

(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2017-531451

(P2017-531451A)

(43) 公表日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 C 0 7 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-538185 (P2017-538185)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月6日 (2015. 10. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月2日 (2017. 6. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054288
 (87) 国際公開番号 W02016/057549
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)
 (31) 優先権主張番号 62/060, 424
 (32) 優先日 平成26年10月6日 (2014. 10. 6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516025298
 イグジキュア、インコーポレーテッド
 EXICURE, INC.
 アメリカ合衆国 イリノイ州 60077
 -5318、スクーキー、ラモン アベニ
 ュー 8045、スイート 410
 8045 Lamon Avenue,
 Suite 410, Skokie,
 Illinois 60077-5318
 U. S. A.

(74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗TNF化合物

(57) 【要約】

TNF α アンチセンスオリゴヌクレオチドを本明細書で提供する。TNF α アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび関連産物を用いてTNF α 疾患または障害を処置する方法を提供する。一部の態様では、本発明は、図7に示す構造を含む化合物またはその塩である。一部の実施形態では、前記化合物の長さは18ヌクレオチドである。他の実施形態では、前記化合物は、担体を有する組成物に製剤化される。別の実施形態では、前記化合物は、ナトリウム塩である。

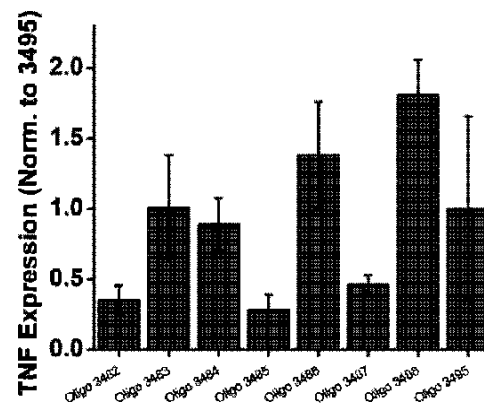
Initial Screen of Phosphodiester
- Lipofectamine

FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 7 に示す構造を含む化合物またはその塩。

【請求項 2】

長さが 18 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

担体を有する組成物に製剤化される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

ナトリウム塩である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 5】

図 8 に示す構造である、請求項 1 に記載の化合物。

10

【請求項 6】

末端のうちの 1 つに分子種をさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

両末端に分子種をさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

前記分子種が、スペーサー、脂質、ステロール、コレステロール、ステアシル、C16 アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミン E などのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、トープチルジメチルシリル、トープチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy3 もしくは Cy5）、ヘキスト 33258 染料、ソラレンおよびイブプロフェンからなる群から選択される、請求項 6 から 7 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 9】

前記分子種が、親油性部分、葉酸ラジカル、ステロイドラジカル、炭水化物ラジカル、ビタミン A ラジカル、ビタミン E ラジカルまたはビタミン K ラジカルからなる群から選択される、請求項 6 から 7 のいずれか一項に記載の化合物。

30

【請求項 10】

前記分子種が、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびアミド結合からなる群から選択される結合により前記化合物に直接的に接続している、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

前記分子種がリンカーを介して前記化合物に間接的に接続している、請求項 6 から 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 12】

前記リンカーが、脱塩基残基 (dSpacer)、トリエチレングリコール (スペーサー 9) またはヘキサエチレングリコール (スペーサー 18) などのオリゴエチレングリコールおよびブタンジオールなどのアルカンジオールからなる群から選択される非ヌクレオチドリリンカーである、請求項 11 に記載の化合物。

40

【請求項 13】

mUmGmGmGmA mGT * A * G * A * T * G * mA mGmGmUmAmC (配列番号 16) を含むオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドの長さが 18 ヌクレオチドであり、m が 2' Oメチルであり、* がホスホロチオエート修飾である、オリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

担体を有する組成物に製剤化される、請求項 13 に記載のオリゴヌクレオチド。

50

【請求項 15】

前記担体が脂質ベースの担体である、請求項 13 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

前記担体がナノ粒子である、請求項 13 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

3' または 5' 末端に分子種をさらに含む、請求項 13 から 16 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

3' および 5' 末端の両方に分子種をさらに含む、請求項 13 から 16 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 19】

前記分子種が、スパーサー、脂質、ステロール、コレステロール、ステアシル、C16 アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、トープチルジメチルシリル、トープチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy3 もしくは Cy5）、ヘキスト33258染料、ソラレンおよびイブプロフェンからなる群から選択される、請求項 17 から 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 20】

前記分子種が、親油性部分、葉酸ラジカル、ステロイドラジカル、炭水化物ラジカル、ビタミンAラジカル、ビタミンEラジカルまたはビタミンKラジカルからなる群から選択される、請求項 17 から 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

前記分子種が、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびアミド結合からなる群から選択される結合により前記化合物に直接的に接続している、請求項 17 から 18 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 22】

前記分子種がリンカーを介して前記化合物に間接的に接続している、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 23】

前記リンカーが、脱塩基残基（dSpacer）、トリエチレングリコール（スパーサー9）またはヘキサエチレングリコール（スパーサー18）などのオリゴエチレングリコールおよびブタンジオールなどのアルカンジオールからなる群から選択される非ヌクレオチドリinkerである、請求項 22 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 24】

5' TGGGAGTAGATGAGGTAC3'（配列番号4）を含むオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドの長さが18～19ヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチドの5'末端における4～6ヌクレオチドおよび3'末端における4～6ヌクレオチドが2' Oメチルを含み、4～10ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する、オリゴヌクレオチド。

40

【請求項 25】

前記オリゴヌクレオチドの5'末端における6ヌクレオチドおよび3'末端における6ヌクレオチドが2' Oメチルを含む、請求項 24 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 26】

6ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する、請求項 24 または 25 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 27】

50

7ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する、請求項24または25に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項28】

8ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する、請求項24または25に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項29】

前記ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの中央領域に存在する、請求項24から28のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項30】

前記オリゴヌクレオチドの5'末端から第7、第8、第9、第10、第11および第12番目のヌクレオチドに付随するヌクレオチド間結合がホスホロチオエート修飾されている、請求項29に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項31】

各ヌクレオチドが2' Oメチル修飾、またはホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合のいずれかを有する、請求項24から30のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項32】

1つのみのヌクレオチドが2' Oメチル修飾、およびホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合の両方を有する、請求項24に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項33】

20

1つのみのヌクレオチドが2' 修飾ヌクレオチドを有する、請求項24に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項34】

