACGC-(C18-PEG-スパーサー)-(C18-PEG-スパーサー)-1-NH ₂ -3'	193-G2-012-5'-PEGキヤプチャープローブ
241	L-RNA (シユピョーゲルマー)	5'-NH ₂ -(C18-PEG-スパーサー)-(C18-PEG-スパーサー)-GCGUACCUGAC	193-G2-012-5'-PEG 検出ブローブ

10

20

30

40

本発明を、図面、実施例および配列表により更に説明し、これらより、特徴、実施形態および利点をさらに得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0210】

【図1】配列モチーフ(「A型」)を示すヒトSDF-1に結合する関連RNAリガンドの配列のアライメントを示す。この配列モチーフは、好ましい実施形態においては、その全体がヒトSDF-1への結合のために必須である。

【図2A】RNAリガンド192-A10-001の誘導体を示す(配列モチーフ「A型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図2B】RNAリガンド192-A10-001の誘導体を示す(配列モチーフ「A型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図3】配列モチーフ(「B型」)を示すヒトSDF-1に結合する関連RNAリガンドの配列のアライメントを示す。この配列モチーフは、好ましい実施形態においては、その全体がヒトSDF-1への結合のために必須である。

【図4A】RNAリガンド193-C2-001および193-G2-001の誘導体を示す(配列モチーフ「B型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図4B】RNAリガンド193-C2-001および193-G2-001の誘導体を示す(配列モチーフ「B型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図5】配列モチーフ(「C型」)を示すヒトSDF-1に結合する関連RNAリガンドの配列のアライメントを示す。この配列モチーフは、好ましい実施形態においては、その全体がヒトSDF-1への結合のために必須である。

【図6】RNAリガンド190-A3-001の誘導体を示す(配列モチーフ「C型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図7A】RNAリガンド190-D5-001の誘導体を示す(配列モチーフ「C型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図7B】RNAリガンド190-D5-001の誘導体を示す(配列モチーフ「C型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図8】RNAリガンド197-B2の誘導体を示す(配列モチーフ「C型」のヒトSDF-1RNAリガンド)。

【図9】ヒトSDF-1に結合する別のRNAリガンドを示す。

【図10】JurkatヒトT細胞白血病細胞のヒトSDF-1に誘導される化学遊走を示す。ここでは、種々のヒトSDF-1の濃度に対するJurkatヒトT細胞白血病細胞の3時間遊走の後に、ヒトSDF-1の濃度にわたる蛍光シグナルとして表した場合のヒトSDF-1に関する用量応答曲線が得られた。

【図11】ビオチニル化ヒトD-SDF-1の濃度にわたるアプタマーの結合として表した場合の37°Cにおけるビオチニル化ヒトD-SDF-1へのヒトSDF-1結合アプタマー192-A10-001の結合分析の結果を示す。

【図12】化学遊走試験におけるヒトSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001の効力を示す。細胞は、種々の量のシュピーゲルマー192-A10-001と共に37°Cにおいて予備インキュベートしたヒト0.3nM SDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー192-A10-001の濃度にわたる対照のパーセンテージとして表した。

【図13】37°Cにおけるビオチニル化ヒトD-SDF-1へのヒトSDF-1結合アプタマー192-A10-001、192-F10-001、192-C9-001、192-E10-001、192-C10-001、192-D11-001、192-G11-001、192-H11-001、192-D10-001、192-E9-001および192-H9-001の競合結合分析の結果を示す。1nMおよび5nMの未標識アプタマー192-A10-001、192-F10-001、192-C9-001、192-E10-001、192-C10-001、192-D11-001、192-G11-001、192-H11-001、192-D10-001、192-E9-0

10

20

30

40

50

01および192-H9-001における、標識アプタマー192-A10-001（未標識アプタマーにより置き換えられる参照として使用）の結合として表した。

【図14】37におけるビオチニル化ヒトSDF-1へのヒトSDF-1結合アプタマー192-A10-008の結合分析の結果を示す。ビオチニル化ヒトSDF-1の濃度にわたるアプタマーの結合として表した。

【図15】経時的な応答（RU）として表した場合のアミンカップリング手順によりPioneerF1センサチップ上に固定化したヒトSDF-1に結合したヒトSDF-1結合シューベルグマー192-A10-008の K_D 値を示すBiacore2000センサグラムを示し、更に、シューベルグマー192-A10-008および192-A10-001のオンおよびオフの速度および K_D 値も示す。

【図16】化学遊走試験におけるSDF-1結合シューベルグマー192-A10-008の効力を示し、細胞は種々の量のシューベルグマー192-A10-008と共に37で予備インキュベートした0.3nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シューベルグマー192-A10-008の濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

【図17】経時的な応答（RU）として表した場合のアミンカップリング手順によりPioneerF1センサチップ上に固定化したヒトSDF-1に結合したシューベルグマー193-G2-001の K_D 値を示すBiacore2000センサグラムを示し、更に、シューベルグマー193-G2-001および193-C2-001のオンおよびオフ速度および K_D 値も示す。

【図18】37におけるビオチニル化ヒトSDF-1へのヒト抗SDF-1アプタマー193-G2-012の結合分析の結果を示す。ビオチニル化ヒトSDF-1の濃度にわたるアプタマーの結合として表した。

【図19】37におけるビオチニル化ヒトSDF-1へのヒトSDF-1結合アプタマー190-A3-001、190-A3-003、190-A3-004、190-A3-007、191-D5-001、191-D5-002、191-D5-003、191-D5-004、191-D5-005、191-D5-006および191-D5-007の競合結合分析の結果を示す。500nM、50nMおよび10nMの未標識アプタマー190-A3-001、190-A3-003、190-A3-004、190-A3-007、191-D5-001、191-D5-002、191-D5-003、191-D5-004、191-D5-005、191-D5-006および191-D5-007における標識アプタマー190-A3-001または191-D5-001（未標識アプタマーにより置き換えられる参照として使用される）の結合として表した。

【図20】37におけるビオチニル化ヒトSDF-1へのヒトSDF-1結合アプタマー190-A3-004および191-D5-007の結合分析の結果を示す。ビオチニル化ヒトSDF-1の濃度にわたるアプタマーの結合として表した。

【図21】経時的な応答（RU）として表した場合のアミンカップリング手順によりPioneerF1センサチップ上に固定化したヒトSDF-1に結合したシューベルグマー191-D5-007の K_D 値を示すBiacore2000センサグラムを示し、更に、シューベルグマー191-D5-001、191-D5-007、190-A3-003、および197-B2のオンおよびオフ速度および K_D 値が列挙される。

【図22】化学遊走試験におけるSDF-1結合シューベルグマー190-A3-004の効力を示し、細胞は種々の量のシューベルグマー190-A3-004と共に37で予備インキュベートした0.3nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シューベルグマー190-A3-004の濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

【図23A】化学遊走試験におけるSDF-1結合シューベルグマー193-G2-012-5'-PEG、197-B2-006-5'-PEG、191-D5-007-5'-PEGおよび191-A10-008-5'-PEGの効力を示し、細胞は種々の量のシューベルグマー193-G2-012-5'-PEG、197-B2-006-5'-PEG、191-D5-007-5'-PEGおよび191-A10-008-5'-P

10

20

30

40

50

EGと共に37 で予備インキュベートした0.3 nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEG、197-B2-006-5'-PEG、191-D5-007-5'-PEGおよび191-A10-008-5'-PEGの濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

【図23B】化学遊走試験におけるSDF-1結合シュピーゲルマー197-B2-006-5'-PEGおよび197-B2-006-31b-5'-PEGの効力を示し、細胞はシュピーゲルマー197-B2-006-5'-PEGおよび197-B2-006-31b-5'-PEGの種々の量と共に37 で予備インキュベートした0.3 nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー197-B2-006-5'-PEGおよび197-B2-006-31b-5'-PEGの濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

10

【図24A】経時的な応答(RU)として表した場合のアミンカップリング手順によりPioneerF1センサチップ上に固定化したヒトSDF-1に結合したシュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEG、191-A10-008-5'-PEGおよび191-A10-001-5'-PEGの K_D 値を示すBiacore2000センサグラムを示す。

【図24B】経時的な応答(RU)として表した場合のアミンカップリング手順によりPioneerF1センサチップ上に固定化したヒトSDF-1に結合したシュピーゲルマー197-B2-006-5'-PEG、197-B2-006-31b-5'-PEGおよび191-D5-007-5'-PEGの K_D 値を示すBiacore2000センサグラムを示す。

20

【図25A】化学遊走試験におけるSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-HES130および192-A10-001-5'-HES100の効力を示し、細胞は種々の量のシュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-HES130および192-A10-001-5'-HES100と共に37 で予備インキュベートした0.3 nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-HES130および192-A10-001-5'-HES100の濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

【図25B】化学遊走試験におけるSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-PEG30および192-A10-001-5'-PEG40の効力を示し、細胞は種々の量のシュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-PEG30および192-A10-001-5'-PEG40と共に37 で予備インキュベートした0.3 nMヒトSDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー192-A10-001、192-A10-001-5'-PEG30および192-A10-001-5'-PEG40の濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

30

【図26】化学遊走試験における対照シュピーゲルマーの無効力を示し、種々の量の細胞は対照シュピーゲルマーと共に37 で予備インキュベートした0.3 nMヒトまたはネズミSDF-1に対して遊走させ、対照シュピーゲルマーの濃度にわたり対照のパーセンテージとして表した。

40

【図27】JurkatヒトT細胞白血病細胞のネズミSDF-1誘導化学遊走を示し、ここでは、種々のSDF-1の濃度に対するJurkatヒトT細胞白血病細胞の3時間遊走の後に、蛍光シグナルとして表した場合のSDF-1に関する用量応答曲線が得られた。

【図28】化学遊走試験におけるSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001および191-D5-007-5'-PEGの効力を示し、細胞はシュピーゲルマー192-A10-001および191-D5-007-5'-PEGの種々の量と共に37 で予備インキュベートした0.3 nMネズミSDF-1に対して遊走させ、シュピーゲルマー192-A10-001および191-D5-007-5'-PEGの濃度にわたり対照

50

のパーセンテージとして表した。

【図29】種々の量のシュピーゲルマー192-A10-001と共に37で予備インキュベートしたヒト[^{1 2 5}J]-SDF-1を用いたCXCR4-受容体結合試験におけるSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001の効力を示し、特異的に結合した[^{1 2 5}J]-SDF-1をシュピーゲルマー192-A10-001の濃度にわたってプロットした。

【図30】1nMヒトSDF-1によるCXCR4発現細胞のMAPキナーゼ刺激の、ヒトSDF-1結合シュピーゲルマー192-A10-001による抑制を示す。

【図31】大動脈輪新芽形成試験におけるヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGによる、PEG化対照シュピーゲルマーによるSDF-1誘導新芽形成の抑制を示し、ここではラット大動脈由来の輪をコラーゲンマトリックスに包埋し、シュピーゲルマーの存在下または不在下にSDF-1と共に6日間インキュベートした(a:対照; b:10nM SDF-1; c:10nM SDF-1+1μMヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEG; d:10nM SDF-1+1μM PEG化対照シュピーゲルマー)。

【図32】PEG化対照シュピーゲルマーによるSDF-1誘導新芽形成の、大動脈輪新芽形成試験におけるヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGによる抑制を示し、新芽形成指数を、条件当たりの5輪に関する平均±SDとして示す(*:SDF-1に関する値は対照と有意差有り(Mann-Whitney検定、p=0.009)、**:SDF-1+ヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGに関する値はSDF-1に関するものと有意差有り(Mann-Whitney検定、p=0.028))。

【図33】ヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGによる治療を受けていないラットのSDF-1血漿中レベルと比較した場合のヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGを静脈内大量投与した後のラットにおけるヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGおよびSDF-1の血漿中レベルを示し、ヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEGおよびSDF-1の血漿中レベルは96時間にわたって測定した。

【0211】

[実施例1:ヒトSDF-1に結合する核酸]

標的としてビオチニル化ヒトD-SDF-1を用いることにより、ヒトSDF-1に結合する数種の核酸を形成し、そのヌクレオチド配列を図1~9に示した。核酸はアプタマー、即ちビオチニル化ヒトD-SDF-1を有するD-核酸レベルにおいて、またはシュピーゲルマーレベル、即ちSDF-1の天然の配置(L-SDF-1)を有するL-核酸において特徴付けた。

【0212】

アプタマーは、ビオチニル化ヒトD-SDF-1を用いる競合的試験または直接ブルダウン結合試験を用いて、ビオチニル化ヒトD-SDF-1により分析した(実施例4)。シュピーゲルマーはBiacore2000機器(実施例6)を用いた表面プラズモン共鳴計測および細胞培養インビトロ化学遊走試験(実施例5)によりSDF-1の天然構成(L-SDF-1)により試験した。

【0213】

このようにして形成した核酸分子は異なる配列モチーフを示し、3つの主要な型を図1、図2Aおよび図2B(A型)、図3、図4Aおよび図4B(B型)、図5、図6、図7A、図7Bおよび図8(C型)において定義する。ヌクレオチド配列モチーフの定義に関しては、多義のヌクレオチドに関するIUPACの略記法を使用する。

S 強 GまたはC、
W 弱 AまたはU、
R プリン GまたはA、

10

20

30

40

50

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

【0214】

相反する指示が無い限り、いずれか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'の方向に示す。

10

【0215】

[1.1 A型SDF-1結合核酸]

図1に示す通り、A型のSDF-1結合核酸の全ての配列は、相互にハイブリダイズできる5'末端および3'末端のストレッチに隣接する1つのコアヌクレオチド配列を含む。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは分子内に必ずしも生じる必要はない。

【0216】

核酸をそれらの結合挙動に関して順位付けするために、ピオチニル化ヒトD-SDF-1を用いた直接プルダウン結合試験および競合的プルダウン結合試験を用いてアプタマーレベルについて核酸を特徴付けした(実施例4)。選択された配列をシュピーゲルマーとして合成し(実施例3)、細胞培養インビトロ化学遊走試験において(実施例5)、そしてBiacore 2000機器を用いた表面プラズモン共鳴計測により(実施例6)、SDF-1の天然の配置(L-SDF)を用いて試験した。

20

【0217】

所定のボックスまたはストレッチの配列はA型のSDF-1結合核酸の間で異なる場合があり、これはSDF-1に対する結合親和性に影響する。A型SDF-1結合核酸として集約される種々のSDF-1結合核酸の結合分析に基づけば、以下に説明するコアヌクレオチド配列およびそのヌクレオチド配列は個々に、より好ましくはそれら全体が、SDF-1への結合のために必須である。

30

【0218】

A型SDF-1結合核酸の全ての発見されている配列のコアヌクレオチド配列は、配列AAAGYRACAHGUMAAX_AUGAAAGGUARC(A型式1)を共有し、ここでX_Aは不在であるか、または「A」である。「A」が不在である場合は、コアヌクレオチド配列の配列はA型式2(AAAGYRACAHGUMA AUGAAAGGUARC)として集約できる。コアヌクレオチド配列内に追加的なヌクレオチド「A」を有し、尚SDF-1に結合するA型SDF-1結合核酸191-A6(コアヌクレオチド配列:AAAGUAACACGUAAAUGAAAGGUAC)は、別のコアヌクレオチド配列(AAAGYRACAHGUMA AUGAAAGGUARC、A型式3)を結果として生じさせる。A型SDF-1結合核酸の他の全ての核酸についての例として、A型のSDF-1結合核酸192-A10-001をヒトSDF-1に対する結合親和性に関して特徴付けた。平衡結合定数K_Dはプルダウン結合試験を用いることにより(K_D=1.5nM、図11)、および表面プラズモン共鳴計測により(K_D=1.0nM、図15)測定した。192-A10-001に関して、0.12nMのIC₅₀(抑制濃度50%)が細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて計測された(図12)。結果として図1に示す全てのA型のSDF-1結合核酸を192-A10-001との競合的プルダウン結合試験で分析した(図13、試験したA型SDF-1結合核酸の一部を図13には示してある)。A型SDF-1結合核酸192-B11および192-C10はこれらの競合的実験において192-A10-001と等しい結合親和性を示した。より弱い結合親和性がA型SDF-1結合核酸192-G10、192-F10、192-C9、192-E1

40

50

0、192-D11、192-G11、192-H11および192-A6に関して測定された。A型SDF-1結合核酸192-D10、192-E9および192-H9は、192-A10-001よりも遙かに弱い結合親和性を有する(図13)。

【0219】

上記した通り、A型SDF-1結合核酸192-B11および192-C10は192-A10-001と等しいSDF-1に対する結合親和性を示している。しかしながら、それらはコアヌクレオチド配列のヌクレオチド配列における僅かな相違を示している。従って、ほぼ同じく高い親和性においてSDF-1に結合する3分子のコンセンサス配列はヌクレオチド配列(AAAGYAA CAHGUC AAUGAAAGGUARC(A型式4))により集約することができ、ここで192-A10-001のコアヌクレオチド配列のヌクレオチド配列(ヌクレオチド配列:AAAGCAACAUGUCA AAUGAAAGGUAGC)はA型SDF-1結合核酸の最も高い結合親和性を有するヌクレオチド配列を表している。