前記2' 修飾が、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)および2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)の群から選択される、請求項33に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項35】

30

TGGGAGTAGATGAGGTAC(配列番号4)を含む長さが18~19ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む安定な自己集合ナノ構造体であって、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがコアに会合している、自己集合ナノ構造体。

【請求項36】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、長さが18ヌクレオチドである、請求項35に記載のナノ構造体。

【請求項37】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する、請求項35または36に記載のナノ構造体。

【請求項38】

40

前記ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないものがホスホジエステルである、請求項37に記載のナノ構造体。

【請求項39】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合を有する、請求項35または36に記載のナノ構造体。

【請求項40】

前記ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないものがホスホロチオエートである、請求項39に記載のナノ構造体。

【請求項41】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが2' Oメチル修飾を有する、請求項35から4

50

0 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 4 2】

前記ヌクレオチドの全てよりも少ないものが 2' オメチル修飾を含む、請求項 4 1 に記載のナノ構造体。

【請求項 4 3】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが 17 のヌクレオチド間結合を有し、中央の 6 つのヌクレオチド間結合がホスホロチオエートである、請求項 3 6 に記載のナノ構造体。

【請求項 4 4】

前記オリゴヌクレオチドの 5' 末端における最初の 6 つのヌクレオチド間結合がホスホジエステルヌクレオチド間結合である、請求項 4 3 に記載のナノ構造体。

10

【請求項 4 5】

前記オリゴヌクレオチドの 5' 末端における最初の 6 つのヌクレオチドが 2' オメチル修飾ヌクレオチドである、請求項 4 4 に記載のナノ構造体。

【請求項 4 6】

前記オリゴヌクレオチドの 3' 末端における最後の 5 つのヌクレオチドが 2' オメチル修飾ヌクレオチドである、請求項 4 4 または 4 5 に記載のナノ構造体。

【請求項 4 7】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、T-G-G-G-A-G-T-A-G-A-T-G-A-G-G-T-A-C (配列番号 4)、mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC (配列番号 10、O l i g o 3 7 4 2)、T*G*G*G*A*G*T*A*G*A*T*G*A*G*G*T*A*C (配列番号 9、O l i g o 3 5 0 0)、mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC (配列番号 16、O l i g o 3 5 3 4) および mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC (配列番号 18、O l i g o 3 5 0 9) からなる群から選択され、一が、ホスホジエステル結合を指し、* が、ホスホロチオエート結合を指し、m が、オメチルを指す、請求項 3 6 に記載のナノ構造体。

20

【請求項 4 8】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが前記コアの外側に結合されている、請求項 3 5 から 4 7 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

30

【請求項 4 9】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの 2 ~ 1, 000 コピーを含む、請求項 3 5 から 4 7 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 5 0】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドと構造的に異なる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 3 5 から 4 8 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 5 1】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドはその 5' 末端が前記ナノ構造体の外表面に露出している、請求項 3 5 から 5 0 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 5 2】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドはその 3' 末端が前記ナノ構造体の外表面に露出している、請求項 3 5 から 5 0 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

40

【請求項 5 3】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが前記ナノ構造体の表面上に横方向に配置されている、請求項 3 5 から 5 0 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 5 4】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがリンカーを介して前記コアに間接的に結合されている、請求項 3 5 から 5 3 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 5 5】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、1 つ超のリンカーを介して前記コアに間接的

50

に結合されている、請求項 35 から 54 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 56】

前記コアが中実または中空コアである、請求項 35 から 55 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 57】

前記コアが不活性、常磁性または超常磁性である、請求項 35 から 55 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 58】

前記コアが中実コアである、請求項 35 から 55 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 59】

前記中実コアが、金および銀などの貴金属、鉄およびコバルトなどの遷移金属、シリカなどの金属酸化物、ポリマーまたはそれらの組合せから構成されている、請求項 58 に記載のナノ構造体。

【請求項 60】

前記コアがポリマーコアであり、前記ポリマーコアが、両親媒性ブロックコポリマー、ポリスチレンなどの疎水性ポリマー、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸－c o－グリコール酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（カプロラクトン）および他の生体適合性ポリマーから構成されている、請求項 58 に記載のナノ構造体。

【請求項 61】

前記コアがリポソームコアである、請求項 35 から 55 のいずれか一項に記載のナノ構造体。

【請求項 62】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 13 から 34 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドまたは請求項 35 から 61 のいずれか一項に記載のナノ構造体を含む組成物であって、前記ナノ構造体と会合している、TNF 障害を処置するための治療剤をさらに含む組成物。

【請求項 63】

前記治療剤が前記オリゴヌクレオチドに結合されている、請求項 62 に記載の組成物。

【請求項 64】

TNF 障害を処置するための方法であって、前記 TNF 障害を処置する有効量の、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 13 から 34 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドまたは請求項 35 から 61 のいずれか一項に記載のナノ構造体を含む組成物を、TNF 障害を有する対象に投与することを含む、前記 TNF 障害を処置するための方法。

【請求項 65】

前記 TNF 障害が、自己免疫疾患、感染症、移植拒絶または移植片対宿主病、悪性腫瘍、肺障害、腸障害、心臓障害、敗血症、脊椎関節症、代謝障害、貧血、疼痛、肝障害、皮膚障害、爪障害、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎と合併した乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、血管炎、ベーチェット病、強直性脊椎炎、喘息、慢性閉塞性肺障害（COPD）、特発性肺線維症（IPF）、再狭窄、糖尿病、貧血、疼痛、クローン病関連障害、若年性関節リウマチ（JRA）、C 型肝炎ウイルス感染、乾癬性関節炎および慢性尋常性乾癬からなる群から選択される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記自己免疫障害が、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、変形性関節症、痛風性関節炎、アレルギー、多発性硬化症、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎および腎炎症候群からなる群から選択される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

TNF レベルを *in vivo* で低下させるための有効量の、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 13 から 34 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドまたは請求項 35 から 61 のいずれか一項に記載のナノ構造体を含む組成物を対象に投

10

20

30

40

50

与することを含む、TNFレベルを *in vivo* で低下させるための方法。

【請求項68】

TGGGAGTAGATGAGGTAC（配列番号4）を含む長さが18～19ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む安定な自己集合ナノ構造体であって、3'または5'末端における疎水性基が、水中または他の適切な溶媒中で自己会合して、前記ナノ構造体のコアを形成する、自己集合ナノ構造体。