10

【0220】

A型SDF-1結合核酸の5'末端ストレッチの6ヌクレオチドのうち5つまたは6つは、A型SDF-1結合核酸の3'末端ストレッチの6ヌクレオチドのうちのそれぞれの5つまたは6つのヌクレオチドとハイブリダイズすることにより末端ヘリックスを形成してよい。これらのヌクレオチドは数か所の位置において可変であるが、異なるヌクレオチドは各々5'末端および3'末端のストレッチの6ヌクレオチドのうち5つまたは6つのハイブリダイゼーションを可能とする。図1に示すA型SDF-1結合核酸の5'末端および3'末端のストレッチは、一般式で、5'末端ストレッチに関して(「RSHRYR」、A型式5-5')、3'末端ストレッチに関して(「YRYDSY」、A型式5-3')集約することができる。A型SDF-1結合核酸192-A10-001のランケーションされた誘導体は元の分子の192-A10-001および192-A10-008との競合的プルダウン結合試験で分析した(図2Aおよび図2B)。これらの実験は、192-A10-001の6末端ヌクレオチド(5'末端:G C U G U G、3'末端:C G C A G C)の誘導体192-A10-002の5ヌクレオチド(5'末端:C U G U G、3'末端:C G C A G)への低減が結合親和性の低減を伴うことなく実施できることを示している。しかしながら、4末端ヌクレオチド(5'末端:U G U G、3'末端C G C A、192-A10-003)またはそれより小さいもの(192-A10-004/-005/-006/-007)へのランケーションは低減されたSDF-1への結合親和性をもたらしている(図2A)。図2Aおよび図2Bに示す通り、A型SDF-1結合核酸192-A10-001の誘導体の5ヌクレオチドおよび4ヌクレオチドの長さを有する測定された5'末端および3'末端ストレッチは、一般式で、5'末端ストレッチに関して(「X₂BBBS」、A型式6-5')、3'末端ストレッチに関して(「SBBVX₃」、A型式6-3')記載することができ、ここでX₂は不在であるか、または「S」であり、X₃は不在であるか、または「S」である。

20

30

【0221】

5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチのヌクレオチド配列は、A型SDF-1結合核酸の結合親和性に対して影響する。これは核酸192-F10および192-E10のみならず192-A10-001の誘導体によっても示されている(図2B)。192-F10および192-E10のコアヌクレオチド配列は192-B11および192-C10と同一であるが、5'末端のストレッチの3'末端において、および3'末端ストレッチの5'末端において僅かな相違を含んでおり、これにより結合親和性が低減している。

40

【0222】

A型SDF-1結合核酸である192-A10-002の5'末端ヌクレオチドおよび3'末端ヌクレオチド「CUGUG」および「CGCAG」の、「GCGCG」および「GCGCG」(192-A10-015)による置換は低減された結合親和性をもたらすのに対し、「GCGUG」および「GCGCG」(192-A10-008)による置換

50

は 192 - A10 - 002 に関して観察されるものと同様の結合親和性をもたらしている (図 2 B、図 15、図 12、図 16)。更に、それぞれ 4 つの 5' 末端ヌクレオチドおよび 3' 末端ヌクレオチドを有している A 型 SDF - 1 結合核酸 192 - A10 - 001 の 9 つの誘導体 (192 - A10 - 014 / 192 - A10 - 015 / 192 - A10 - 016 / 192 - A10 - 017 / 192 - A10 - 018 / 192 - A10 - 019 / 192 - A10 - 020 / 192 - A10 - 021 / 192 - A10 - 022 / 192 - A10 - 023) を、アプタマーとして、192 - A10 - 001 またはその誘導体 192 - A10 - 008 (両方とも SDF - 1 に対して同一の結合親和性を有する) に対する結合親和性に関して試験した。全クローンとも、それぞれ 192 - A10 - 001 (6 ヌクレオチドが末端ヘリックスを形成する) のように、または 5 末端ヌクレオチドを有する 192 - A10 - 008 のように、SDF - 1 に対してより弱い、遙かに弱い、または極めて遙かに弱い結合親和性を示していた (図 2 B)。従って、5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチのヌクレオチドの配列および数は SDF - 1 への効果的な結合のために必須である。A 型 SDF - 1 結合核酸 192 - A10 - 002 および 192 - A10 - 008 に関して観察された通り、5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチの好ましい組み合わせは、「CUGUG」および「CGCAG」(A 型 SDF - 1 結合核酸 192 - A10 - 002 の 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチ)、ならびに「GCGUG」および「CGCGC」(A 型 SDF - 1 結合核酸 192 - A10 - 008 の 5' および 3' 末端ストレッチ) である。

10

20

【0223】

しかしながら、全ての試験した A 型 SDF - 1 結合核酸の 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチを組み合わせれば、A 型 SDF - 1 結合核酸の 5' 末端ストレッチの一般式は「 $X_1 X_2 NNBV$ 」(A 型式 7 - 5') となり、A 型 SDF - 1 結合核酸の 3' 末端ストレッチの一般式は「 $BNBNX_3 X_4$ 」(A 型式 7 - 3') となる。(式中、 X_1 は「R」または不在であり、 X_2 は「S」であり、 X_3 は「S」であり、 X_4 は「Y」または不在であるか、または、 X_1 は不在であり、 X_2 は「S」または不在であり、 X_3 は「S」または不在であり、 X_4 は不在である。)

30

【0224】

[1.2 B 型 SDF - 1 結合核酸]

図 3 に示す通り、B 型の SDF - 1 結合核酸の全ての配列は相互にハイブリダイズできる 5' 末端のストレッチおよび 3' 末端のストレッチに隣接する 1 つのコアヌクレオチド配列を含む。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは分子内に必ずしも生じる必要はない。

40

【0225】

核酸を、それらの結合挙動に関して順位付けするために、ビオチニル化ヒト D - SDF - 1 を用いた直接プルダウン結合試験および競合的プルダウン結合試験を用いてアプタマーレベルにおいて核酸を特徴付けた (実施例 4)。選択された配列をシュピーゲルマーとして合成し (実施例 3)、細胞培養インビトロ化学遊走試験において (実施例 5)、そして Biacore 2000 機器を用いた表面プラズモン共鳴計測により (実施例 6)、SDF - 1 の天然構成 (L - SDF) を用いて試験した。

【0226】

所定のボックスまたはストレッチの配列は B 型の SDF - 1 結合核酸の間で異なる場合があり、これは SDF - 1 に対する結合親和性に影響する。B 型 SDF - 1 結合核酸として集約される種々の SDF - 1 結合核酸の結合分析に基づけば、以下に説明するコアヌクレオチド配列およびそのヌクレオチド配列は個々に、より好ましくはそれら全体が、SDF - 1 への結合のために必須である。

【0227】

B 型 SDF - 1 結合核酸の全ての発見されている配列のコアヌクレオチド配列は配列 G

50

UGUGAUCUAGAUGUADWGGCUGWUCCUAGUYAGGを共有する(B型式1)。コアヌクレオチド配列の1つの位置において異なるB型SDF-1結合核酸193-G2-001、193-C2-001および193-F2-001をA型SDF-1結合核酸192-A10-001との競合的プルダウン結合試験において分析した(プルダウン結合試験において求められた1.5 nMの K_D [図11]、表面プラズモン共鳴計測において求められた1.0 nMの K_D [図15]、0.12 nMの IC_{50} 、[図12])。3種の試験したB型SDF-1結合核酸の各々はA型SDF-1結合核酸192-A10-001と比較してヒトSDF-1への優れた結合を示し、193-G2-001の結合親和性は193-C2-001および193-F2-001と同様に良好であった(図3)。データは、B型SDF-1結合核酸193-G2-001、193-C2-001および193-F2-001のコアヌクレオチド配列のヌクレオチド配列における相違がSDF-1への結合親和性に対して影響しないことを示唆している。例示により、B型SDF-1結合核酸193-G2-001を、ヒトSDF-1への結合親和性に関して特徴付けた。平衡結合定数 K_D をプルダウン結合試験を用いて($K_D = 0.3$ nM)、および表面プラズモン共鳴計測により($K_D = 0.5$ nM、図17)測定した。193-G2-001についての0.08 nMの IC_{50} (抑制濃度50%)が、細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて計測された。これとは対照的に、コアヌクレオチド配列の配列において異なっているB型SDF-1結合核酸193-B3-002、193-H3-002、193-E3-002および193-D1-002は不良な結合特性を有する(図3)。結果として、SDF-1に対する向上した結合親和性を有するB型SDF-1結合核酸は配列GUGUGAUCUAGAUGUADUGGCUGAUCUAGUCAGGを有するコアヌクレオチド配列を共有する(B型式2)。

【0228】

B型SDF-1結合核酸の5'末端ストレッチの6ヌクレオチドのうち4つ、5つまたは6つのヌクレオチドは、B型SDF-1結合核酸の3'末端ストレッチの6ヌクレオチドのうちの該当する4つ、5つまたは6つのヌクレオチドとハイブリダイズすることにより末端ヘリックスを形成してよい。これらのヌクレオチドは数か所の位置において可変であるが、異なるヌクレオチドは各々5'末端のストレッチおよび3'末端のストレッチの6ヌクレオチドのうち4つ、5つまたは6つのヌクレオチドとハイブリダイゼーションを可能とする。図3に示すB型SDF-1結合核酸の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチは、一般式で、5'末端ストレッチに関して(B型式3-5';「 X_1 GCRWG」)。式中、 X_1 は「A」または不在である)、3'末端ストレッチに関して(B型式3-3';「KRYSC X_4 」)、式中、 X_4 は「U」または不在である)に集約することができる。B型SDF-1結合核酸193-G1-002、193-D2-002、193-A1-002および193-D3-002は、193-C2-001、193-G2-001および193-F2-001と同一のコアヌクレオチド配列(B型式2)を共有するものの、SDF-1に対してはより弱い結合親和性を有する(図3)。B型SDF-1結合核酸193-G1-002、193-D2-002、193-A1-002および193-D3-002の望ましくない結合特性は5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチのヌクレオチド数および配列に起因すると考えられる。

【0229】

B型SDF-1結合核酸193-G2-001および193-C2-001のランゲーションされた誘導体を、それぞれ193-G2-001および193-C2-001との競合的プルダウン結合試験において分析した(図4Aおよび図4B)。これらの実験は、B型SDF-1結合核酸193-G2-001および193-C2-001の6末端ヌクレオチド(5'末端:AGCGUG、3'末端:UACGCU)から5ヌクレオチド(5'末端:GCGUG;3'末端:UACGC)への低減が、同様の結合親和性を有する分子(193-C2-002および193-G2-012)をもたらすことを示している。平衡解離定数 K_D はプルダウン結合試験を用いて測定した($K_D = 0.3$ nM、図18)。4つ(5'末端:CGUG、3'末端:UACG、193-C2-003)またはそ

れより少ないヌクレオチド(193-C2-004、193-C2-005、193-C2-006、193-C2-007)へのトランケーションは、競合的プルダウン結合試験を用いて計測した場合にSDF-1への低減された結合親和性をもたらした(図4A)。5'末端および3'末端それぞれにおける5'末端ヌクレオチドのヌクレオチド配列はB型SDF-1結合核酸の結合親和性に影響している。5'末端および3'末端ヌクレオチド「GCGUG」および「UACGC」(193-C2-002、193-G2-12)の、「GCGCG」および「CGCGC」による置換は低減された結合親和性をもたらした。更に、4塩基対を形成するヌクレオチド長の末端ヘリックスを有するB型SDF-1結合核酸193-G2-001の4種の異なる誘導体(193-G2-014/-015/-016/-017)を試験した。それらの全てはSDF-1に対する低減された結合親和性を示した(図4B)。従って、5'末端ヌクレオチドおよび3'末端ヌクレオチドの配列および長さはSDF-1への効果的な結合のために必須である。図4Aおよび図4Bに示す通り、B型SDF-1結合核酸193-C2-003および193-G2-012の誘導体の5'末端ヌクレオチド長および4'末端ヌクレオチド長の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチは一般式で、5'末端ストレッチに関して(「X₂SSBS」、B型式4-5'、式中、X₂は不在であるか、または「G」である)、3'末端ストレッチに関して(「BVSX₃」、B型式4-3'、式中、X₃は不在であるか、または「C」である)、と記載することが出来る。B型SDF-1結合核酸193-G2-001および193-C2-01ならびにそれらの誘導体193-G2-012および193-C2-002に関して示す通り、5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチの好ましい組み合わせは「X₁GCGUG」(5'末端ストレッチ、B型式5-5')および「UACGCX₄」(3'末端ストレッチ、B型式5-3')である(式中、X₁は「A」または不在であり、X₄は「U」または不在である)。

【0230】

しかしながら、全ての試験したB型SDF-1結合核酸の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを組み合わせれば、B型SDF-1結合核酸の5'末端ストレッチの一般式は「X₁X₂SVNS」(B型式6-5')となり、B型SDF-1結合核酸の3'末端ストレッチの一般式は「BVBXS₃X₄」(B型式6-3')となる。

(式中、X₁は「A」または不在であり、X₂は「G」であり、X₃は「C」であり、X₄は「U」または不在であるか、

またはX₁は不在であり、X₂は「G」または不在であり、X₃は「C」または不在であり、X₄は不在である。)

【0231】

[1.3 C型SDF-1結合核酸]

図5に示す通り、C型のSDF-1結合核酸の全ての配列は相互にハイブリダイズできる5'末端ストレッチおよび3'末端のストレッチに隣接する1つのコアヌクレオチド配列を含む。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは分子内に必ずしも生じる必要はない。

【0232】

核酸を、それらの結合挙動に関して順位付けするために、ピオチニル化ヒトD-SDF-1を用いた直接プルダウン結合試験および競合的プルダウン結合試験を用いてアプタマーレベルにおいて核酸を特徴付けた(実施例4)。選択された配列をシュピーゲルマーとして合成し(実施例3)、細胞培養インビトロ化学遊走試験において(実施例5)、そしてBiacore 2000機器を用いた表面プラズモン共鳴計測により(実施例6)、SDF-1の天然構成(L-SDF)を用いて試験した。

【0233】

所定のボックスまたはストレッチの配列はC型のSDF-1結合核酸の間で異なる場合があり、これはSDF-1に対する結合親和性に影響する。C型SDF-1結合核酸として集約される種々のSDF-1結合核酸の結合分析に基づけば、以下に説明するコアヌクレオチド配列およびそのヌクレオチド配列は個々に、より好ましくはそれら全体が、S D

F - 1 への結合のために必須である。

【0234】

C型SDF - 1結合核酸の全ての発見されている配列のコアヌクレオチド配列は、配列GGUYAGGGCUHRX_AAGUCGG(C型式1)を共有する(式中、X_Aは不在であるか、または「A」である)。C型SDF - 1結合核酸197 - D1を例外として、C型SDF - 1結合核酸の全ての発見されている配列のコアヌクレオチド配列はヌクレオチド配列GGUYAGGGCUHRAAGUCGG(C型式2)を共有する。C型SDF - 1結合核酸197 - D1(コアヌクレオチド配列GGUUAAGGGCUAA - AGUCGG)は、コアヌクレオチド配列内に1つのヌクレオチド「A」を失っているが、なおSDF - 1に結合し、別のコアヌクレオチド配列(GGUYAGGGCUHR - AGUCGG(C型式3))を推論させた。初めは、図5に示す全てのC型SDF - 1結合核酸がA型SDF - 1結合核酸192 - A10 - 001に対する競合的ブルダウン結合試験において分析された(ブルダウン結合試験および表面プラズモン共鳴計測において求められた $K_D = 1.5 \text{ nM}$ 、 $IC_{50} = 0.12 \text{ nM}$)。C型SDF - 1結合核酸191 - D5 - 001、197 - B2、190 - A3 - 001、197 - H1、197 - H3および197 - E3は、競合的実験において192 - A10 - 001よりも弱い結合親和性を示した。191 - A5、197 - B1、197 - D1、197 - H2および197 - D2に関しては遥かに弱い結合親和性が測定された(図5)。その分子または誘導体を、競合的ブルダウン結合試験、プラズモン共鳴計測、およびインビトロの化学遊走試験を更に実施することにより更に特徴付けた。C型SDF - 1結合核酸191 - D5 - 001はヒトSDF - 1への結合親和性に関して特徴付けを行い、平衡解離定数 K_D を表面プラズモン共鳴計測により求めた($K_D = 0.8 \text{ nM}$ 、図21)。191 - D5 - 001に関して0.2 nMの IC_{50} (抑制濃度50%)が細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて計測された。ヒトSDF - 1に対するC型SDF - 1結合核酸197 - B2の結合親和性は表面プラズモン共鳴計測により求め($K_D = 0.9 \text{ nM}$)、0.2 nMの IC_{50} (抑制濃度50%)は細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて分析した。これらのデータは、C型SDF - 1結合核酸191 - D5 - 001および197 - B2がSDF - 1に対して同様の結合親和性を有することを示している(図5および図8)。

10

20

【0235】

C型SDF - 1結合核酸190 - A3 - 001(48 nt)は17ヌクレオチドの5'末端ストレッチおよび12ヌクレオチドの3'末端ストレッチを含み、これにより一方では5'末端ストレッチの5'末端に4ヌクレオチド、3'末端ストレッチの3'末端に4ヌクレオチドが相互にハイブリダイズして末端ヘリックスを形成してよい。あるいは、5'末端ストレッチにおけるヌクレオチド「UGAGA」が3'末端ストレッチにおけるヌクレオチド「UCUCA」にハイブリダイズすることにより末端ヘリックスを形成してよい。分子190 - A3 - 001の5'末端ストレッチの8ヌクレオチド(「GAGAUAGG」)および3'末端ストレッチの9ヌクレオチド(「CUGAUUCUC」)への低減(これにより5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチの8/9ヌクレオチド中6つが相互にハイブリダイズできる)は、SDF - 1に対する結合親和性に対して影響しない(190 - A3 - 004、図6および図19)。190 - A3 - 004の平衡結合定数 K_D をブルダウン結合試験を用いて($K_D = 4.6 \text{ nM}$ 、図20)、および表面プラズモン共鳴計測により($K_D = 4.7 \text{ nM}$)測定した。190 - A3 - 004に関して0.1 nMの IC_{50} (抑制濃度50%)が細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて計測された(図22)。しかしながら5'末端ストレッチにおける2ヌクレオチドのトランケーションは結合親和性の極めて大きい低減をもたらしている(190 - A3 - 007、図6および図19)。

30

40

【0236】

C型SDF - 1結合核酸191 - D5 - 001、197 - B2および197 - H1(コアヌクレオチド配列:GGUUAAGGGCUAGAAAGUCGG、197 - H3/191 - A5(コアヌクレオチド配列:GGUUAAGGGCUCGAAAGUCGG)および19

50

7 - E 3 / 1 9 7 - B 1 (コアヌクレオチド配列: G G U U A G G G C U U G A A G U C G G) はほぼ同一のコアヌクレオチド配列を共有する (C 型式 4、ヌクレオチド配列: G G U U A G G G C U H G A A G U C G G)。1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - B 2 および 1 9 7 - H 1 は 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチを共有していない (1 9 7 - H 3 および 1 9 7 - E 3 は 1 9 7 - B 2 と同一の 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチを有する)。しかしながら、5' 末端ストレッチのそれぞれの 10 ヌクレオチド (1 9 7 - B 2、1 9 7 - E 3、1 9 7 - H 3) または 10 ヌクレオチドのうち 9 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1) は 3' 末端ストレッチの該当する 10 ヌクレオチド (1 9 7 - B 2、1 9 7 - E 3、1 9 7 - H 3) または 10 ヌクレオチドのうち 9 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1) にハイブリダイズする
 場合がある (図 5)。即ち、上記した C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 7 - B 2、1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1、1 9 7 - E 3 および 1 9 7 - H 3 に加え、1 9 1 - A 5、1 9 7 - B 1、1 9 7 - H 2、1 9 7 - D 1 および 1 9 7 - D 2 の 5' 末端ストレッチは「R K S B U S N V G R」の共通の一般的ヌクレオチド配列を含む (C 型式 5 - 5')。上記した C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 7 - B 2、1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1、1 9 7 - E 3 および 1 9 7 - H 3 に加え、1 9 1 - A 5、1 9 7 - B 1、1 9 7 - H 2、1 9 7 - D 1 および 1 9 7 - D 2 の 3' 末端ストレッチは「Y Y N R C A S S M Y」の共通の一般的ヌクレオチド配列を含んでおり (C 型式 5 - 3')、これにより、C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 7 - B 2、1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1、1 9 7 - E 3 および 1 9 7 - H 3 の 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチが好ましい。C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 7 - B 2、1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1、1 9 7 - E 3 および 1 9 7 - H 3 のこれらの好ましい 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチは一般式において「R K S B U G S V G R」(C 型式 6 - 5'、5' 末端ストレッチ) および「Y C N R C A S S M Y」(C 型式 6 - 3'、3' 末端ストレッチ) に集約できる。

10

20

30

40

50

【0237】

C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 1 - D 5 - 0 0 1 のトランケーション誘導体を構築し、元の分子 1 9 1 - D 5 - 0 0 1 との競合的プルダウン結合試験において試験した (図 7 A、図 7 B および 図 1 9)。第 1 に、図 7 A に示す通り、5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチの長さを各々 10 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 1) から各々 7 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 4) に短鎖化し、これによりそれぞれ 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチの 10 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 1) のうち 9 つのヌクレオチド、または 7 ヌクレオチド (1 9 1 - D 5 - 0 0 4) のうち 6 つのヌクレオチドを相互にハイブリダイズすることができる。それぞれ 5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチの 7 ヌクレオチドまでの低減 (ここで 7 ヌクレオチド中 6 つが相互にハイブリダイズできる) により S D F - 1 への低減された結合親和性がもたらされた (1 9 1 - D 5 - 0 0 4)。C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 1 - D 5 - 0 0 4 の末端ストレッチを修飾することにより、1 9 1 - D 5 - 0 0 4 の 3' 末端ストレッチ内の塩基対を形成しないヌクレオチド「A」を、「C」により置換した (1 9 1 - D 5 - 0 0 5)。この修飾により結合が向上した。この誘導体、C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 1 - D 5 - 0 0 5 は、1 9 1 - D 5 - 0 0 1 と同様の S D F - 1 に対する結合を示した。5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチを更にトランケーションしてそれぞれ 5 ヌクレオチドとしたところ、合計 2 9 ヌクレオチドの長さの分子がもたらされた (1 9 1 - D 5 - 0 0 7)。1 9 1 - D 5 - 0 0 1 の類似性および C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 7 - B 2、1 9 1 - D 5 - 0 0 1、1 9 7 - H 1、1 9 1 - A 5、1 9 7 - H 3、1 9 7 - B 1、1 9 7 - E 3、1 9 7 - D 1、1 9 7 - H 2 および 1 9 7 - D 2 の類似性から、1 9 1 - D 5 - 0 0 7 に関して示されたデータから、5' 末端ストレッチおよび 3' 末端ストレッチは原則として 5 ヌクレオチドまでトランケーションすることができ、5' 末端ストレッチに関するヌクレオチド配列「C G G G A」および 3' 末端ストレッチに関する「U C C C G」を良好に試験することができた (C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 1 - D 5 - 0 0 7 0 1 0)。C 型 S D F - 1 結合核酸 1 9 1 - D 5 - 0 0 7 は意外にも 1 9 1 - D 5 - 0 0 1 よりも幾分良好に S D F - 1 に

結合している（競合結合試験を用いてアプタマーレベルで測定した）。191-D5-007の平衡結合定数 K_D をブルダウン結合試験を用いて（ $K_D = 2.2 \text{ nM}$ 、図20）、および表面プラズモン共鳴計測により（ $K_D = 0.8 \text{ nM}$ 、図21）測定した。191-D5-007に関して 0.1 nM の IC_{50} （抑制濃度50%）が細胞培養インビトロ化学遊走試験を用いて計測された。4ヌクレオチドまでの両方の末端ストレッチのさらなるトランケーション（191-D5-010、図7A）。

それぞれ4ヌクレオチドの5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを有しているC型SDF-1結合核酸191-D5-001の別の誘導体（191-D5-017/-024/-029）もまた191-D5-007との競合的ブルダウン結合試験においてSDF-1への低減された結合親和性を示している（図7B）。それぞれ5ヌクレオチド長の別の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチも追加的に試験した（191-D5-017-29a、191-D5-017-29b、191-D5-024-29a、191-D5-024-29b）。これらの誘導体の一般式は5'末端ストレッチに関しては「X₅SSSV」（C型式7-5'）であり、3'ストレッチに関しては「BSSSX₅」（C型式7-3'）である（式中、X₅は不在下「S」である）。5つの試験した変異体のうち2つは191-D5-007と同一のSDF-1に対する結合親和性を示した（191-D5-024-29a、191-D5-024-29b、図7B）。SDF-1に対して最良の結合親和性を示し、それぞれ5ヌクレオチドの5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを含む191-D5-001誘導体（191-D5-007、191-D5-024-29a、191-D5-024-29b）の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチの配列は一般式で集約できる（5'末端ストレッチ：「SGGSR」、C型式8-5'、3'末端ストレッチ：「YSCCS」、C型式8-3'）。

【0238】

C型SDF-1結合核酸197-B2のトランケーション誘導体を、元の分子197-B2および191-D5-007との競合的ブルダウン結合試験において分析した（図8）。191-D5-007との競合的ブルダウン試験を用いた場合、197-B2は191-D5-007と同じSDF-1への結合親和性を有することが分かった。5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを各々10ヌクレオチド（197-B2）から各5ヌクレオチド（197-B2-005）まで結合親和性を失うことなく短鎖化することにより、5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチのヌクレオチドを相互に完全にハイブリダイズさせることができる。197-B2-005の5'末端ストレッチ（「GCGGG」）および3'末端ストレッチ（「CCUGC」）を、197-B2-006の「GCGCGG」（5'末端ストレッチ）により、および「CCGGC」（3'末端ストレッチ）により置換した場合、SDF-1への結合親和性は完全に存続していた。197-B2および191-D5-001（およびその誘導体）は同じコアヌクレオチド配列（GGUUAAGGCUAGAAGUCGG）を共有し、それぞれ4ヌクレオチド長の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを有する191-5Dの数種の誘導体を試験したため、5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチの追加的トランケーションは省略した。それぞれ5'末端および3'末端に6ヌクレオチド（5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチ）を含む2つの別の誘導体を設計した。両方の分子（197-B2-006-31aおよび197-B2-006-31b）のSDF-1への結合親和性は、191-D5-007および197-B2-006で示されたものと同じである（図8）。SDF-1に対して最良の結合親和性を示し、それぞれ5ヌクレオチドの5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチを含む197-B2誘導体の5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチの配列は一般式で集約できる（5'末端ストレッチ：「GCSGG」、C型式9-5'、3'末端ストレッチ：「CKGC」、C型式9-3'）。

【0239】

C型SDF-1結合核酸191-D5-001（5'末端ストレッチ：「SGGSR」、C型式8-5'、3'末端ストレッチ：「YSCCS」、C型式8-3'）および197-B2（5'末端ストレッチ：「GCSGG」、C型式9-5'、3'末端ストレッチ

10

20

30

40

50

: 「CCKGC」、C型式9-3')のランケーションされた誘導体の好ましい5'ストレッチおよび3'ストレッチを組み合わせれば、5'末端ストレッチおよび3'末端ストレッチに関する共通の好ましい一般式は「SSSSR」(5'末端ストレッチ、C型式10-5')および「YSBSS」(3'末端ストレッチ、C型式10-3')である。

【0240】

[1.4 別のSDF-1結合核酸]

更に、「A型」、「B型」および「C型」のSDF-1結合モチーフを共有しない別の3種のSDF-1結合核酸を発見した。それらはプルダウン結合試験を用いてアプタマーとして分析した(図9)。

【0241】

図1~図9に示す配列のいずれも、それらのランケーションされた形態のみならず、それらの伸長された形態も含めて本発明による核酸であるが、そのようにそれぞれランケーションおよび伸長された核酸分子がなお、標的に結合できることが条件である。

【0242】

[実施例2: SDF-1結合シュピーゲルマーの40kDa-PEG修飾および他の修飾]

インビボにおけるシュピーゲルマーの血漿中滞留時間を延長するために、シュピーゲルマー193-G2-012、192-A10-008、191-D5-007、197-B2-006および197-B2-006-31bを、第3章に記載の通り、5'末端において40kDaのポリエチレングリコール(PEG)部分に共有結合的にカップリングした(PEG化クローン: 193-G2-012-5'-PEG、192-A10-008-5'-PEG、191-D5-007-5'-PEG、197-B2-006-5'-PEGおよび197-B2-006-31b-5'-PEG)。

【0243】

PEG化シュピーゲルマー分子は細胞培養インビトロTAX試験(第5章)において、Biacoreを用いたプラズモン共鳴計測(第6章)により分析した。全ての40kDa-PEG修飾シュピーゲルマーはなおSDF-1誘導化学遊走を抑制し、低ナノモル範囲においてSDF-1に結合することができた(図23A、図23B、図24Aおよび図24B)。

【0244】

更に、SDF結合シュピーゲルマー192-A10-001を40kDa-PEG、30kDa-PEG、100kDa-HES、または130kDa-HESで修飾した(PEG化クローン: 192-A10-001-5'-PEG40、192-A10-001-5'-PEG30、192-A10-001-5'-HES100、192-A10-001-5'-HES130; カップリング手順は第3章)。図25Aおよび図25Bに示す通り、PEG部分およびHES部分のいずれもSDF-1誘導化学遊走を抑制するシュピーゲルマーの効力に影響しなかった。

【0245】

[実施例3: アプタマーおよびシュピーゲルマーの合成および誘導体化]

[3.1 小規模合成]

アプタマーおよびシュピーゲルマーを、2'TBDMS RNAホスホロアミダイト化学法(Damha and Ogilvie, 1993)を用いながらABI394合成装置(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)による固相合成により製造した。D配置およびL配置のrA(N-Bz)-ホスホロアミダイト、rC(Ac)-ホスホロアミダイト、rG(N-ibu)-ホスホロアミダイト、およびrU-ホスホロアミダイトは、ChemGenes, Wilmington, MAから購入した。アプタマーおよびシュピーゲルマーはゲル電気泳動で精製した。

【0246】

[3.2 大規模合成および修飾]

シュピーゲルマーは2'TBDMS RNAホスホロアミダイト化学法(Damha and Ogilvie, 1993)を用いながらAektaPilot100合成装置

10

20

30

40

50

(Amersham Biosciences, General Electric, Healthcare, Freiburg) による固相合成により製造した。L-rA (N-Bz) - ホスホロアミダイト、L-rC (Ac) - ホスホロアミダイト、L-rG (N-ibu) - ホスホロアミダイト、および L-rU - ホスホロアミダイトは ChemGenes, Wilmington, MA, USA から購入した。5' - アミノ - モディファイアーは American International Chemicals Inc. (Framingham, MA, USA) から購入した。シュビーゲルマーの合成は L-riboG に対して開始し、L-riboC、L-riboA、L-riboU はそれぞれ CPG 孔径 1000 を修飾した (Link Technology, Glasgow, UK)。カップリングのために (サイクルあたり 15 分)、アセトニトリル中 0.3 M ベンジルチオテトラゾール (American International Chemicals Inc., Framingham, MA, USA)、およびアセトニトリル中それぞれ 0.2 M のホスホロアミダイト溶液 3.5 等量を使用した。酸化カップリングサイクルを用いた。オリゴヌクレオチド合成のための追加的な標準溶媒および試薬は Biosolve (Valkenswaard, NL) から購入した。シュビーゲルマーは DMT-ON 合成し、脱保護の後、Source 15 RPC 溶媒 (Amersham) を用いて分取用 RP-HPLC を介して精製した (Wincott F. et al., 1995)。5' DMT-基を 80% 酢酸を用いて除去した (RT で 90 分)。その後、2 M NaOAc 水溶液を添加し、5 K 再生セルロース膜 (Millipore, Bedford, MA) を用いながら接線流濾過によりシュビーゲルマーを脱塩した。

【0247】

[3.3 PEG化]

シュビーゲルマーのインビボの血漿中滞留時間を延長するために、シュビーゲルマーを 5' 末端において 40 kDa のポリエチレングリコール (PEG) 部分に共有結合的にカップリングした。

【0248】

PEG化のために (PEG化のための方法の技術的詳細は欧州特許出願第 EP 1306382 号参照)、精製された 5' アミノ修飾シュビーゲルマーを H₂O (2.5 ml)、DMF (5 ml) および緩衝液 A (5 ml。クエン酸・H₂O [7 g]、ホウ酸 [3.54 g]、リン酸 [2.26 ml] および 1 M NaOH [343 ml] を混合し、1 リットルの最終容量まで水を添加することにより調製した。pH = 8.4 は 1 M の HCl で調節した。) の混合物中に溶解した。

【0249】

シュビーゲルマー溶液の pH は 1 M の NaOH で 8.4 とした。次に 75 ~ 85% の最大収率が達成されるまで 0.25 等量の 6 分画で、30 分毎に 37 で 40 kDa PEG-NHS エステル (Nektar Therapeutics, Huntsville, AL) を添加した。反応混合物の pH は PEG-NHS エステルの添加の間、1 M の NaOH で 8 ~ 8.5 に維持した。

【0250】

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 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) と混合し、15 分間 95 で加熱した。次に PEG化シュビ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 0.1 M 酢酸トリエチルアンモニウム) を用いた Source 15 RPC 溶媒 (Amersham) による RP-HPLC により精製した。過剰の PEG は 5% 緩衝液 C において溶離し、PEG化シュビーゲルマーは 10 ~ 15% 緩衝液 C において溶離した。> 95% 純度 (HPLC で試験) の生成物画分を合わせ、40 ml の 3 M の NaOAc と混合した。PEG化シュビーゲルマーは接線流濾過により脱塩した (5 K 再生セルロース膜、Millipore, Bedford, MA)。

【0251】

[3.4 HES化]

10

20

30

40

50

シュピーゲルマーのインビボの血漿中滞留時間を延長するために、シュピーゲルマーを > 130 kDa の種々の分子量および > 0.5 の置換度を有するヒドロキシエチル澱粉 (HES) に共有結合的にカップリングした。シュピーゲルマーの 5' 末端がコンジュゲーションのための好ましい部位である。

【0252】

HES 化のために (核酸の HES 化のための方法の技術的詳細は独国公開第 DE 10 1 1 2 8 2 5 A 1 号を、D/L-核酸に関しては PCT WO 0 2 / 0 8 0 9 7 9 A 2 を参照)、精製された 5' アミノ修飾シュピーゲルマーを重炭酸ナトリウム (0.3 M、1 ml) に溶解し、pH を 8.5 に調節した。

【0253】

シュピーゲルマーに関しては、5 倍過剰量の遊離の HES 酸 (3.3 mmol、Supramol、Rosbach, Germany) およびジ (N-スクシンイミジル) カボネート (3.3 mmol) を N,N-ジメチルホルムミド (1 ml) に添加し、HES の活性化 N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの溶液を形成した。全ての反応物を溶解するために、混合物を 60 で短時間攪拌し、25 に冷却し、次に 25 で 1.5 時間攪拌した。シュピーゲルマーの溶液を活性化 HES の溶液に添加し、得られた混合物を 25 および pH 8.5 で攪拌した。反応は分析用 IEX-HPLC でモニタリングした。典型的には、コンジュゲーションは 1 時間以内に > 75% まで進行した。

【0254】

Source 15Q 溶媒 (GE, Freiburg, Germany) による IEX-HPLC 精製のために、反応混合物を 10 倍量の緩衝液 A (水/アセトニトリル 9:1 中に 1 mM の EDTA、25 mM の Tris、10 mM の NaClO₄、pH 4) と混合した。過剰の HES は 5% 緩衝液 A (水/アセトニトリル 9:1 中に 1 mM の EDTA、25 mM の Tris、500 mM の NaClO₄、pH 4) で溶離したのに対し、HES-シュピーゲルマーコンジュゲートは 20~30% 緩衝液 B で溶離した。> 95% 純度 (HPLC で試験) の生成物画分を合わせ、接線流濾過により脱塩した (5 K 再生セルロース膜、Millipore, Bedford, MA)。