【請求項69】

前記オリゴヌクレオチドが、DNアーゼおよびRNアーゼ不含有の水または他の適切な溶媒中において5 μMを上回る濃度にある、請求項68に記載の安定な自己集合ナノ構造体。

10

【請求項70】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが18ヌクレオチドである、請求項68に記載の安定な自己集合ナノ構造体。

【請求項71】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する、請求項68に記載の安定な自己集合ナノ構造体。

【請求項72】

前記ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないものがホスホジエステルである、請求項68に記載の安定な自己集合ナノ構造体。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

（関連出願）

本願は、2014年10月6日に出願した米国仮出願第62/060,424号による米国特許法第119条の優先権を主張する。この出願の内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

（発明の分野）

本発明は、抗TNF核酸化合物、ならびにその使用の方法およびその組成物に関する。

【背景技術】

30

【0003】

（発明の背景）

TNF-α（腫瘍壊死因子アルファ）は、様々な疾患をもたらす炎症反応をしばしば促進する活性化マクロファージ／単球およびリンパ球により産生される多面性サイトカインである。TNF-αは、マクロファージ、単球およびナチュラルキラー細胞から放出され、細菌および他の微生物感染中ならびに炎症性物質による刺激後に損傷組織への白血球の動員を含む、炎症および免疫反応に重要な役割を果たす。過剰量で存在する場合、TNF-αは、組織損傷を引き起こすことが公知であり、炎症性および自己免疫疾患に随伴する病態に関連付けられている。

【0004】

40

TNF-αは、配列および分子量が異なる2つの別個の膜タンパク質受容体であるTNF-R IおよびTNF-R IIを介して生物学的作用を媒介する。TNF-R Iは、すべてでないとしても、ほとんどのヒト細胞型において低レベルで存在し、ヒトにおけるTNF-R I遺伝子の発現は、感染、インターフェロンおよびホルボールエステルのような、二次メッセンジャーのモジュレーターにより上方制御され得ると報告されている。両TNF受容体の細胞外部分は、可溶性の形で存在し、これは、細胞表面におけるタンパク質分解切断により膜結合形の受容体から生じる。可溶性TNF受容体は、溶液中のTNF-αに結合する能力を保持している。可溶性TNF受容体は、健常者の尿および血清中で同定され、いくつかの慢性疾患で、またTNF-αを誘導する薬剤の接種後に上昇することが示されている。

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一部の態様では、本発明は、図7に示す構造を含む化合物またはその塩である。一部の実施形態では、前記化合物の長さは18ヌクレオチドである。他の実施形態では、前記化合物は、担体を有する組成物に製剤化される。別の実施形態では、前記化合物は、ナトリウム塩である。他の実施形態では、前記化合物は、図8に示す構造である。

【0006】

一部の実施形態では、前記化合物は、末端のうちの1つに分子種をさらに含む。他の実施形態では、前記化合物は、両末端に分子種をさらに含む。

10

【0007】

なお別の実施形態では、前記分子種が、スパーサー、脂質、ステロール、コレステロール、ステアシル、C16アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ビオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy3もしくはCy576）、ヘキスト33258染料、ソラレンおよびイブプロフェンからなる群から選択される。

20

【0008】

別の実施形態では、前記分子種が、親油性部分、葉酸ラジカル、ステロイドラジカル、炭水化物ラジカル、ビタミンAラジカル、ビタミンEラジカルまたはビタミンKラジカルからなる群から選択される。

【0009】

別の実施形態では、前記分子種が、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびアミド結合からなる群から選択される結合により前記化合物に直接的に接続している。一部の実施形態では、前記分子種がリンカーを介して前記化合物に間接的に接続している。

【0010】

他の実施形態では、前記リンカーが、脱塩基残基（dSpacer）、トリエチレングリコール（スパーサー9）またはヘキサエチレングリコール（スパーサー18）などのオリゴエチレングリコールおよびブタンジオールなどのアルカンジオールからなる群から選択される非ヌクレオチドリinkerである。

30

【0011】

本発明の別の態様は、mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC（配列番号16）を含むオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドの長さが18ヌクレオチドであり、mが2' Oメチルであり、*がホスホロチオエート修飾である、オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、担体を有する組成物に製剤化される。他の実施形態では、前記担体が脂質ベースの担体である。別の実施形態では、前記担体がナノ粒子である。

40

【0012】

別の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが3'または5'末端に分子種をさらに含む。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが3'および5'末端の両方に分子種をさらに含む。

【0013】

他の実施形態では、前記分子種が、スパーサー、脂質、ステロール、コレステロール、ステアシル、C16アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸

50

、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ビオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、 ϵ -ブチルジメチルシリル、 ϵ -ブチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy 3もしくはCy 576）、ヘキスト33258染料、ソラレンおよびイブプロフェンからなる群から選択される。

【0014】

一部の実施形態では、前記分子種が、親油性部分、葉酸ラジカル、ステロイドラジカル、炭水化物ラジカル、ビタミンAラジカル、ビタミンEラジカルまたはビタミンKラジカルからなる群から選択される。別の実施形態では、前記分子種が、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネートおよびアミド結合からなる群から選択される結合により前記化合物に直接的に接続している。なお別の実施形態では、前記分子種がリンカーを介して前記化合物に間接的に接続している。

10

【0015】

一部の実施形態では、前記リンカーが、脱塩基残基（dSpacer）、トリエチレングリコール（スペーサー9）またはヘキサエチレングリコール（スペーサー18）などのオリゴエチレングリコールおよびブタンジオールなどのアルカンジオールからなる群から選択される非ヌクレオチドリinkerである。

【0016】

本発明の他の態様は、5' TGGGAGTAGATGAGGTAC 3'（配列番号4）を含むオリゴヌクレオチドであって、前記オリゴヌクレオチドの長さが18~19ヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチドの5'末端における4~6ヌクレオチドおよび3'末端における4~6ヌクレオチドが2' Oメチルを含み、4~10ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する、オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの5'末端における6ヌクレオチドおよび3'末端における6ヌクレオチドが2' Oメチルを含む。他の実施形態では、6ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する。別の実施形態では、7ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する。なお別の実施形態では、8ヌクレオチドがホスホロチオエート修飾を有する。

20

【0017】

他の実施形態では、前記ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチドの中央領域に存在する。

30

【0018】

別の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの5'末端から第7、第8、第9、第10、第11および第12番目のヌクレオチドに付随するヌクレオチド間結合がホスホロチオエート修飾されている。