【0255】

[実施例 4 : 結合定数の測定 (プルダウン結合試験)]

[4.1 直接プルダウン結合試験]

ビオチニル化ヒト D-SDF-1 へのアプタマーの親和性を、37 においてプルダウン結合試験形式で計測した。アプタマーは、[³²P] 標識 ATP (Hartman Analytic, Braunschweig, Germany) を用いて T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) により 5' ホスフェートの標識をした。標識されたアプタマーの比放射能は 200,000 ~ 800,000 cpm/pmol であった。アプタマーは、変性および再生後に、4 ~ 12 時間、種々の量のビオチニル化ヒト D-SDF-1 とともに選択緩衝液 (20 mM の Tris-HCl pH 7.4、137 mM の NaCl、5 mM の KCl、1 mM の MgCl₂、1 mM の CaCl₂ の 0.1% [w/vol] Tween-20) 中で、37 において、10 pM、20 pM、30 pM または 40 pM の濃度でインキュベートすることにより、低濃度で平衡化させた。選択緩衝液には 10 μg/ml ヒト血清アルブミン (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)、および 10 μg/ml 酵母 RNA (Ambion, Austin, USA) を補充することにより、使用するプラスチック製品または固定化マトリックスの表面との結合パートナーの吸着を防止した。ビオチニル化ヒト D-SDF-1 の濃度範囲は 8 pM ~ 100 nM に設定し、総反応容量は 1 ml とした。ペプチドおよびペプチド-アプタマー複合体は、選択緩衝液中で予備平衡化されている 1.5 μl のストレプトアビジンウルトラリンクプラス粒子 (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 上に固定化し、6 μl の総容量中に再懸濁した。粒子はサーモミキサー中で、各温度で、30 分間懸濁液中に保持した。固定化された放射能は、上澄みを分離し適切な洗浄をした後に、シンチレー

10

20

30

40

50

ションカウンターで定量した。結合のパーセントをピオチニル化ヒトD-SDF-1の濃度に対してプロットし、解離定数は、1:1の化学量論を仮定し、ソフトウェアアルゴリズム(GRAFIT、Erithacus Software; Surrey UK)を用いることにより求めた。

【0256】

[4.2 競合的プルダウン結合試験]

異なるD-SDF-1結合アプタマーを比較するために、競合的順位づけ試験を実施した。この目的のために使用可能な最も関連性の高いアプタマーを放射標識(上記参照)し、参照として使用した。変性および再生後、ニュートラビジンアガロースまたはストレプトアビジンウルトラリンクプラス(共にPierceより入手)上で固定化および洗浄後に競合を行うことなくペプチドへの約5~10%結合をもたらす条件において、1mlの選択緩衝液中、ピオチニル化ヒトD-SDF-1とともに37℃でインキュベートした。過剰の変性および再生した未標識D-RNAアプタマー変異体を標識参照アプタマーと共に異なる濃度となるように(例えば2nM、10nM及び50nM)添加することにより、結合反応に並行させた。試験すべきアプタマーは標的結合に関して参照アプタマーと競合したため、その結合特性に依存しながら結合シグナルを低下させた。この試験において最も活性であることがわかったアプタマーは次に、別のアプタマー変異体の競合的分析のための新しい参照として使用した。

10

【0257】

実施例5:SDF-1結合シュピーゲルマーによるSDF-1誘導化学遊走の抑制の分析
JurkatヒトT細胞白血病細胞(DSMZ、Braunschweigより入手)を、10%ウシ胎児血清、100ユニット/mlペニシリンおよび100µg/mlストレプトマイシン(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)を含有するグルタマックス(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)を添加したRPMI 1640培地中で、37℃および5%CO₂において培養した。実験の1日前に、標準培地(Invitrogen, Karlsruhe, Germany)中 $0.3 \times 10^6 / \text{ml}$ ($9 \times 10^6 / 30 \text{ml}$)の密度で新しいフラスコに細胞を播種した。

20

【0258】

実験のために、細胞を遠心分離(300gで5分間)し、再懸濁し、計数し、1回15mlのHBH(1mg/mlウシ血清アルブミンおよび20mMのHEPESを含有するハンスバランス塩溶液、Invitrogen, Karlsruhe, Germany)で洗浄した。次に細胞を使用するフィルタープレートの型に応じて $3 \times 10^6 / \text{ml}$ または $1.33 \times 10^6 / \text{ml}$ で再懸濁した。次にSDF-1および種々の量のシュピーゲルマーを含有する溶液に向けて、フィルタープレートの多孔性膜をとおして細胞を数時間遊走させた。トランスウェルプレートおよび孔径5µmの多孔性ポリカーボネート膜のインサート(Corning, 3421)またはマルチスクリーンMICプレート(Millipore, MAMIC5S10)のいずれかを使用した。

30

【0259】

[5.1 トランスウェルプレートに関するプロトコル]

刺激溶液(SDF-1+種々の濃度のシュピーゲルマー)をトランスウェルプレートの下コンパートメント中600µl HBH中に作成し、20~30分間インキュベートした。全ての条件は少なくとも2回行った。インサートを刺激溶液の入ったウェルに移し、 $3 \times 10^6 / \text{ml}$ で細胞懸濁液100µlをインサートに添加した(3×10^5 細胞/ウェル)。次に細胞を37℃で3時間遊走させた。

40

【0260】

その後、インサートを取り出し、60µlのリサズリン(resazurin)(Sigma, Deisenhofen, Germany)ワーキング溶液(PBS中440µM、Biochrom, Berlin, Germany)をウェル(およびキャリブレーションウェル)に添加した。次にプレートを2.5~3時間37℃でインキュベートした

50

。インキュベーションの後、各ウェル200 μ lを黒色の96ウェルプレートに移した。蛍光シグナルの計測はフルオスターオプティマ多重検出プレートリーダー（BMG, Offenburger, Germany）で、544nm（励起）および590nm（発光）において行った。

【0261】

[5.2 ミリポアマルチスクリーンプレートに関するプロトコル]

刺激溶液（SDF-1 + 種々の濃度のシュピーゲルマー）を0.2mlのロープロファイル96ウェルプレート中10X溶液として作成した。135 μ lのHBHをマルチスクリーンプレートの下コンパートメント内にピペットで添加し、刺激溶液15 μ lを添加した。全条件は3回繰り返して行った。20～30分の後、フィルタープレートで刺激溶液の入ったプレート内に挿入し、細胞懸濁液75 μ lを 1.33×10^6 /mlでフィルタープレートのウェルに添加した（ 1×10^5 細胞/ウェル）。次に細胞を37 $^{\circ}$ Cで3時間遊走させた。

【0262】

その後、インサートプレートを取り出し、20 μ lのリサズリンワーキング（resazurin working）溶液（PBS中440 μ M）を下ウェルに添加した。次にプレートを2.5～3時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。インキュベーションの後、各ウェル100 μ lを黒色の96ウェルプレートに移した。蛍光シグナルの計測は上記した通り行った。

【0263】

[5.3 評価]

評価のために、蛍光の数値をバックグラウンドの蛍光（ウェル中細胞不在）で補正した。次にSDF-1が存在する実験条件と存在しない実験条件の間の相違を計算した。シュピーゲルマーを有さない試料（SDF-1のみ）の数値を100%とし、これのパーセントとしてシュピーゲルマーを有する試料の数値を計算した。用量応答曲線に関してはパーセント数値をシュピーゲルマー濃度に対してプロットし、得られた曲線からグラフ上でIC₅₀値（シュピーゲルマー不在の場合の活性の50%が存在するシュピーゲルマーの濃度）を求めた。

【0264】

[5.4 結果]

[5.4.1 ヒトSDF-1によるJurkat細胞の用量依存的刺激]

ヒトSDF-1は用量依存的にJurkat細胞の遊走を刺激することがわかり、最大半量の刺激は約0.3nMにおいて観察された（図11）。

【0265】

[5.4.2 SDF-1結合シュピーゲルマーによるヒトSDF-1誘導化学遊走の用量依存的抑制]

細胞をヒトSDF-1に加え、漸増濃度のSDF-1結合シュピーゲルマーを含有する溶液に向けて遊走させたところ、用量依存的な抑制が観察された。試験したシュピーゲルマーのそれぞれのIC₅₀は実施例1に特定する通りである。非特異的な対照シュピーゲルマーをSDF-1結合シュピーゲルマーの代わりに使用した場合、1 μ Mまで抑制作用は観察されなかった（図26）。

【0266】

[5.4.3 SDF-1結合シュピーゲルマーによるマウスSDF-1誘導化学遊走の用量依存的抑制]

SDF-1は種を超えて高度に保存されており、マウス由来のSDF-1はヒトSDF-1aと1つのアミノ酸において異なる（18位においてバリンの代わりにイソロイシン）。マウスSDF-1はJurkat細胞の化学遊走を刺激することができ（図27）、この作用はヒトSDF-1の場合と同じ効力をもってシュピーゲルマー192-A10-001および191-D5-007-5'-PEGにより抑制されることがわかった（図28）。

10

20

30

40

50

【0267】

[実施例6：表面プラズモン共鳴計測による結合分析]

Biacore 2000 機器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を用いてヒト SDF-1 へのシュピーゲルマーの結合を分析した。アミン基を介して SDF-1 のカップリングを達成する場合は、SDF-1 は1~2時間水に対して透析 (Millipore VSWP 混合セルロースエステル、孔径 0.025 μ M) することにより干渉するアミンを除去した。CM4 センサチップ (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を活性化した後、5 μ l/分の流量で 0.4 M の NHS および 0.1 M の EDC の 1:1 希釈物 35 μ l を注入することによりタンパク質をカップリングした。次に、機器の応答が 1000~2000 RU (相対単位) の範囲となるまで 2 μ l/分の流量で 1~1.5 μ g/ml の濃度でケモカインを注入した。未反応の NHS エステルは 5 μ l/分の流量で 35 μ l の塩酸エタノールアミン溶液 (pH 8.5) を注入することにより脱活性化した。センサチップを結合緩衝液を用いて 2 回プライミングし、ベースラインが安定化するまで 10 μ l/分で 1~2 時間平衡化させた。全タンパク質に関し、速度論的パラメータおよび解離定数は、選択緩衝液 (Tris-HCl が 20 mM、NaCl が 137 mM、KCl が 5 mM、CaCl₂ が 1 mM、MgCl₂ が 1 mM、Tween-20 が 0.1% [w/v]、pH 7.4) 中 1000 nM、500 nM、250 nM、125 nM、62.5 nM、31.25 nM および 0 nM の濃度における一連のシュピーゲルマー注入により評価した。全実験において、分析は、10 μ l/分の流量において会合時間 180 秒および解離時間 360 秒を定義する Kinject コマンドを用いることにより 37 で実施した。データ分析および解離定数 (K_D) の計算はロングミュアーの 1:1 化学量論的フィッティングアルゴリズムを用いて BIA Evaluation 3.0 ソフトウェア (BIACORE AB, Uppsala, Sweden) により実施した。

【0268】

[実施例7：CXCR4 発現細胞への [¹²⁵I]-SDF-1 結合の SDF-1 結合シュピーゲルマーによる抑制]

[7.1 方法]

ヒト CXCR4 受容体をコードしている cDNA クローン (NM_003467.2) を OriGene Technologies (Rockville, MD) より購入し、pCR3.1 ベクター (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) にクローニングした。得られたベクターをリポフェクタミン 2000 (Invitrogen) を用いて CHO-K1 細胞 (DSMZ, Braunschweig, Germany) にトランスフェクトし、安定に発現している細胞株をゲネチシンによる処理により選択した。受容体の発現は RT-PCR により確認した。

【0269】

結合試験のために、CXCR4 発現細胞を 1×10^5 個/ウェルの細胞密度でポリリジンでコーティングされた 24 ウェルプレート内に播種し、50 ユニット/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン、および 0.5 mg/ml ゲネチシンを含有する CHO-Ultra 培地 (Cambrex, Verviers, Belgium) 中で、37 および 5% CO₂ で一晩培養した。

【0270】

結合実験のために、培地を除去し、細胞を 20 mM HEPES、1 mg/ml ウシ血清アルブミン および 0.1 mg/ml パシトラシン (HBB) を更に含有するハンクスバランス (Hanks balanced) 塩溶液で一回洗浄した。次に細胞を 50 pM の [¹²⁵I]-SDF-1 (PerkinElmer, Rodgau, Germany) および種々の濃度のシュピーゲルマーとともに室温で、0.2 ml の HBB 中で 1 時間インキュベートした。

【0271】

非特異的結合は、数個のウェルに対し、0.5 μ M の終濃度となるように未標識のヒト

SDF-1 (R & D Systems, Wiesbaden, Germany) を添加することにより求めた。

【0272】

インキュベーション時間の後、上澄みを除去し、ウェルを氷冷HBBで3回洗浄した。その後、細胞を0.1mlの0.1MのNaOHを用いて溶解した。溶解物をシンチレーションバイアルに移し、4mlのUnisafe1液体シンチレーションカクテル (Zinsser, Frankfurt, Germany) を添加したのち、Beckman LS 6500シンチレーションカウンターにおいて計数した。

【0273】

非特異的結合 (未標識SDF-1の大量存在下の結合) に関する数値が、高濃度 (500 pM) のシュピーゲルマーの存在下では全結合に関する数値より幾分高い値であったため、最大結合 (「max」) と500 pMシュピーゲルマー存在下の結合との間の差をIC₅₀値の計算のために使用した。

10

【0274】

[7.2 結果]

結合した [¹²⁵I]-SDF-1をシュピーゲルマーの濃度に対してプロットしたところ、SDF-1の結合は約60 pMのIC₅₀値でシュピーゲルマー192-A10-001によりブロックされることがわかった。

【0275】

[実施例8: SDF-1結合シュピーゲルマーによるSDF-1誘導MAPキナーゼ活性化の抑制]

20

[8.1 方法]

CXCR4発現CHO細胞を、0.5 × 10⁶個/ウェルの細胞密度で6ウェルプレート内に播種し、50ユニット/mlペニシリン、50 μg/mlストレプトマイシン、および0.5 mg/mlゲネチシンを含有するCHO-Ultra培地 (Cambrex, Verviers, Belgium) 中で、37 °C および5% CO₂で約3時間培養した。細胞結合の後、培地を除去し、50ユニット/mlペニシリン、50 μg/mlストレプトマイシンを含有するHam's F12培地と交換した。次に細胞を37 °C および5% CO₂において一晩インキュベートした。刺激の3時間前に、培地を新しいHam's F12培地と再度交換した。細胞を、ヒト1 nMのSDF-1および種々の量のシュピーゲルマーで5分間または10分間刺激した。その後培地を除去し、1mlの氷冷ホスフェート緩衝食塩水 (PBS) で1回迅速に洗浄し、その後SDS試料緩衝液 (Tris/塩酸がpH 6.8 および62.5 mM、グリセロールが10%、SDSが2%、プロモフェノールブルーが0.01%、β-メルカプトエタノールが5%) で溶解した。1 μlの0.5 u/μlベンゾナーゼ (Merck, Darmstadt, Germany) を各ウェルに添加し、室温で5~10分間インキュベートした後、溶解物をエッペンドルフ試験管に移し、5分間95 °Cでインキュベートし、その後の分析時まで-20 °Cで保存した。

30

【0276】

溶解物25 μlを10%変性SDSポリアクリルアミドゲル上で分離した。次にタンパク質をHybond ECLニトロセルロース膜 (Amersham/GE Healthcare, Munich, Germany) 上に電気プロットングにより移行させた。プロットングの後、タンパク質のローディングおよび移行の制御のためにボンソーレッド (3%トリクロ酢酸中に0.2%) で膜を染色し、次に一晩2~8 °Cで10%の脱脂粉乳を含有するTBS-T (トリス緩衝食塩水 (20 mMのTris/塩酸、pH 7.6、137 mMのNaCl) に0.1%のTween 20を添加) 中でインキュベーションすることによりブロックした。次に膜を室温でウサギ抗Phospho-MAPキナーゼ抗体 (TBS-T中の10%乳中に1:1000) とともに2時間インキュベートした。TBS-Tで5分間3回洗浄した後、膜を抗ウサギIgGHRPコンジュゲート (TBS-T中の10%乳中に1:2000) とともに室温で1時間インキュベートした。膜を再

40

50

度 TBS - T で 5 分間 3 回洗浄した後、LumiGlo^R ケミルミネセント試薬中で 1 分間インキュベートした。ルミネセンスは 30 秒 ~ 2 分間 Hyperfilm (商標) ECL ケミルミネセンスフィルム (Amersham / GE Healthcare) に曝露することにより検出した。抗体およびルミネセンス検出試薬は Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Germany) から入手した PhosphoPlus p44 / 42 MAPキナーゼ (Thr202 / Tyr204) 抗体キットの構成要素を用いた。

【0277】

[8.2 結果]

活性化された MAPキナーゼを反映しているバンドの強度の上昇によって示される通り、1 nM のヒト SDF - 1 で CXCR4 発現細胞を 5 分間刺激することにより、MAPキナーゼの著しい刺激がもたらされる。MAPキナーゼのこの活性化はシュピーゲルマー 191 - A10 - 001 により用量依存的に抑制することができる (図 30)。

【0278】

[実施例 9 : 大動脈輪新芽形成試験におけるヒト SDF - 1 結合シュピーゲルマー 193 - G2 - 012 - 5' - PEG の機能的分析]