【0019】

別の実施形態では、各ヌクレオチドが2' Oメチル修飾、またはホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合のいずれかを有する。一部の実施形態では、1つのみのヌクレオチドが2' Oメチル修飾、およびホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合の両方を有する。他の実施形態では、1つのみのヌクレオチドが2' 修飾ヌクレオチドを有する。

【0020】

一部の実施形態では、前記2' 修飾が、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMA P）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAE OE）および2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）の群から選択される。

40

【0021】

本発明の一態様は、TGGGAGTAGATGAGGTAC（配列番号4）を含む長さが18~19ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む安定な自己集合ナノ構造体であって、3'または5'末端における疎水性基が、水中または他の適切な溶媒中

50

で自己会合して、そのナノ構造体のコアを形成している、自己集合ナノ構造体である。自己集合ナノ構造体は、一般的に、オリゴヌクレオチドが、DNアーゼおよびRNアーゼ不含有水または他の適切な溶媒中において5 μ Mを超える濃度である場合に形成される。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが18ヌクレオチドである。他の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルヌクレオチド間結合(internucleotide linkage)を有する。別の実施形態では、ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないもの(less than all)がホスホジエステルである。

【0022】

本発明の別の態様は、TGGGAGTAGATGAGGTAC(配列番号4)を含む長さが18~19ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む安定な自己集合ナノ構造体であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドがコアと会合している、自己集合ナノ構造体である。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが18ヌクレオチドである。他の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステルヌクレオチド間結合を有する。別の実施形態では、ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないものがホスホジエステルである。

10

【0023】

他の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがホスホロチオエートによるヌクレオチド間結合を有する。一部の実施形態では、前記ヌクレオチド間結合の全てよりも少ないものがホスホロチオエートである。

【0024】

一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが2' Oメチル修飾を有する。他の実施形態では、前記ヌクレオチドの全てよりも少ないものが2' Oメチル修飾を含む。

20

【0025】

別の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが17のヌクレオチド間結合を有し、中央の6つのヌクレオチド間結合がホスホロチオエートである。他の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの5'末端における最初の6つのヌクレオチド間結合がホスホジエステルヌクレオチド間結合である。なお別の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの5'末端における最初の6つのヌクレオチドが2' Oメチル修飾ヌクレオチドである。

30

【0026】

他の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの3'末端における最後の5つのヌクレオチドが2' Oメチル修飾ヌクレオチドである。

【0027】

別の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、T-G-G-G-A-G-T-A-G-A-T-G-A-G-G-T-A-C(配列番号4)、mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC(配列番号10、Oligo3742)、T*G*G*G*A*G*T*A*G*A*T*G*A*G*G*T*A*C(配列番号9、Oligo3500)、mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC(配列番号16、Oligo3534)およびmU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC(配列番号18、Oligo3509)からなる群から選択され、一が、ホスホジエステル結合を指し、*が、ホスホロチオエート結合を指し、mが、Oメチルを指す。

40

【0028】

別の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが前記コアの外側に結合されている。一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの2~1,000コピーを含む。

【0029】

他の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドと構造的に異なる少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

50

【0030】

一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドはその5'末端が前記ナノ構造体の外表面に露出している。他の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドはその3'末端が前記ナノ構造体の外表面に露出している。一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが前記ナノ構造体の表面上に横方向に配置されている。

【0031】

別の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドがリンカーを介して前記コアに間接的に結合されている。一部の実施形態では、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、1つ超のリンカーを介して前記コアに間接的に結合されている。

【0032】

一部の実施形態では、前記コアが中実または中空コアである。他の実施形態では、前記コアが不活性、常磁性または超常磁性である。別の実施形態では、前記コアが中実コアである。

【0033】

他の実施形態では、前記中実コアが、金および銀などの貴金属、鉄およびコバルトなどの遷移金属、シリカなどの金属酸化物、ポリマーまたはそれらの組合せから構成されている。別の実施形態では、前記コアがポリマーコアであり、前記ポリマーコアが、両親媒性ブロックコポリマー、ポリスチレンなどの疎水性ポリマー、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸- ϵ -グリコール酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（カプロラクトン）および他の生体適合性ポリマーから構成されている。

【0034】

なお別の実施形態では、前記コアがリボソームコアである。

【0035】

本発明の別の態様は、化合物、オリゴヌクレオチドまたはナノ構造体の前述の実施形態を含む組成物であって、ナノ構造体に会合している、TNF障害を処置するための治療剤をさらに含む組成物である。一部の実施形態では、治療剤は、オリゴヌクレオチドに結合している。

【0036】

本明細書で述べる組成物および核酸のそれぞれは、様々な担体で製剤化することができる。一部の実施形態では、本発明の化合物は、局所用担体で製剤化する。一部の実施形態では、局所用製剤は、クリーム剤である。他の実施形態では、局所用製剤は、ゲル剤である。

【0037】

本発明の別の態様は、TNF障害を処置するための有効量の化合物、オリゴヌクレオチドまたはナノ構造体の前述の態様を含む組成物を、TNF障害を有する対象に投与することを含む、TNF障害を処置する方法である。

【0038】

別の実施形態では、前記TNF障害が、自己免疫疾患、感染症、移植拒絶または移植片対宿主病、悪性腫瘍、肺障害、腸障害、心臓障害、敗血症、脊椎関節症、代謝障害、貧血、疼痛、肝障害、皮膚障害、爪障害、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎と合併した乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、血管炎、ベーチェット病、強直性脊椎炎、喘息、慢性閉塞性肺障害（COPD）、特発性肺線維症（IPF）、再狭窄、糖尿病、貧血、疼痛、クローン病関連障害、若年性関節リウマチ（JRA）、C型肝炎ウイルス感染、乾癬性関節炎および慢性尋常性乾癬からなる群から選択される。

【0039】

一部の実施形態では、前記自己免疫障害が、関節リウマチ、リウマチ性脊椎炎、変形性関節症、痛風性関節炎、アレルギー、多発性硬化症、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ぶどう膜炎および腎炎症候群からなる群から選択される。

【0040】

別の態様では、本発明は *in vivo* でのTNFレベルを低下させるための有効量の

10

20

30

40

50

化合物、オリゴヌクレオチドまたはナノ構造体の前述の実施形態を含む組成物を対象に投与することを含む、*in vivo*でのTNFレベルを低下させる方法である。

【0041】

本発明の制限のそれぞれは、本発明の様々な実施形態を包含し得る。したがって、いずれか1つの要素または要素の組合せを含む本発明の制限のそれぞれを本発明の各態様に含めることができることが予想される。本発明は、以下の説明で示すまたは図面で例示する成分の構築および配置の詳細にその適用が限定されない。本発明は、他の実施形態であり得、様々な方法で実施または実行することができる。

【0042】

添付図面は、正確な縮尺率で描画されるものではない。これらの図面において、様々な図で例示されている各同一またはほぼ同一の成分は、同様の数値により表されている。明確さを目的とするため、すべての成分をすべての図面で表示することができるとは限らない。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、TNF発現に対するOligo3495（スクランブル対照）に対して正規化したOligo3482、3483、3484、3485、3486、3487および3488を含むいくつかのオリゴヌクレオチドの初代ヒトケラチノサイトにおける阻害活性を示す棒グラフである。

【0044】

【図2】図2は、TNF発現に対するOligo3485、3472、3508、3500、3496、3526、3607、3534、3514、3509、3516および3495を含むいくつかのオリゴヌクレオチドの初代ヒトケラチノサイトにおける阻害活性を示す棒グラフである。

【0045】

【図3】図3は、それらのそれぞれの対照と比較したOligo3660、3743、3661、3657、3669および3652を含むいくつかのオリゴヌクレオチドの初代ヒトケラチノサイトにおける阻害活性に対する様々な化学的性質の影響を示す棒グラフである。オリゴヌクレオチドは、球状核酸（SNA）として製剤化した。

【0046】

【図4A-B】図4A～4Bは、刺激ヒトケラチノサイトにおけるSNAによるTNFの遺伝子ノックダウン百分率を示す。図4Aに、Oligo3657およびその対照であるOligo3661とのTNF- α mRNA発現百分率をグラフに示す。図4Bは、それぞれ化合物の半阻害濃度（IC₅₀）1.8 nMおよび>100 nMを示す。

【0047】

【図5A-B】図5A～5Bは、Oligo3657修飾SNAに対するさらなるホスホロチオエート修飾の影響を示す。図5Aに、ホスホロチオエート含量を増加させた場合のオリゴヌクレオチドの相対mRNA発現の百分率をグラフに示す。図5Bは、スクリーニングした各オリゴヌクレオチドの半有効濃度（EC₅₀）の表を示す。

【0048】

【図6A-B】図6A～6Bは、TNF発現に対する中空SNAの影響を示す。図6Aに、無処置体に対して正規化したTNF発現を示すが、図6Bは、化合物のIC₅₀値を示す。

【0049】

【図7】図7は、遊離酸の形態のTNFアンチセンスオリゴヌクレオチドの構造である。

【0050】

【図8】図8は、塩の形態のTNFアンチセンスオリゴヌクレオチドの構造である。

【0051】

【図9】図9は、刺激ヒトケラチノサイトにおけるSNAによるTNFの遺伝子ノックダウン百分率を示す。Oligo6081およびその対照であるOligo6093とのT

10

20

30

40

50

N F m R N A 発現の百分率をグラフに示す。示したデータは、T N F のみにより刺激された細胞（オリゴヌクレオチドなし、1. 0 に設定）と比較した T N F m R N A の遺伝子発現である。

【0052】

【図10】図10は、刺激された初代ヒトケラチノサイトにおける T N F m R N A 発現の阻害活性に対する様々なヘキサエチレングリコールスパーサー長の影響を示す棒グラフである。O l i g o 6 0 8 0、6 0 8 1、6 0 8 2 および 6 0 9 2 で処理した細胞の、それらのそれぞれの対照である O l i g o 6 0 8 3、6 0 9 3、6 0 9 4 および 6 0 9 5（100 に設定）と比較した、T N F m R N A 発現の百分率を示す。

【0053】

【図11】図11は、乾癬性 e x v i v o 外植体における L-SNA ノックダウン T N F を示す棒グラフである。

【0054】

【図12A-B】図12A~12Dは、炎症性腸疾患（IBD）を含有するマウスにおける S-SNA（自己集合 SNA）型および L-SNA（リボソーム SNA）型の T N F アンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床的および肉眼的病理スコアの低下を示す。図12Aに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Bに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Cに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Dに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。* 一元配置 A N O V A とそれに続く事後チューキー検定を用いた場合、ビヒクル群に対し $p < 0.05$ であることを示す。

【図12C】図12A~12Dは、炎症性腸疾患（IBD）を含有するマウスにおける S-SNA（自己集合 SNA）型および L-SNA（リボソーム SNA）型の T N F アンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床的および肉眼的病理スコアの低下を示す。図12Aに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Bに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Cに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Dに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。* 一元配置 A N O V A とそれに続く事後チューキー検定を用いた場合、ビヒクル群に対し $p < 0.05$ であることを示す。

【図12D】図12A~12Dは、炎症性腸疾患（IBD）を含有するマウスにおける S-SNA（自己集合 SNA）型および L-SNA（リボソーム SNA）型の T N F アンチセンスオリゴヌクレオチドの臨床的および肉眼的病理スコアの低下を示す。図12Aに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Bに、疾患の臨床的スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Cに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の S-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。図12Dに、疾患の肉眼的病理スコアをビヒクル、T N B S、様々な投与量の L-SNA 型の O l i g o 2 2 7 9 0 1 について示す。* 一元配置 A N O V A とそれに続く事後チューキー検定を用いた場合、ビヒクル群に対し $p < 0.05$ であることを示す。

【0055】

【図13】図13は、O l i g o 6 3 0 7 自己集合 SNA の低温 T E M を示す。

【0056】

【図14A-B】図14A~14Bは、O l i g o 6 3 0 7 自己集合 SNA の低温 T E M

10

20

30

40

50

の概略図を示す。個別のSNA（図14A）およびSNAの集合（図14B）の概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0057】

（詳細な説明）

本発明は、一部の態様ではTNF α を低下させるための組成物およびそれらの組成物を用いてTNF障害を処置する方法に関する。極めて有効なTNF α 阻害剤が本発明の態様により特定された。このTNF α 阻害剤は、核酸ベースのアンチセンス組成物である。「TNF α -アルファ」または「TNF α 」という用語は、17kDの分泌型および26kDの膜会合型として存在するサイトカインを指し、その生物学的活性型は、非共有結合的に結合した17kD分子の三量体で構成されている。