ヒト SDF - 1 結合シュピーゲルマー 193 - G2 - 012 - 5' - PEG が標準的な血管新生臓器培養試験においても機能するかどうかを調べるために、大動脈輪新芽形成試験を実施した。体外移植組織からの血管様の伸長物の長さおよび充満性を評価するこの試験は血管新生に関する最も広範に使用されている臓器培養モデルとなっている (Auerbach et al., 2003)。SDF - 1 はこの型の試験において新芽形成を誘導することがすでにわかっている (Salcedo et al., 1999)。

【0279】

ラット大動脈を輪型に切り出し、コラーゲンマトリックスに包埋し、SDF - 1 および SDF - 1 + ヒト SDF - 1 結合シュピーゲルマー 193 - G2 - 012 - 5' - PEG または SDF + SDF - 1 に結合しない非機能性 PEG 化対照シュピーゲルマーとともにインキュベートした。6 ~ 7 日の後、新芽形成 (即ち内皮細胞の増殖) を写真撮影および新芽形成指数の測定により分析した。

【0280】

[方法]

雄ラット由来の大動脈を Bagheri Life sciences (Berlin, Germany) より入手した。大動脈は新しく調製し、50 ユニット / ml ペニシリン、50 μ g / ml ストレプトマイシン (共に Invitrogen, Karlsruhe, Germany)、および 2.5 μ g / ml フンジゾン (Cambrex, USA) を含有する MCDB 131 培地 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 中で、氷上で輸送した。

【0281】

実験のために単一の大動脈を培地と共に細胞培養皿に移し、残存する結合組織を除去した。次に大動脈を約 1 ~ 2 mm の長さの輪にメスで切りだした。輪を培地 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 中で十分洗浄し (少なくとも 5 回)、次にウェル当たりコラーゲン溶液 450 μ l の入った 24 ウェルプレートのウェルに入れた。このコラーゲン溶液は 9 ml のラット尾部コラーゲン (0.1% 酢酸中 3 mg / ml、Sigma, Deisenhofen, Germany) を 1.12 ml の 10 X 培地 199 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)、1.12 ml の 10 X コラーゲン緩衝液 (0.05 N の NaOH、200 mM の HEPES、260 mM の NaHCO₃) および 0.6 ml の 200 mM グルタミンと混合することにより製造した。輪はトリミングされた端部がウェルの底面に対して垂直となるように方向づけた。37 °C で少なくとも 1 時間プレートをインキュベートすることによりコラーゲンを固化させた。その後、(SDF - 1 およびシュピーゲルマーが) 添加された MCDB 131 培地をウェル当たり 1 ml 添加した。次に輪を 6 ~ 7 日間 37 °C でインキュベートした

10

20

30

40

50

。新芽形成の対照として V E G F (血管内皮成長因子) を用いて追加的に実験を行った。

【 0 2 8 2 】

新芽形成はデジタルカメラを用いて写真を撮影することにより記録した。一部の場
合においては、10%パラホルムアルデヒド1mlを添加することにより輪を固定し、その
後の記録用に2~8で保存した。写真は S c i o n I m a g e 画像処理ソフトウェアを用
いて分析した。ステージマイクロメーターから撮られた写真を参考にしながらキャリブ
レーションした後、輪の一端から0.33mmの距離に線を描いた。この線に沿ったプロッ
トヒストグラムをソフトウェアにより作成し、ヒストグラムを印刷し、ピーク(線を通
過する新芽を示す)を計数した。この数を新芽形成指数とみなした。条件当たり4~5輪
を評価した。統計学的分析は E x c e l のための W i n S T A T を用いて実施した。

10

【 0 2 8 3 】

[結果]

S D F - 1 は新芽形成を誘導し、この作用はヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-19
3 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G でブロックできることが明らかになった。非機能的 P E
G 化対照シュビーゲルマーによる S D F - 1 誘導新芽形成のブロッキングは観察されな
かった(図31および図32)。

【 0 2 8 4 】

[実施例 10 : ヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E
G の単回静脈内大量注射としてラットに投与された S D F - 1 およびヒト S D F - 1 結合
シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G の血漿中レベル]

20

ヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G がインビボ
において機能するかどうか試験するために、ヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193
- G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G を静脈内大量注射としてラットに投与し、ヒト S D F - 1
結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G および S D F - 1 の血漿中レ
ベルを測定した。対照として未投与ラットの S D F - 1 の血漿中レベルも測定した。

【 0 2 8 5 】

[動物、投与および試料採取]

ヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G を 0 . 5 m
g / m l の終濃度となるように P B S 中に溶解し、滅菌濾過した。雄の S p r a g u e
D a w l e y ラット(体重約300g)に単回静脈内大量注射として 1 . 0 m g / k g の
ヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G を投与した。
数回の時点(図33に示す)において血液試料を採取することによりヒト S D F - 1 結合
シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G の血漿中クリアランスを追跡した
。

30

【 0 2 8 6 】

[シュビーゲルマーの定量のためのサンドイッチハイブリダイゼーション試験]

試料中のヒト S D F - 1 結合シュビーゲルマー-193 - G 2 - 0 1 2 - 5 ' - P E G の
量をサンドイッチハイブリダイゼーション試験により定量した。サンドイッチハイブリ
ダイゼーション試験の原理は一般的に使用されている E L I S A (酵素結合免疫吸着試験)
と極めて同様であり、シュビーゲルマーの固定化と検出である。検出はシュビーゲル
マーの一端へのビオチニル化検出プローブのハイブリダイゼーションに基づく。シュビー
ゲルマーの残余の1本鎖の末端は固定化されたキャプチャープローブへのハイブリダイ
ゼーション時の複合体の固定化を媒介する。未結合の複合体が除去された後、シュビー
ゲルマーにハイブリダイズした検出プローブは最終的にはケミルミネセンス物質を変換するスト
レプトアビジン/アルカリホスファターゼコンジュゲートにより検出される。そのようなサ
ンドイッチハイブリダイゼーション試験はまた D r o l e t e t a l . (D r o l e t
e t a l . , 2 0 0 0) により記載される通り R N A アプタマーの検出および定量
にも適用した。

40

【 0 2 8 7 】

[ハイブリダイゼーションプレート調製]

50

193-G2-012キャプチャープローブ(配列番号240)を4で一晚0.5Mリン酸ナトリウム、1mのMEDTA、pH8.5中において100nMで白色DNA-BIND96ウェルプレート(Corning Costar, Wiesbaden, Germany)に固定化した。ウェルを2回洗浄し、25で2時間0.25Mリン酸ナトリウム、0.5mMのEDTA、pH8.5中で0.5%w/vBSAでブロックし、再度洗浄し、使用時まで室温で保存した。ハイブリダイゼーションの前に、洗浄緩衝液(3xSSC、0.5%[w/v]ナトリウムドデシルサルコシネート、pH7.0、予め、20x保存用液[3MのNaCl、0.3Mクエン酸三ナトリウム]をナトリウムラウロイルサルコシンを使用せずに調製し、適宜希釈しておく)で2回洗浄した。

【0288】

[試料調製]

全試料とも2回繰り返して試験した。血漿試料を氷上で解凍し、回転混合し、冷却卓上遠心分離機中で短時間遠心分離した。組織ホモジネートを室温で解凍し、最大速度および室温において5分間遠心分離した。試料を以下のスキームに従って室温でハイブリダイゼーション緩衝液(洗浄緩衝液中40nMの193-G2-012検出プローブ[配列番号241])で希釈した。

1:10 10μl試料+90μlハイブリダイゼーション緩衝液

1:100 20μlの1:10+180μlハイブリダイゼーション緩衝液

【0289】

全ての試料希釈物を試験した。ヒトSDF-1結合シュピーゲルマー193-G2-012-5'-PEG標準物質を連続希釈することにより0.001~40nM範囲にわたる12点検量線を得た。検量線用の標準物質は試験における試料のものと同じとした。

【0290】

[ハイブリダイゼーションおよび検出]

試料を5分間95に加熱し、室温に冷却した。シュピーゲルマー/検出プローブ複合体を振とう器上で500rpmにおいて25で45分間固定化されたキャプチャープローブにアニーリングさせた。未結合のシュピーゲルマーは洗浄緩衝液および1xTBST(20mMのTris-Cl、137mM NaCl、0.1%Tween20、pH7.5)でそれぞれ2回洗浄することにより除去した。ハイブリダイズした複合体は振とう器上で500rpmにおいて25で1時間1xTBST中に1:5000希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼにより検出した。未結合のコンジュゲートを除去するために、ウェルを再度1xTBSTで洗浄した。最後にウェルに100mlのCSDP基質(Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)を充填し、25で45分間インキュベートした。ケミルミネセンスはFLUOstar Optimaマイクロプレートリーダー(BMG Labtechnologies, Offenbourg, Germany)上で計測した。

【0291】

[データ分析]

以下の試験した試料希釈物を用いて定量的データ分析を行った。

ラットEDTA血漿 1:100

ビヒクル群(シュピーゲルマー投与せず)から得られたデータをバックグラウンドシグナルとして差し引いた。

【0292】

[シュピーゲルマーの定量的のためのELISA]

血漿試料中に存在するSDF-1の量は96ウェルプレート上にコーティングされたヒトSDF-1に対して特異的な抗体を用いるインビトロの酵素結合免疫吸着試験により定量した(ヒトSDF-1 ELISAキット、RayBiotech, Norcross GA, USA)。試験は供給元の説明書に従って実施した。

【0293】

[結果]

10

20

30

40

50

図33に示す通り、未投与のラットにおけるSDF-1の通常の血漿中レベルは低ピコモル範囲にある(約50 pM)。これとは対照的に、ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGを投与したラットの血漿中レベルは異なっているように観察された。ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEG投与後最初の8時間以内にSDF-1の血漿中レベルは約700 pMまで上昇した。12~72時間においては、SDF-1の血漿中レベルは再度約50 pMまで低下した。このようなSDF-1血漿中レベルの時間経過はヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGの血漿中レベルに直接関連する可能性がある。ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGの腎排出のため、ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGの血漿中レベルは72時間以内に約1100 nMから50 nM未満まで低下した。しかしながら、ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEG(MW約54000 Da)は非PEG化シュビーゲルマー(約15000 Da)またはSDF-1のような腎濾過限界未満の分子質量を有する他の分子で観察されるように1時間以内に身体から排出されることはなかった。内因性のSDF-1はヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGにより結合されてSDF-1-シュビーゲルマー複合体を形成し、これによりSDF-1の排出および/または分解が遅延し、これは結果的に最初の8時間以内に上昇したSDF-1血漿中レベルをもたらした。経時的にヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGの排出が進行するため、SDF-1のような遙かに小型の分子の場合よりも排出速度が遙かに緩徐となるため、ヒトSDF-1結合シュビーゲルマー193-G2-012-5'-PEGおよびSDF-1による形成された複合体の血漿中レベルは低下した(図33)。

10

20

【0294】

[先行技術文献]

本明細書で引用されている文書の全参考文献データは、それとは反対のことが示されていない場合は以下の通りであり、上記参考文献の開示は引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

Aiuti, A., I. J. Webb, et al. (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* 185 (1): 111-20.

30

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-10.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.

Ambati, J., A. Anand, et al. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med.* 9: 1390-7.

Arya, S. K., C. C. Ginsberg, et al. (1999). "In vitro phenotype of SDF1 gene mutant that delays the onset of human immunodeficiency virus disease in vivo." *J Hum Virol* 2(3): 133-8.

40

Auerbach et al. (2003) Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin.Chem.* 49: 32-40.

Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature* 392(6676): 565-8.

Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55: 97-179.

Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12." *Blood* 105(6): 2449-57.

50

- Balabanian, K., J. Couderc, et al. (2003). "Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus." *J Immunol* 170(6): 3392-400.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 4(7): 540-50.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385(6617): 640-4.
- Bertolini, F., C. Dell'Agnola, et al. (2002). "CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer Res* 62(11): 3106-12.
- Bleul, C. C., J. L. Schultze, et al. (1998). "B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement." *J Exp Med* 187(5): 753-62. 10
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382(6594): 829-33.
- Brooks, H. L., Jr., S. Caballero, Jr., et al. (2004). "Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone." *Arch Ophthalmol* 122(12): 1801-7.
- Buckley, C. D., N. Amft, et al. (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." *J Immunol* 165(6): 3423-9. 20
- Burger, J. A., N. Tsukada, et al. (2000). "Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1." *Blood* 96(8): 2655-63.
- Butler, J. M., S. M. Guthrie, et al. (2005). "SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy." *J Clin Invest* 115(1): 86-93.
- Cabioglu, N., A. Sahin, et al. (2005). "Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow." *Clin Exp Metastasis* 22(1): 39-46.
- Corcione, A., L. Ottonello, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1 as a chemotactant for follicular center lymphoma B cells." *J Natl Cancer Inst* 92(8): 628-35. 30
- Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." *Embo J* 16(23): 6996-7007.
- D'Apuzzo, M., A. Rolink, et al. (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." *Eur J Immunol* 27(7): 1788-93.
- De Klerck, B., L. Geboes, et al. (2005). "Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis." *Arthritis Res Ther* 7(6): R1208-20. 40
- Drolet DW, Nelson J, Tucker CE, Zack PM, Nixon K, Bolin R, Judkins MB, Farmer JA, Wolf JL, Gill SC, Bendele RA (2000). Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. *Pharm. Res.* 17:1503
- Eaton, B. E., L. Gold, et al. (1997). "Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers." *Bioorg Med Chem* 5(6): 1087-96.
- Fedyk, E. R., D. Jones, et al. (2001). "Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing." *J Immunol* 166(9): 5749-54. 50

- Fong, D. S., L. P. Aiello, et al. (2004). "Diabetic retinopathy." *Diabetes Care* 27(10): 2540-53.
- Geminder, H., O. Sagi-Assif, et al. (2001). "A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma." *J Immunol* 167(8): 4747-57.
- Godessart, N. (2005). "Chemokine receptors: attractive targets for drug discovery." *Ann N Y Acad Sci* 1051: 647-57.
- Grassi, F., S. Cristino, et al. (2004). "CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients." *J Cell Physiol* 199(2): 244-51. 10
- Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." *Cell* 124(1): 175-89.
- Guleng, B., K. Tateishi, et al. (2005). "Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner." *Cancer Res* 65(13): 5864-71.
- Gulino, A. V., D. Moratto, et al. (2004). "Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome." *Blood* 104(2): 444-52. 20
- Hartmann, T. N., M. Burger, et al. (2004). "The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer." *J Biol Regul Homeost Agents* 18(2): 126-30.
- Hwang, J. H., H. K. Chung, et al. (2003). "CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 88(1): 408-16.
- Jiang, W., P. Zhou, et al. (1994). "Molecular cloning of TPAR1, a gene whose expression is repressed by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)." *Exp Cell Res* 215(2): 284-93.
- Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, et al. (1994). "Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation." *J Exp Med* 179(3): 881-7. 30
- Juarez, J. and L. Bendall (2004). "SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis." *Histol Histopathol* 19(1): 299-309.
- Kanbe, K., K. Takagishi, et al. (2002). "Stimulation of matrix metalloproteinase 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4." *Arthritis Rheum* 46(1): 130-7.
- Kang, H., G. Watkins, et al. (2005). "Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer." *Breast Cancer Res* 7(4): R402-10. 40
- Kawai, T., U. Choi, et al. (2005). "Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome." *Exp Hematol* 33(4): 460-8.
- Koshiba, T., R. Hosotani, et al. (2000). "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." *Clin Cancer Res* 6(9): 3530-5.
- Krumbholz, M., D. Theil, et al. (2006). "Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment." *Brain* 129: 200-211. 50

- Kryczek, I., A. Lange, et al. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." *Cancer Res* 65(2): 465-72.
- Kucia, M., R. Reza, et al. (2005). "Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis." *Stem Cells* 23(7): 879-94.
- Kusser, W. (2000). "Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution." *J Biotechnol* 74(1): 27-38.
- Lapteva, N., A. G. Yang, et al. (2005). "CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo." *Cancer Gene Ther* 12(1): 84-9. 10
- M.J. Damha, K.K. Ogilvie, *Methods in Molecular Biology, Vol. 20 Protocols for oligonucleotides and analogs*, ed. S. Agrawal, p. 81-114, Humana Press Inc. 1993
- Ma, Q., D. Jones, et al. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and deranged cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9448-53.
- Marechal, V., F. Arenzana-Seisdedos, et al. (1999). "Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* 73(5): 3608-15.
- Matthys, P., S. Hatse, et al. (2001). "AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice." *J Immunol* 167(8): 4686-92. 20
- McGinnis S, Madden TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W20-5.
- Meleth, A. D., E. Agron, et al. (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(11): 4295-301.
- Menu, E., K. Asosingh, et al. (2006). "The involvement of stromal derived factor 1alpha in homing and progression of multiple myeloma in the 5TMM model." *Haematologica*.
- Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines." *Crit Rev Immunol* 12(1-2): 17-46. 30
- Moser, B., M. Wolf, et al. (2004). "Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control." *Trends Immunol* 25(2): 75-84.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(6824): 50-6.
- Murdoch, C. (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." *Immunol Rev* 177: 175-84.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* 52(1): 145-76.
- Nagasawa, T., H. Kikutani, et al. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2305-9. 40
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382(6592): 635-8.
- Needleman & Wunsch (1970), A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol.* 48(3):443-53.
- Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, et al. (1991). "Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family." *Annu Rev Immunol* 9: 617-48.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated S 50

- DF-1/CXCL12 secretion." *Cell* 121(3): 335-48.
- Pearson & Lipman (1988), Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444
- Perissinotto, E., G. Cavalloni, et al. (2005). "Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression." *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 1): 490-7.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2003). "The stromal derived factor-1/CXCL12-CXCR4 chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases." *Am J Respir Crit Care Med* 167(12): 1676-86.
- Ponath, P. D., S. Qin, et al. (1996). "Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils." *J Clin Invest* 97(3): 604-12. 10
- Rubin, J. B., A. L. Kung, et al. (2003). "A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23): 13513-8.
- Salcedo et al. (1999) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells. *In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1a.* *Am.J.Pathol.* 154:1125-1135.
- Salcedo, R. and J. J. Oppenheim (2003). "Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses." *Microcirculation* 10(3-4): 359-70. 20
- Salcedo, R., K. Wasserman, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: *In vivo* neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha." *Am J Pathol* 154(4): 1125-35.
- Salvucci, O., L. Yao, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1." *Blood* 99(8): 2703-11.
- Saur, D., B. Seidler, et al. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." *Gastroenterology* 129(4): 1237-50. 30
- Schall, T. J. and K. B. Bacon (1994). "Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation." *Curr Opin Immunol* 6(6): 865-73.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." *Cancer Res* 62(20): 5930-8.
- Sengupta, N., S. Caballero, et al. (2005). "Preventing stem cell incorporation into choroidal neovascularization by targeting homing and attachment factors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1): 343-8. 40
- Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* 28(3): 495-500.
- Smith & Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2: 482
- Soriano, A., C. Martinez, et al. (2002). "Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression." *J Infect Dis* 186(7): 922-31.
- Springer, T. A. (1995). "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration." *Annu Rev Physiol* 57: 827-72.
- Sun, Y. X., A. Schneider, et al. (2005). "Skeletal localization and neutralization 50

on of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." J Bone Miner Res 20(2): 318-29.

Takenaga, M., H. Tamamura, et al. (2004). "A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma." Biochem Biophys Res Commun 320(1): 226-32.

Tamamura, H., M. Fujisawa, et al. (2004). "Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent." FEBS Lett 569(1-3): 99-104.

Tashiro, K., H. Tada, et al. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science 261(5121): 600-3. 10

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.

Wang, J., E. Guan, et al. (2001). "Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages." J Biol Chem 276(52): 49236-43.

Wang, N., Q. L. Wu, et al. (2005). "Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome." J Transl Med 3: 26.

Wincott F, DiRenzo A, Shaffer C, Grimm S, Tracz D, Workman C, Sweedler D, Gonzalez C, Scaringe S, Usman N (1995). Synthesis, deprotection, analysis and purification of RNA and ribozymes. Nucleic Acids Res. 23(14):2677-84 20

Yamaguchi, J., K. F. Kusano, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization." Circulation 107(9): 1322-8.

Yasumoto, K., K. Koizumi, et al. (2006). "Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer." Cancer Res 66(4): 2181-7.

Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2001). "Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma." J Clin Invest 108(2): 269-77. 30

Zeelenberg, I. S., L. Ruuls-Van Stalle, et al. (2003). "The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases." Cancer Res 63(13): 3833-9.

Zhou, Y., P. H. Larsen, et al. (2002). "CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival." J Biol Chem 277(51): 49481-7.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature 393(6685): 595-9.

【 0 2 9 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した本発明の特徴は別個およびそのいずれかの組み合わせにおける双方において、本発明をその種々の形態で実現するための材料としてよい。 40

【図1】

A型SDF-1結合核酸

名称	nt.	配列: 5'-3'	結合
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CGCAGC
192-G10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-F10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CGCAGC
192-B11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-C9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	UACAGC
192-E10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	UACAGC
192-C10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-D11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-G11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-H11	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CAUAGC
192-D10	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CGCAGC
192-E9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
192-H9	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CGCAGC
191-A6	39	AGCGUGAAAGUAACAUGUCAAA-UGAAAGGUAGC	CACAGC
A型1 Formula-1	26	AAAGYRACARHCUMAAUGAAGGUAGC	
A型1 Formula-2	26	AAAGYRACARHCUMAA-UGAAAGGUAGC	
A型1 Formula-3	27	AAAGYRACARHCUMAAUGAAGGUAGC	
A型1 Formula-4	26	AAAGYRACARHCUMAAUGAAGGUAGC	
A型1 Formula-5-5'		RSHRYR	
A型1 Formula-5-3'		YRYSY	

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端における末端ヌクレオチド(太字)

SDF-1結合モチーフを主に含む場合があるヌクレオチド

nt.: スクレオチド 可変位置 ^

結合: クロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した。

≡: 192-A10-001と等しい結合親和性
 <: 192-A10-001より弱い結合親和性
 <<: 192-A10-001より弱い結合親和性
 <<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性

図1

【図2A】

A型SDF-1結合核酸192-A10-001の誘導体

名称	nt.	配列: 5'-3'	結合	PD: K ₀ [nM]	Blacore: K ₀ [nM]	TAX IC ₅₀ [nM]
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	1.5	1.0	0.1-0.2
192-A10-002	36	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	=	=	=
192-A10-003	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<	<	<<
192-A10-004	32	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<	<<	<<<
192-A10-005	30	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<	<<<	<<<<
192-A10-006	28	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<	<<<<	<<<<<
192-A10-007	26	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	i.a.	i.a.	i.a.

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)

SDF-1結合モチーフを主に含む場合があるヌクレオチド

nt.: スクレオチド

結合: クロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 ≡: 192-A10-001と等しい結合親和性
 <: 192-A10-001より弱い結合親和性
 <<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性

PD: クロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 TAX: クロロンは細胞毒性におけるインビトロでの化学遊走試験においてシユベ-グルマーとして試験した。

図2A

【図2B】

A型SDF-1結合核酸192-A10-001の誘導体

名称	nt.	配列: 5'-3'	結合	PD: K ₀ [nM]	Blacore: K ₀ [nM]	TAX IC ₅₀ [nM]
192-A10-001	38	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	1.5	1.0	0.1-0.2
192-A10-002	36	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	=	=	=
192-A10-008	36	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	=	1.4	=
192-A10-015	36	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<	4.6	<
192-A10-014	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<	9.0	<
192-A10-016	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<	i.a.	<
192-A10-017	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<	<<	<<
192-A10-018	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<	<<<	<<<
192-A10-019	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<	<<<<	<<<<
192-A10-020	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<<	<<<<<	<<<<<
192-A10-021	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<<<	<<<<<<	<<<<<<
192-A10-022	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<<<<	<<<<<<<	<<<<<<<
192-A10-023	34	GCUGUGAAAGUAACAUGUCAAAUGAAGGUAGC	CGCAGC	<<<<<<<<	<<<<<<<<	<<<<<<<<

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)

SDF-1結合モチーフを主に含む場合があるヌクレオチド

nt.: スクレオチド

結合: クロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 ≡: 192-A10-001と等しい結合親和性
 <: 192-A10-001より弱い結合親和性
 <<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<<<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性

PD: クロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 TAX: クロロンは細胞毒性におけるインビトロでの化学遊走試験においてシユベ-グルマーとして試験した。

図2B

【図3】

B型SDF-1結合核酸

名称	nt.	配列: 5'-3'	結合
193-G2-001	47	AGCGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGCU	+
193-G2-001	47	AGCGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGCU	+
193-F2-001	47	AGCGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGCU	+
193-G1-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<<
193-D2-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<
193-A1-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<<<
193-B3-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<
193-B3-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<<
193-H3-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<
193-E3-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<<
193-D1-002	45	GCUGUGUGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	<<<
B型1 Formula-1	35	UGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	
B型1 Formula-2	35	UGUGAUCUAGAUGUGAGGCGGAGUCCUAGUCAGGUAGCGC	
B型1 Formula-3-5'		X1GCRWG	
B型1 Formula-3-3'		KRYSXC4	

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端における末端ヌクレオチド(太字)

SDF-1結合モチーフを主に含む場合があるヌクレオチド

nt.: スクレオチド 可変位置

結合: クロロンG2, G2およびF2は192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験し、他のすべてのクロロンは192-A10-001に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した(図4B参照)。
 (+)は192-A10-001と同等のSDF-1に対する結合親和性を有する193-G2-012に対する競合的結合試験においてアプタマーとして試験した(図4B参照)。

X1: 192-A10-001より強い結合親和性
 <: 192-A10-001より弱い結合親和性
 <<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性
 <<<<: 192-A10-001より通かに弱い結合親和性

X1=[A]または不存, X4=[U]または不存

図3

【 図 4 A 】

B型SDF結合核種193-C2/G2-001の誘導体

名称	nt.	配列 : 5'-3'	結合 K ₀ [nM]	Blaacore K ₀ [nM]
193-C2-001	47	AGCCGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	0.3	0.5
193-C2-001	47	AGCCGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	=	0.6
193-C2-002	45	GCCTGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	=	0.8
193-C2-003	43	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACG	<	
193-C2-004	41	GUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGAC	<<	
193-C2-005	39	UGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGAC	<<<	
193-C2-006	37	GUUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGAC	<<<	
193-C2-007	35	GUUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGAC	i. a.	

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)
 SDF結合モチーフを主に含む結合があるヌクレオチド i.a.: 不活性 nt.: スクレオチド
 </</</<<<: 193-G2-001より弱い結合親和性(<), 遙かに弱い結合親和性(<<<)または極めて遙かに弱い結合親和性(<<<<)
 =: 193-G2-001と等しい結合親和性

図4A

【 図 4 B 】

B型SDF結合核種193-C2/G2-001の誘導体

名称	nt.	配列 : 5'-3'	結合 K ₀ [nM]	Blaacore K ₀ [nM]
193-G2-001	47	AGCCGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	0.3	0.5
193-G2-012	45	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	=	0.3
193-G2-013	45	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	<<	5.3
193-G2-014	43	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	<<	4.7
193-G2-015	43	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	<<<	4.5
193-G2-016	43	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	<<<	4.2
193-G2-017	43	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCC	<<<	4.2

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)
 SDF結合モチーフを主に含む結合があるヌクレオチド i.a.: 不活性 nt.: スクレオチド
 </</</<<<: それぞれ193-G2-001および193-G2-012より弱い結合親和性(<), 遙かに弱い結合親和性(<<<)または極めて遙かに弱い結合親和性(<<<<)
 =: 193-G2-001と等しい結合親和性

図4B

【 図 5 】

C型SDF-1結合核種

名称	nt.	配列 : 5'-3'	結合
197-02	39	GUCUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<
197-05-001	39	AGCCGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<
197-01	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<
197-03	48	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<<
197-03-001	48	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<
197-03-001*	48	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<
197-02	48	CCUUGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<<
197-05	39	AGCCGUGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	<<
197-03	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<
197-01	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<<
197-03	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<
197-02	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<<
197-01	38	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<<
197-02	39	GUGUGCCGCGGUGUAGGGCUAGAGUUGCCUGAUCGACGC	<<
C型式1 Formula-1	19	GGUAGGGCUHRRAGUUGCG	
C型式1 Formula-2	18	GGUAGGGCUHRAAGUUGCG	
C型式1 Formula-3	19	GGUAGGGCUHRRAGUUGCG	
C型式1 Formula-4	19	GGUAGGGCUHRRAGUUGCG	

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)
 SDF-1結合モチーフを主に含む結合があるヌクレオチド
 nt.: スクレオチド 可変位置
 結合: クロロンは192-A10-001に対する結合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 </</</<<<: 192-A10より弱い結合親和性, <</</</<<<: 192-A10より遙かに弱い結合親和性
 *: 代替ハイブリダイゼーション

図5

【 図 6 】

C型SDF結合核種190-A3-001の誘導体

名称	nt.	配列 : 5'-3'	結合
190-A3-001	48	CGUGCCGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	
190-A3-001*	48	CGUGCCGUGAUCUAGAUAGUUGCCUGAUCUAGUCAGGACCCU	
190-A3-003	38	UGAUAUAGGGUAGGGCUUAAAGUUGCGUGAUAUUCUA	=
190-A3-004	36	GAGAUAUAGGGUAGGGCUUAAAGUUGCGUGAUAUUCUC	=
190-A3-007	29	CGGGUUGGGGCUUAAAGUUGCGUGAUAUUCU	<<<

相互にハイブリダイズする場合は5'-末端および3'-末端における末端ヌクレオチド(太字)
 SDF結合モチーフを主に含む結合があるヌクレオチド i.a.: 不活性 nt.: スクレオチド
 </</</<<<: 190-A3-001より弱い結合親和性(<), 遙かに弱い結合親和性(<<<)または極めて遙かに弱い結合親和性(<<<<)
 =: 190-A3-001と等しい結合親和性

結合: クロロンは190-A3-001に対する結合的結合試験においてアプタマーとして試験した。
 *: 末端ヌクレオチドの代替ハイブリダイゼーション

図6

【 図 1 0 】

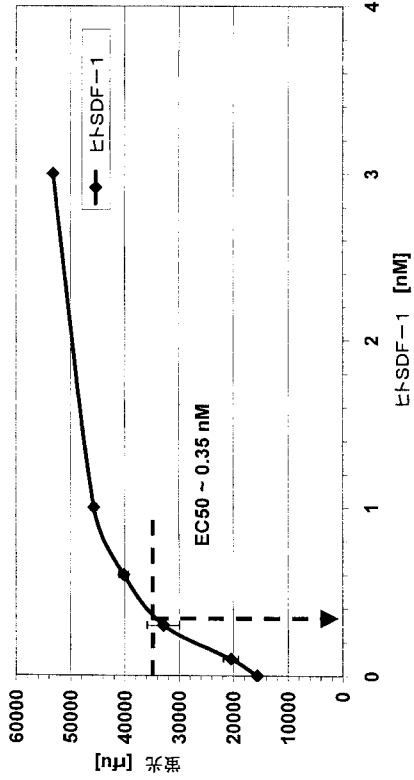


図10

【 図 1 1 】

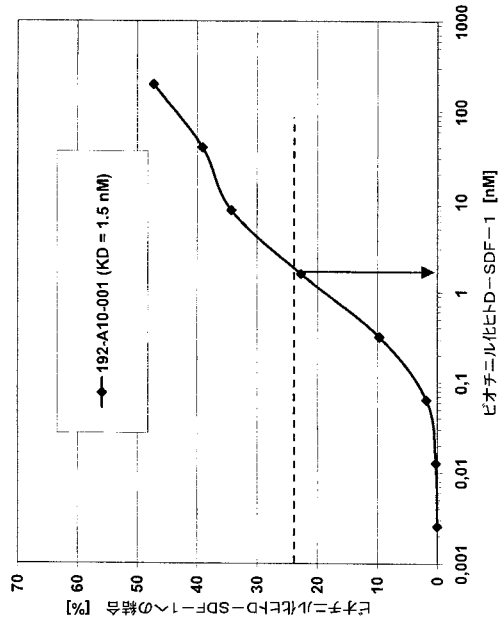


図11

【 図 1 2 】

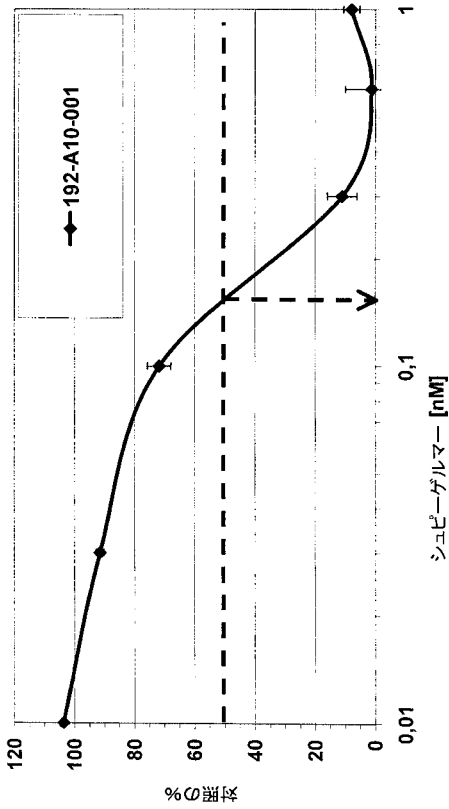


図12

【 図 1 3 】

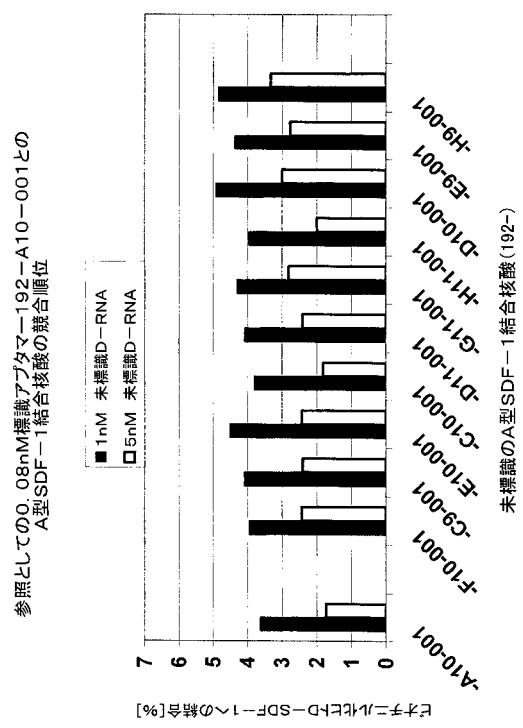


図13

参照としての0.08nM標識アタマ-192-A10-001とのA型SDF-1結合核酸の結合順位

■ 1nM 未標識D-RNA
□ 5nM 未標識D-RNA

未標識のA型SDF-1結合核酸(192-)