10

【0058】

本明細書で用いられる「TNF α 阻害剤」は、TNF α 活性を妨げる核酸ベースの薬剤を指す。特に、本発明のTNF α アンチセンス阻害剤またはTNF α アンチセンスオリゴヌクレオチドは、TNF α 遺伝子の発現を低下させる。

【0059】

本発明のTNF阻害剤は、アンチセンス核酸である。アンチセンス核酸は、一般的に修飾もしくは非修飾RNA、DNA、または混合ポリマー核酸を含み、マッチング配列に特異的に結合し、ペプチド合成の調整をもたらすことによって主として機能する。アンチセンス核酸は、ワトソン・クリック塩基対合により標的RNAに結合し、立体障害またはRNAアーゼH酵素の活性化のいずれかにより、結合配列のリボソームによる翻訳を妨げることによって遺伝子発現をブロックする。アンチセンス分子はまた、RNAプロセッシングまたは核から細胞質内への輸送を妨げることによってタンパク質合成を変化させ得る。

20

【0060】

本明細書で用いられる「アンチセンス核酸」または「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、生理的条件下で特定の遺伝子を含むDNAとまたは当該遺伝子のmRNA転写物、この場合にはTNF α とハイブリダイズし、それにより、当該遺伝子の転写および／または当該mRNAの翻訳を阻害する核酸を記載する。アンチセンス分子は、標的遺伝子または転写物とのハイブリダイゼーションにより標的遺伝子の転写または翻訳を妨げるように設計される。当業者は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの正確な長さおよびその標的とのその相補性の程度が、標的の配列および当該配列を含む特定の塩基を含む、選択される特定の標的に依存することを認識する。

30

【0061】

「遺伝子発現の阻害」は、TNF α 遺伝子のような、標的遺伝子からのタンパク質および／またはmRNA産物の非存在またはそのレベルの観測可能な低下を指す。「特異性」は、細胞の他の遺伝子に対する明らかな影響を伴わずに標的遺伝子を阻害する能力を指す。阻害による結果は、細胞もしくは生物の外部特性の検査によりまたはRNA溶液ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、ノーザンハイブリダイゼーション、逆転写、マイクロアレイによる遺伝子発現モニタリング、抗体結合、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロッティング、ラジオイムノアッセイ（RIA）、他のイムノアッセイおよび蛍光活性化細胞解析（FACS）などの生化学的手法により確認することができる。

40

【0062】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、TNF α 発現を阻害する。アッセイによっては、遺伝子発現の量の定量化により、本発明により処理しなかった細胞と比較して5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%より大きい阻害の程度を決定することが可能になる。例として、阻害の効率は、細胞中の遺伝子産物の量を評価することによって決定することができる。

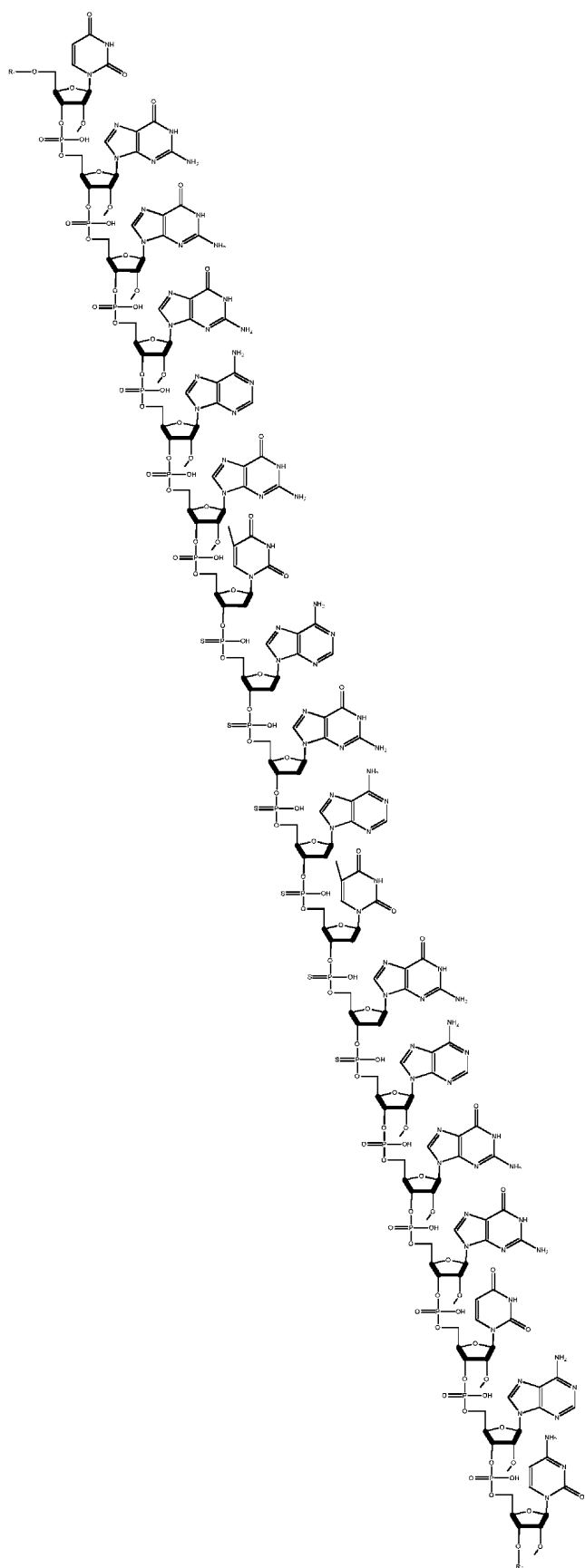
【0063】

一部の例において、TNF α 阻害剤は、以下の構造を有する化合物またはその塩および

50

プロドラッグを含む生物学的同等物である。

【化 1】



10

20

30

40

【0064】

本明細書で用いられる、薬学的に許容される塩およびプロドラッグを含む生物学的に同等な化合物という用語は、目的のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同じ一次構造を有す

50

るが、目的のアンチセンスオリゴヌクレオチドと同じ種類の生物学的作用を有するように切断または修飾することができる塩の形態または構造を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。これは、ヒトを含む動物への投与により、生物学的に活性な代謝物またはその残基を（直接的または間接的に）供給することができる、任意の薬学的に許容される塩、エステル、もしくはそのようなエステルの塩、または任意の他の化合物を包含するものとする。

【0065】

「薬学的に許容される塩」は、本発明の核酸の生理学的かつ薬学的に許容される塩、すなわち、目的の化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性学的作用をそれに与えない塩である。薬学的に許容される塩は、（a）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウムなどの陽イオン、スペルミンおよびスペルミジンなどのポリアミンなどにより形成される塩；（b）無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などにより形成される酸付加塩；（c）例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などのような有機酸により形成される塩；ならびに（d）塩素、臭素およびヨウ素などの陰イオン元素から形成される塩を含むが、これらに限定されない。

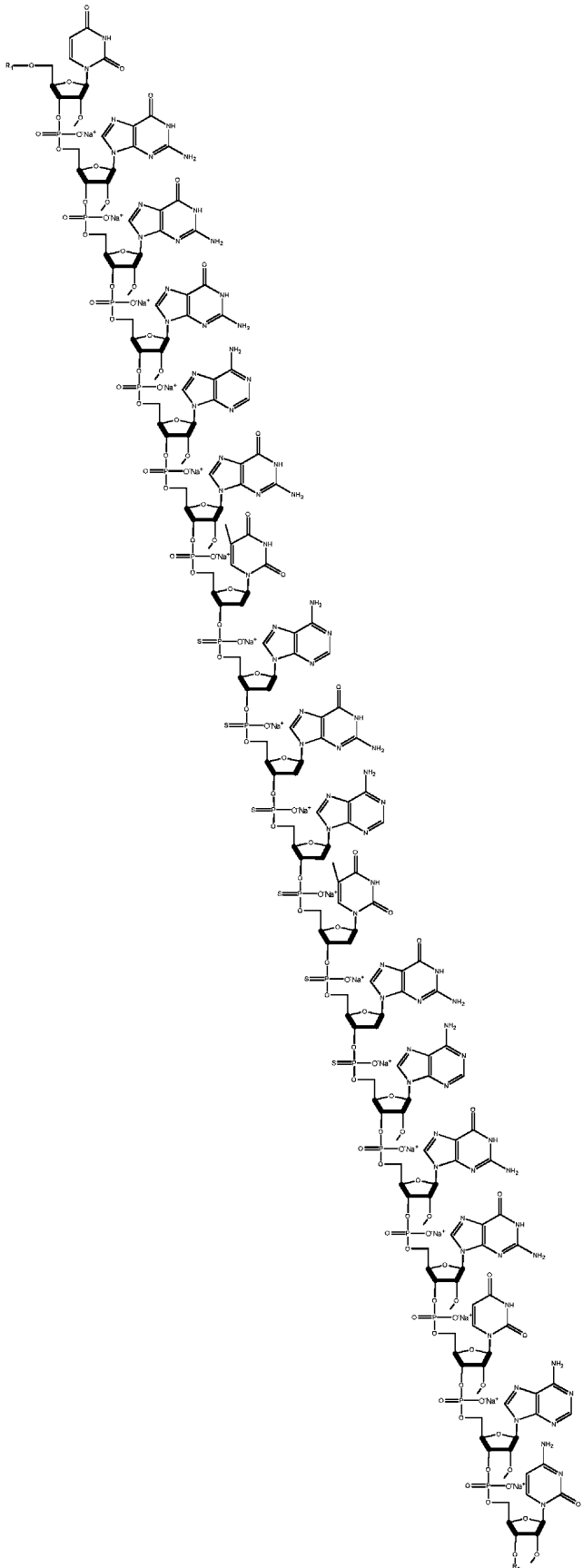
【0066】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩の例は、例えば、以下の構造を有するナトリウム塩である化合物である。

10

20

【化 2】



10

20

30

40

【0067】

本発明の化合物は、「プロドラッグ」の形態で送達されるように調製することもできる。「プロドラッグ」は、内因性酵素もしくは他の化学物質および／または条件の作用により体内またはその細胞内で活性型（すなわち、薬物）に変換される不活性型で調製される

50

治療剤である。

【0068】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、TNF α アンチセンスオリゴヌクレオチドである。アンチセンスTNF α オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基の配列およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが一般的にワトソン・クリック塩基対合によりTNF α 標的配列とハイブリダイズして、標的配列内にRNA：オリゴマーヘテロ二本鎖を形成することを可能にするサブユニット間主鎖を有する化合物を指す。

【0069】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとその標的核酸であるTNF α との特異的ハイブリダイゼーションは、この核酸、つまりTNF α の正常機能を妨げる。標的核酸と特異的にハイブリダイズする化合物による標的核酸の機能のこの調整は、一般的に「アンチセンス」と呼ばれる。妨げられるDNAの機能は、複製および転写を含む。妨げられるRNAの機能は、例えば、タンパク質翻訳の部位へのRNAの移行、RNAからのタンパク質の翻訳、1つまたは複数のmRNA種を生じるRNAのスプライシング、およびRNAに関与するまたはRNAによって促進され得る触媒活性などのすべての必須の機能を含む。標的核酸機能のそのような妨げの全体的な影響は、TNF α タンパク質の発現の調整である。本発明の状況では、「調整」は、遺伝子の発現の低下または阻害を意味する。

【0070】

オリゴヌクレオチドが生理的条件下で、37℃を超える、好ましくは少なくとも45℃、一般的に50℃～80℃またはそれ超より実質的に高い熱融解点(T_m)で、TNF α 標的とハイブリダイズする場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドと「特異的にハイブリダイズする」。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、規定のイオン強度およびpHで特定の配列のT_mより約10℃、好ましくは約50℃低いように選択された、厳密ハイブリダイゼーション条件に対応する。所定のイオン強度およびpHでは、T_mは、標的配列の50%が相補的ポリヌクレオチドとハイブリダイズする温度である。

【0071】

2つの一本鎖ポリヌクレオチドの間に逆平行配置でハイブリダイゼーションが起こる場合、ポリヌクレオチドは、互いに「相補的」として記載される。第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの鎖の1つの間にハイブリダイゼーションが起こる場合、二本鎖ポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドと「相補的」であり得る。相補性(1つのポリヌクレオチドが別のものと相補的である程度)は、一般的に受け入れられている塩基対合則に従って、互いに水素結合を形成すると予想される対向する鎖における塩基の割合により定量可能である。アンチセンス化合物と転写物との間に形成されたヘテロ二本鎖構造が所望のT_m安定性を有する限り、アンチセンス化合物は、2つの塩基配列が100%相補的でないとしても、標的転写物の標的領域と相補的であり得る。