【 図 1 4 】

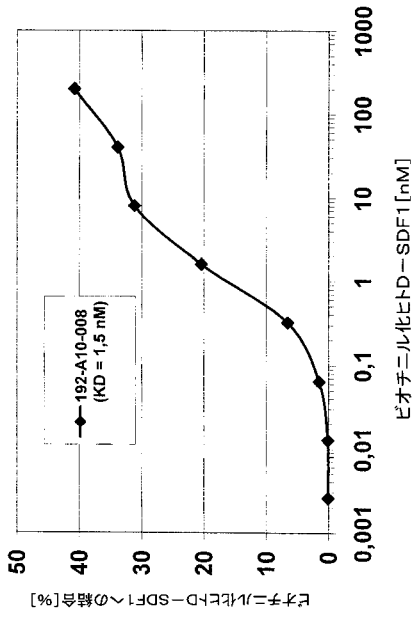


図14

【 図 1 5 】

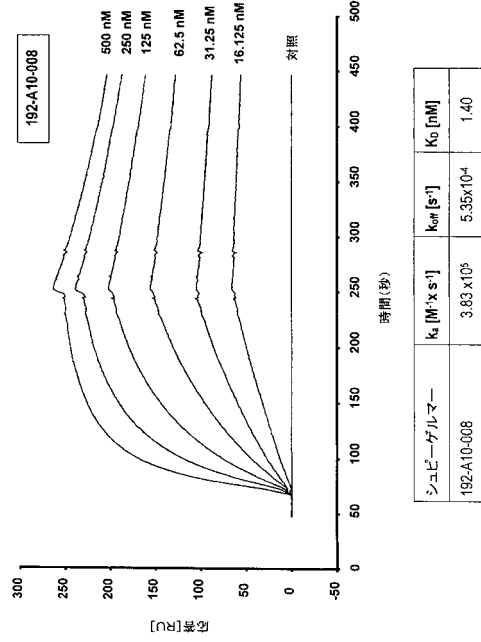


図15

【 図 1 6 】

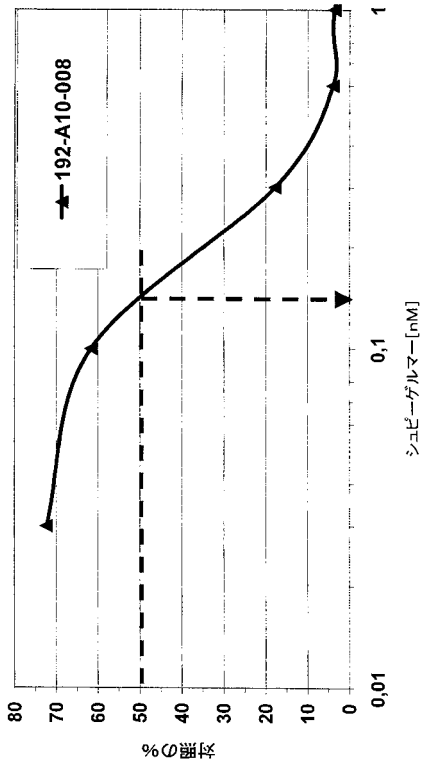


図16

【 図 1 7 】

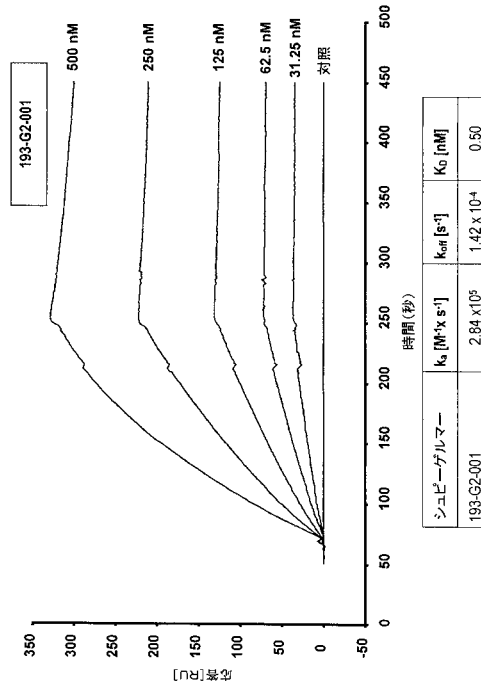


図17

【 図 1 8 】

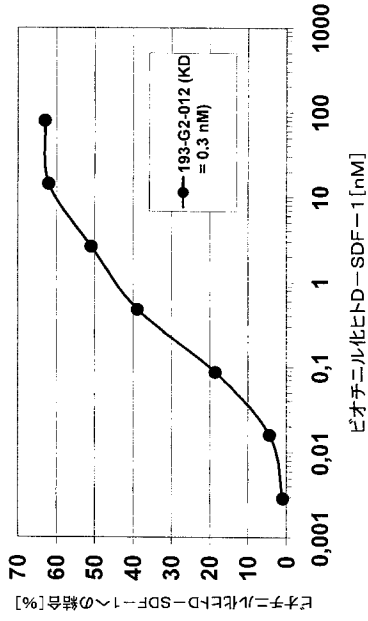


図18

【 図 1 9 】

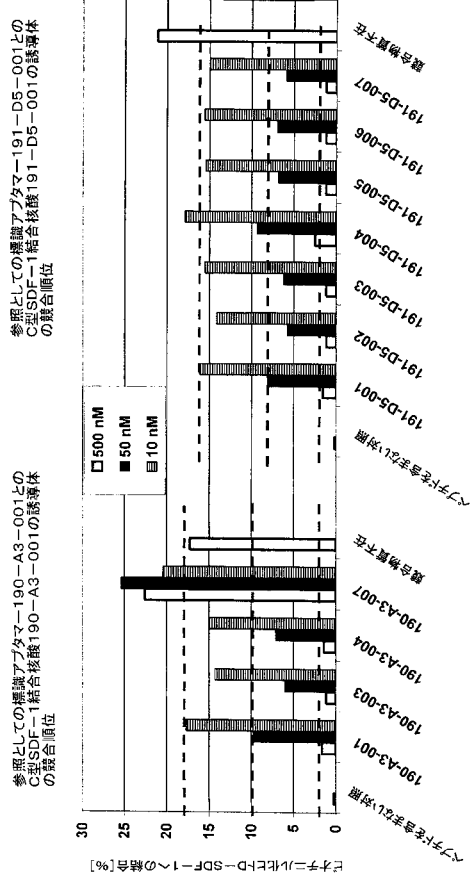


図 19

【 図 2 0 】

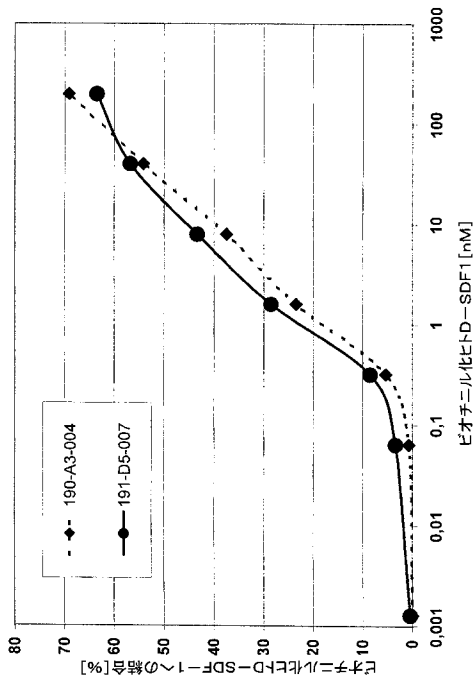


図20

【 図 2 1 】

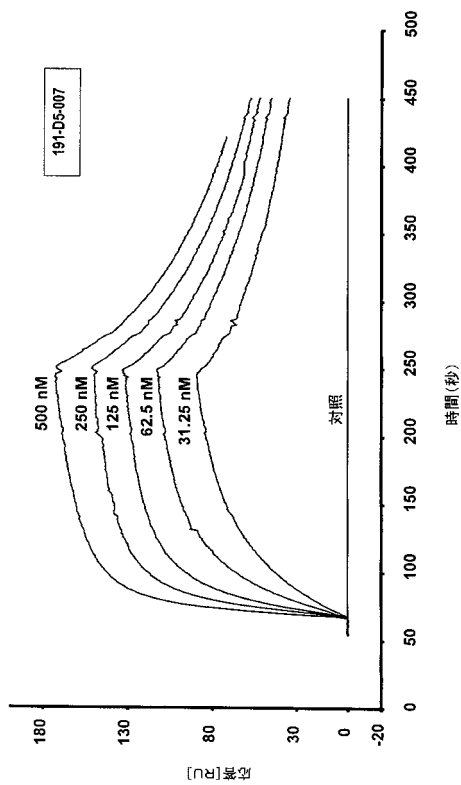


図21

シューダーゲルマー	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
191-D5-007	2.68×10^8	2.02×10^{-3}	0.75

【 図 2 2 】

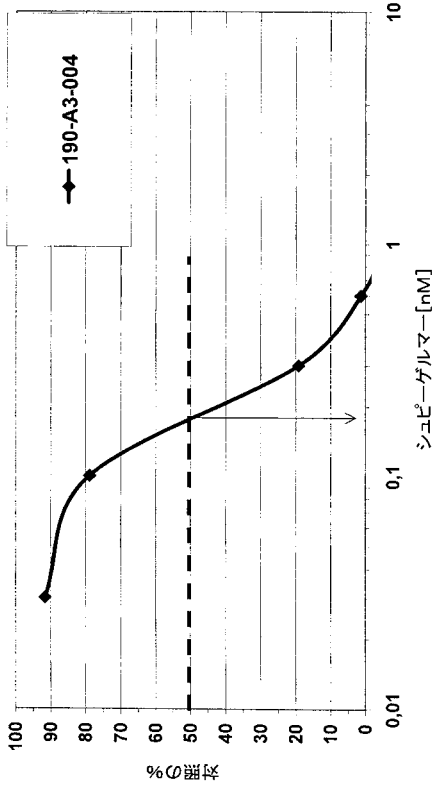


図22

【 図 2 3 A 】

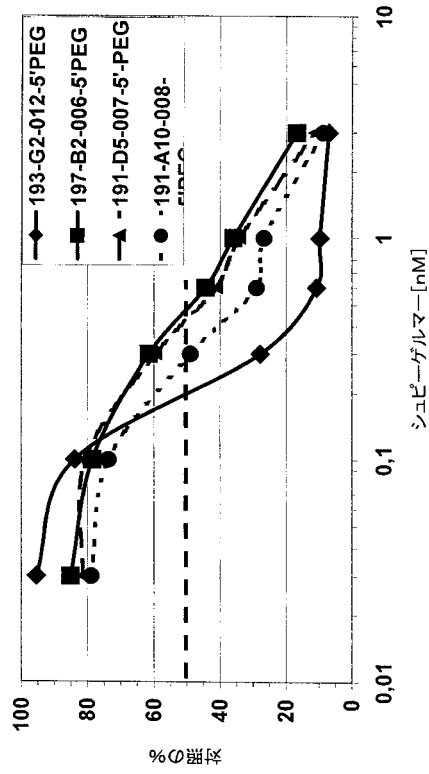


図23A

【 図 2 3 B 】

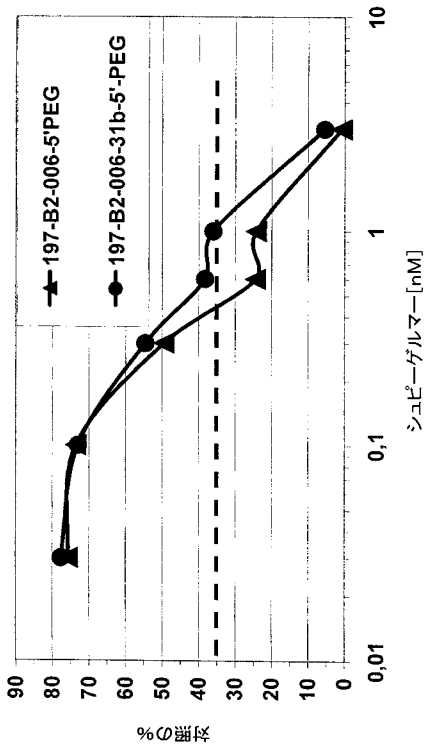


図23B

【 図 2 4 A 】

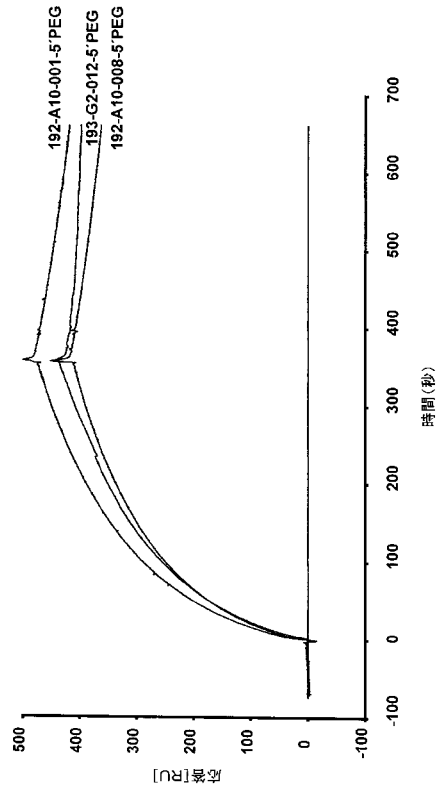


図24A

シユビ-ゲルマ-	k_a [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [nM]
192-A10-001-5'PEG	2.08×10^6	5.32×10^{-4}	2.55
192-A10-008-5'PEG	1.7×10^6	6.68×10^{-4}	3.92
193-G2-012-5'PEG	3.42×10^6	2.52×10^{-4}	0.74

【 図 2 4 B 】

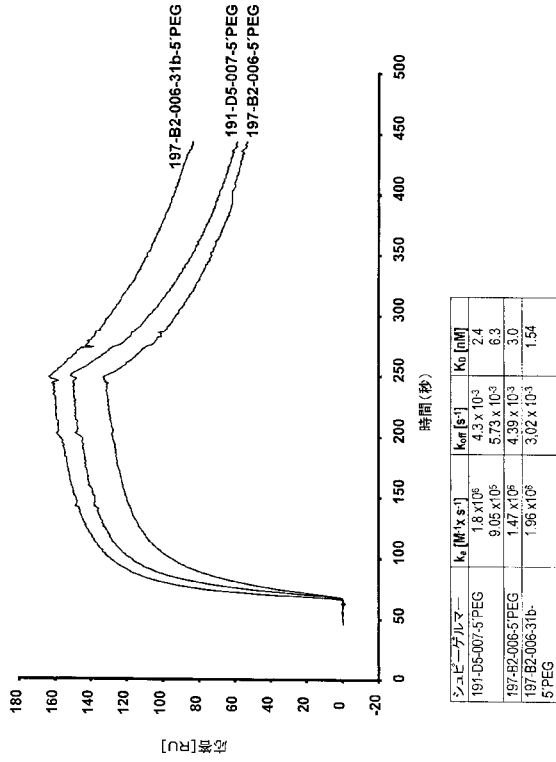


図24B

【 図 2 5 A 】

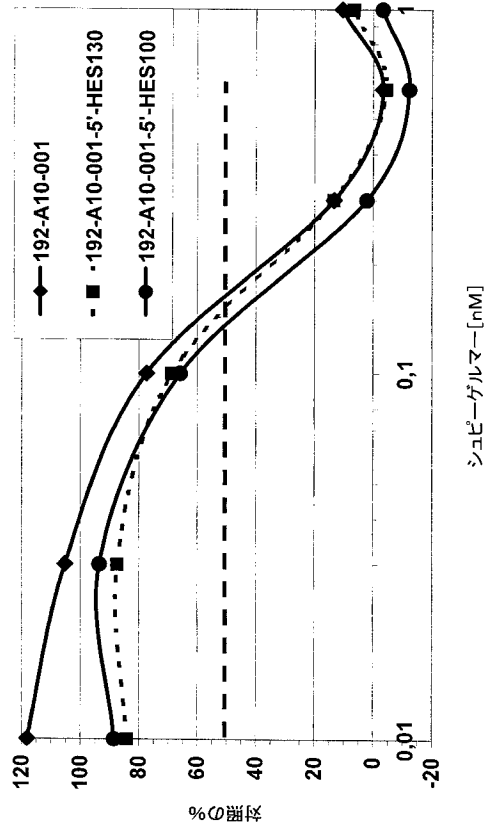


図25A

【 図 2 5 B 】

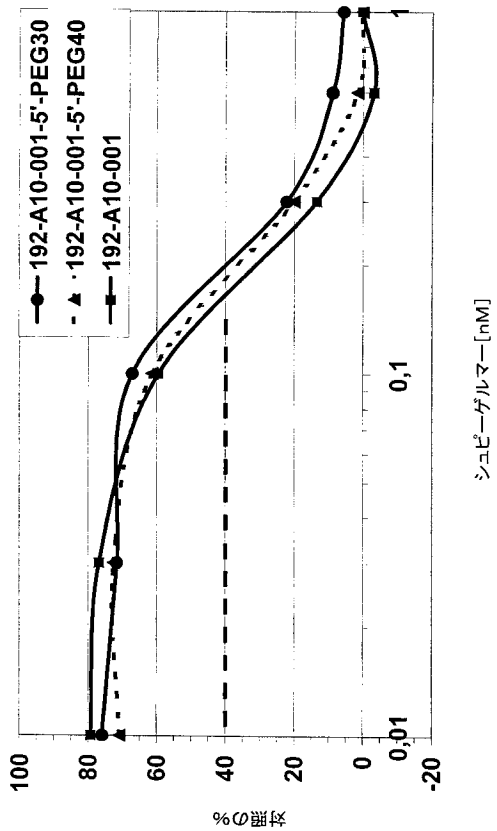


図25B

【 図 2 6 】

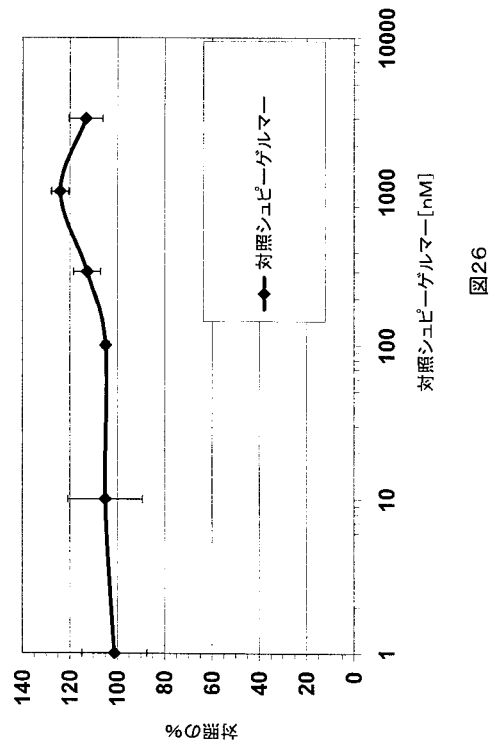


図26

【 図 27 】

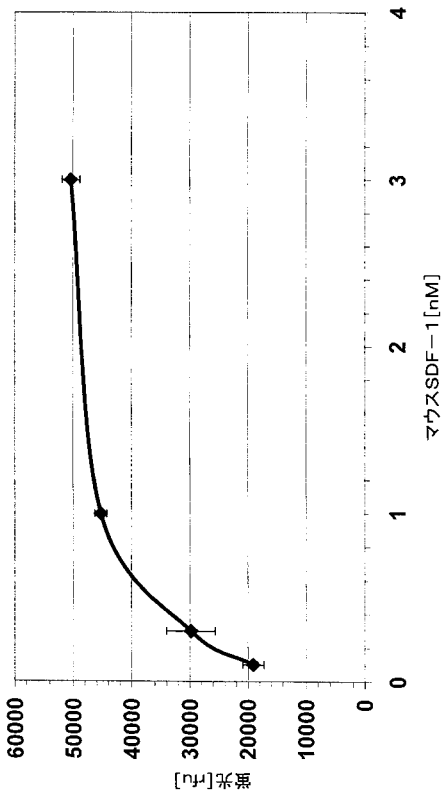


図27

【 図 28 】

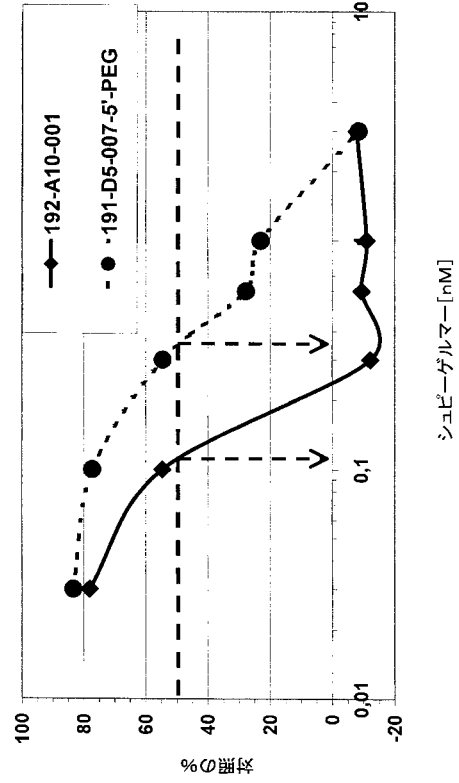


図28

【 図 29 】

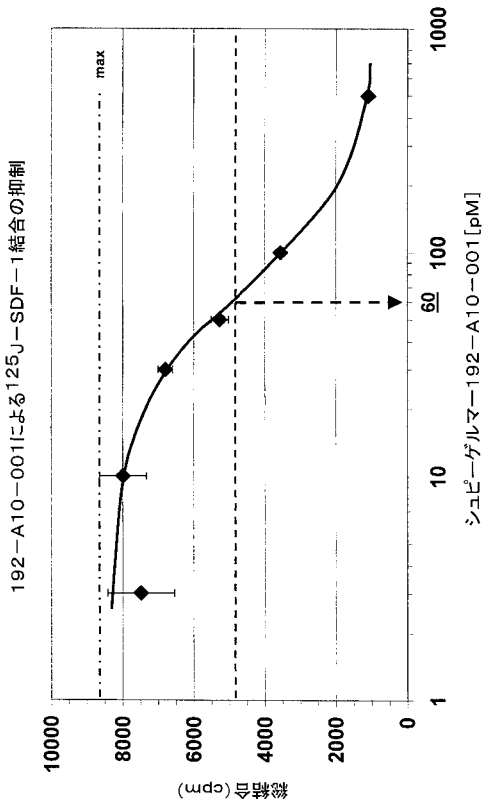


図29

【 図 30 】

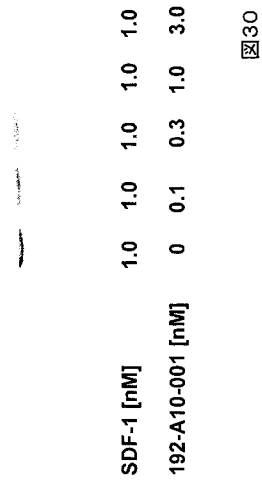


図30

【 図 3 1 】

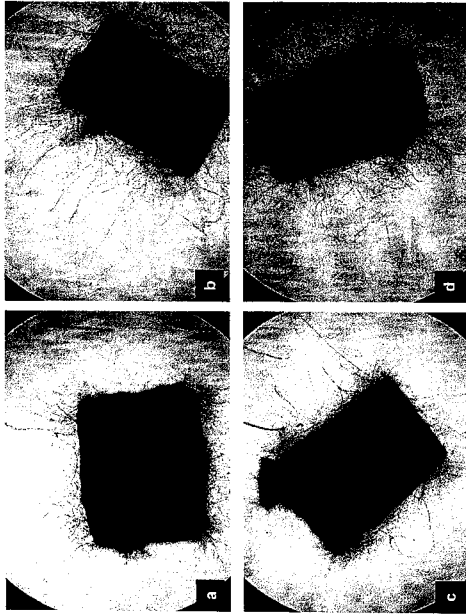


図31は大動脈幹新芽形成試験において新芽形成を誘導したラット大動脈中の骨髄をコラーゲンマトリックスに包埋し、シユベ-1の存在下または存在下にSDF-1と共に6日間インキュベートした。a: 対照 b: 10nMのSDF-1 c: 10nM SDF-1 + 1μMの193-G2-012-5-PEG、d: 10nMのSDF-1 + 1μMのPEG化対照シユベ-1

【 図 3 2 】

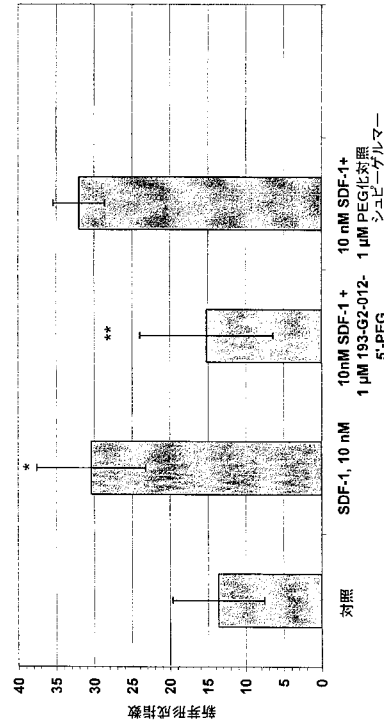


図32 大動脈幹新芽形成試験におけるSDF-1によって誘導される新芽形成およびシユベ-1によるそのプロロッキングを誘導した。ラット大動脈中の骨髄をコラーゲンマトリックスに包埋し、シユベ-1の存在下または存在下にSDF-1と共に6日間インキュベートした。新芽形成指数は条件あたり5個に関する平均±SDとして示す。
* : SDF-1に關する値は対照と有意差あり (Mann-Whitney検定, p=0.009).
** : SDF-1 + 193-G2-012-5-PEGに關する値はSDF-1に關するものと有意差あり (Mann-Whitney検定, p=0.028).

【 図 3 3 】

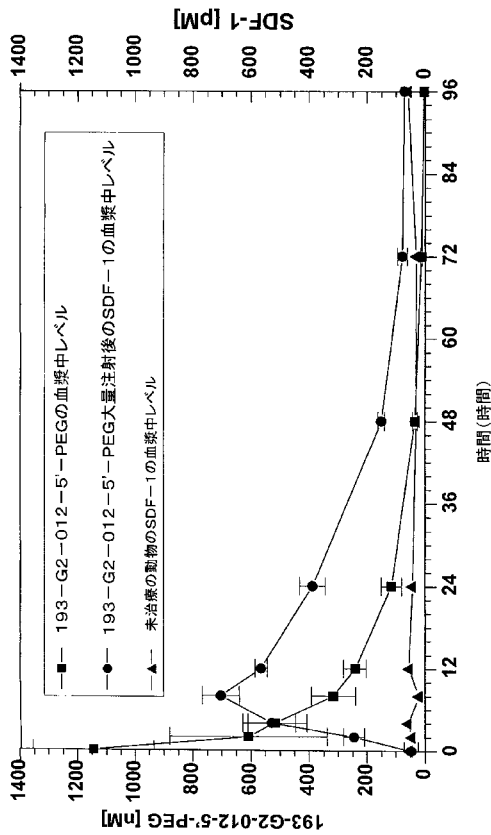


図33

【配列表】

2009543567000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2007/006387
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 ADD. A61K38/00 C12Q1/68		
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 C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENBANK 2 April 2004 (2004-04-02), SMITH ET AL.: "Porcine EST collection using a normalized library constructed from embryos representing early development stages" XP002465983 the sequence	1, 23, 25-30, 61
X	WO 02/101350 A (CHEMOCENTRYX [US]) 19 December 2002 (2002-12-19)	62
Y	the whole document, in particular claim 13, table B and page 12, line 8-page 13, line 6	1-60
-/-		
<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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search 25 January 2008		Date of mailing of the International search report 11/02/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer MARINONI, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/006387

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 072 273 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO. LTD [JP]; KISHIMOTO TADAMITSU [JP]) 31 January 2001 (2001-01-31)	62
Y	claims 1,5,9,12	1-60
X	LI Y ET AL: "Retina-committed stem cells reside in the bone marrow and migrate in vitro to signals from damaged retina" IOVS, vol. 46, no. Suppl. 5, 2005, page 3247, XP002466092 & ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION-FOR-RESEARCH-IN-VISION-AND-OPHTHALMOLOGY; FT LAUDERDALE, FL, USA; MAY 01-05, 2005 ISSN: 0146-0404 abstract	62
A	WO 2006/032143 A (ARC PHARMACEUTICALS INC [CA]; CASHMAN JOHANNE [CA]; SPRINGATE CHRISTOP) 30 March 2006 (2006-03-30) claim 24	
A	WO 92/14843 A (GILEAD SCIENCES INC [US]) 3 September 1992 (1992-09-03)	
A	EP 1 133 988 A (BIOGNOSTIK GES FUER BIOMELEKUL [DE]) 19 September 2001 (2001-09-19)	
A	MAGDA KUCJA ET AL: "CXCR4-SDF-1 Signalling, Locomotion, Chemotaxis and Adhesion" THE HISTOCHEMICAL JOURNAL, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 35, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 233-245, XP019243994 ISSN: 1573-6865	
A	BURGER JAN A ET AL: "CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment" BLOOD, vol. 107, no. 5, March 2006 (2006-03), pages 1761-1767, XP002465982 ISSN: 0006-4971	
A	LUKER ET AL: "Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 238, no. 1, 8 July 2006 (2006-07-08), pages 30-41, XP005501203 ISSN: 0304-3835	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/006387

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02101350	A	19-12-2002	AT 347695 T	15-12-2006
			CA 2449628 A1	19-12-2002
			DE 60216606 T2	05-04-2007
			DK 1417488 T3	05-03-2007
			EP 1417488 A2	12-05-2004
			ES 2274041 T3	16-05-2007
			HK 1065844 A1	02-02-2007
			JP 2005518184 T	23-06-2005
			KR 20060054488 A	22-05-2006
			US 2005186556 A1	25-08-2005
			US 2003017485 A1	23-01-2003
			US 2004023286 A1	05-02-2004
			US 2007196855 A1	23-08-2007
EP 1072273	A	31-01-2001	AT 333896 T	15-08-2006
			AU 2855399 A	18-10-1999
			DE 69932510 T2	15-02-2007
			ES 2268854 T3	16-03-2007
			WO 9948528 A1	30-09-1999
WO 2006032143	A	30-03-2006	WO 2006032144 A1	30-03-2006
			EP 1809303 A1	25-07-2007
WO 9214843	A	03-09-1992	AU 1435492 A	15-09-1992
			CA 2104698 A1	22-08-1992
			EP 0572529 A1	08-12-1993
			IE 920562 A1	26-08-1992
			JP 6508022 T	14-09-1994
EP 1133988	A	19-09-2001	AT 304858 T	15-10-2005
			AU 6010901 A	24-09-2001
			DE 60113511 T2	22-06-2006
			WO 0168146 A2	20-09-2001
			ES 2245364 T3	01-01-2006
			HK 1049796 A1	20-01-2006
			JP 2003526684 T	09-09-2003
			US 2003186906 A1	02-10-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/53	P

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100118407

弁理士 吉田 尚美

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100130960

弁理士 岡本 正之

(74)代理人 100125036

弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(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 3 5 3 ベルリン, トルフシュトラッセ 2 9

(72)発明者 クルースマン, スヴェン

ドイツ連邦共和国, 1 0 4 3 7 ベルリン, シュリーマンシュトラッセ 1 7

(72)発明者 オイルベルク, ディルク

ドイツ連邦共和国, 1 0 7 0 9 ベルリン, パウルスボルナー・シュトラッセ 8 3

(72)発明者 ブッフナー, クラウス

ドイツ連邦共和国, 1 4 1 9 7 ベルリン, アスマンスハウザー・シュトラッセ 3

(72)発明者 マーシュ, クリスティアン

ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 9 ベルリン, エルンストシュトラッセ 2 7

(72)発明者 ディンゼ, ニコーレ

ドイツ連邦共和国, 1 3 4 0 9 ベルリン, エメンタラー・シュトラッセ 1 3 2アー

Fターム(参考) 2G045 CA26 DA36 FB01 FB03 FB13

4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA09 HA12 HA17

4B063	QA01	QA18	QQ61	QQ79	QR32	QR55	QR82	QS32		
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA33	ZA81
	ZA96	ZB07	ZB11	ZB15	ZB26	ZB27	ZC78			
4H045	AA10	AA20	AA30	BA50	CA40	DA01	EA23	EA50	FA74	

专利名称(译)	SDF-1结合核酸		
公开(公告)号	JP2009543567A	公开(公告)日	2009-12-10
申请号	JP2009519869	申请日	2007-07-18
申请(专利权)人(译)	Nokuson制药股份公司		
[标]发明人	プルシュケヴェルナー ヤロシュフロリアン クルースマンズヴェン オイルベルクディルク ブッフナークラウス マーシュクリスティアン デインゼニコーレ		
发明人	プルシュケ,ヴェルナー ヤロシュ,フロリアン クルースマン,スヴェン オイルベルク,ディルク ブッフナー,クラウス マーシュ,クリスティアン デインゼ,ニコーレ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/52 C12Q1/68 A61K31/713 A61K31/7088 A61P27/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P13/12 A61P35/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33 /53 C12N15/115		
CPC分类号	A61P13/12 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 C12N15/115 C12N2310/351 A61K38/00 C12Q1/6813 C12Q1/6834 C12N2310/16 C12N2320/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/52 C12Q1/68.A A61K31/713 A61K31/7088 A61P27/02 A61P35/00 A61P35 /02 A61P37/02 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P13/12 A61P29/00 A61P35/04 G01N33/15. Z G01N33/50.Z G01N33/53.P		
F-TERM分类号	2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB13 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024 /BA80 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS32 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086 /AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC78 4H045 /AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	河村 英文 吉田直美 中村綾子 岡本正幸		
優先権	2006014957 2006-07-18 EP		
其他公开文献	JP2009543567A5 JP5380287B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明选自包含A型核酸分子，B型核酸分子，C型核酸分子和具有根据SEQ ID NO：142，SEQ ID NO：143和SEQ ID NO：144中任一个的核酸序列的核酸分子，优选为SDF-1。

配列番号	RNAの文字	配列	所属配列
1	シ-5'末端	KPISLSPPDPFFESHRRANKHILTPKCALQWRUNNR QVDCPLMIDLEALK	シ-5'末端: SDF-1b シ-5'末端: SDF-1
2	シ-5'末端	KPISLSPPDPFFESHRRANKHILTPKCALQWRUNNR QVDCPLMIDLEALKWRFM	シ-5'末端: SDF-1b
3	シ-5'末端	KPISLSPPDPFFESHRRANKHILTPKCALQWRUNNR QVDCPLMIDLEALK	シ-5'末端: SDF-1b シ-5'末端: SDF-1
4	D-5'末端	KPISLSPPDPFFESHRRANKHILTPKCALQWRUNNR QVDCPLMIDLEALKWRFK 2777	シ-5'末端: SDF-1b シ-5'末端: SDF-1
5	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGACGACGUCUGAAGGAGGUCGGCCAGC	102A1001
6	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGACUGUGUGAGGAGGACGACAGC	102G10
7	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102F10
8	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102E11
9	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGAAGGAGGAGGACGACAGC	102C10
10	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102E10
11	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102C10
12	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102D11
13	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102G11
14	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102H11
15	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102C10
16	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102E9
17	L-RNA(2-E-7/5'-)	GGUGGAGGAGCUCUGUGAGGAGGAGGACGACAGC	102H9