【0072】

特定の核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを同定することは、多段階過程である。この過程は、通常、その機能を調整すべき核酸配列の特定から開始する。これは、例えば、その発現が特定のTNF α 障害または疾患状態に関連する細胞遺伝子(または遺伝子から転写されたmRNA)であり得る。標的設定過程は、所望の効果、例えば、タンパク質の発現の検出または調整が生じるようにアンチセンス相互作用が起こる、このTNF α 遺伝子内の部位または複数の部位の決定も含む。本発明の状況では、好ましい遺伝子内部位は、配列番号34のヌクレオチド配列2283～2300、すなわち、g t a c c t c a t c t a c t c c c a (配列番号35)を包含する領域である。

【0073】

好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトTNF α 、例えば、以下に示す配列番号34のヌクレオチド配列を標的とするように設計される。ヒトTNF α cDNA配列は、Nedwin G. E.ら(Nucleic Acids Res., 1985年、13巻、6361～6373頁)により公表され、Genbank受託番号X02910に開示されている。

【 0 0 7 4 】

【 化 3 - 1 】

```

1 gaattccggg tgatttcaact cccggtgtgc caggettgtc ctgctacccc acccagcctt
61 tcctgaggcc tcaagcctgc caccaagccc ccagctcctt ctccccgcag gacccaaaca
121 caggcctcag gactcaacac agcttttccc tccaacccgt tttctctccc tcaacggact
181 cagctttctg aagccccctc cagttctagt tctatctttt tcctgcatcc tgtctggaag
241 ttagaaggaa acagaccaca gacctggtcc ccaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag
301 gggcatgggg acgggggttca gcctccaggg tcctacacac aaatcagtca gtggcccaga
361 agacccccct cggaatcgga gcagggagga tggggagtgt gaggggtatc cttgatgctt
421 gtgtgtcccc aactttccaa atccccgccc ccgcgatgga gaagaaaccg agacagaagg
481 tgcaggggccc actaccgctt cctccagatg agctcatggg tttctccacc aaggaagttt
541 tccgctgggt gaatgattct tccccgccc tcctctcgcc ccagggacat ataaaggcag
601 ttgttggcac acccagccag cagacgctcc ctcagcaagg acagcagagg accagctaag
661 agggagagaa gcaactacag accccccctg aaaacaaccc tcagacgcca catcccccta
721 caagctgcca ggcaggttct ctctctctca catactgacc cacggcttca cctctctctc
781 cctggaagag acaccatgag cactgaaagc atgatccggg acgtggagtg gccgaggag
841 gcgctcccca agaagacagg ggggccccag ggctccaggc ggtgcttggt cctcagcctc
901 ttctccttcc tgatcggtggc aggcgccacc acgctcttct gcctgctgca ctttgagtgt
961 atcgccccc agaggggaaga ggtgagtgcc tggccagcct tcatccactc tcccacccaa
1021 ggggaaatga gagacgcaag agagggagag agatgggatg ggtgaaagat gtgcgtgat
1081 agggagggat gagagagaaa aaaacatgga gaaagacggg gatgcagaaa gagatgtggc
1141 aagagatggg gaagagagag agagaaagat ggagagacag gatgtctggc acatggaagg
1201 tgctcactaa gtgtgtatgg agtgaatgaa tgaatgaatg aatgaacaag cagatatata
1261 aataagatat ggagacagat gtggggtgtg agaagagaga tgggggaaga aacaagtgat
1321 atgaataaag atggtgagac agaaagagcg ggaaatatga cagctaagga gagagatggg
1381 ggagataagg agagaagaag ataggggtgc tggcacacag aagacactca gggaaagagc
1441 tgttgaatgc tgggaaggtga atacacagat gaatggagag agaaaaccag acacctcagg
1501 gctaagagcg caggccagac aggcagccag ctgttcctcc tttaagggtg actccctcga
1561 tgtaaccat tctccttctc cccaacagtt cccaggggac ctctctctaa tcagccctct
1621 ggcccaggca gtcagtaagt gtctccaaac ctctttccta attctgggtt tgggtttggg
1681 ggtagggtta gtaccggtat ggaagcagtg ggggaaatth aaagttttgg tcttggggga
1741 ggatggatgg aggtgaaagt aggggggtat tttctaggaa gtttaagggt ctcagctttt
1801 tcttttctct ctctcttcca ggatcatctt ctcgaacccc gagtgaacaag cctgtagccc
1861 atgttgtagg taagagctct gaggatgtgt cttggaactt ggagggctag gatttgggga
1921 ttgaagccc gctgatggta ggcagaactt ggagacaatg tgagaaggac tcgctgagct

```

10

20

【化 3 - 2】

```

1981 caagggaagg gtggaggaac agcacaggcc ttagtgggat actcagaacg tcatggccag
2041 gtgggagtgt ggtgacaga cagagaggac aggaaccgga tgtggggtgg gcagagctcg
2101 agggccaggga tgtggagagt gaaccgacat ggccacactg actctcctct ccctctctcc
2161 ctccctccag caaacctca agctgagggg cagctccagt ggctgaaccg ccgggccaat
2221 gccctcctgg ccaatggcgt ggagctgaga gataaccagc tggtggtgcc atcagagggc
2281 ctgtacctca tctactccca ggctcctctt aagggccaaag gctgcccctc caccatgtg
2341 ctctcaccac acaccatcag ccgcacgcc gtctcctacc agaccaaggt caacctctc
2401 tctgccatca agagccctg ccagagggag accccagagg gggctgaggc caagccctgg
2461 tatgagccca tctatctggg aggggtcttc cagctggaga agggtgaccg actcagcgt
2521 gagatcaatc ggcccgaacta tctcgacttt gccgagtctg ggcaggtcta ctttgggatc
2581 attgccctgt gaggaggacg aacatccaac cttcccaaag gcctcccctg cccaatccc
2641 tttattaccc cctccttcag acaccctcaa cctcttctgg ctcaaaaaga gaattggggg
2701 cttagggctg gaacccaagc ttagaacttt aagcaacaag accaccactt cgaaacctgg
2761 gattcaggaa tgtgtggcct gcacagtga gtgctggcaa ccaactaaga ttcaaactgg
2821 ggccctccaga actcactggg gcctacagct ttgatccctg acatctggaa tctggagacc
2881 agggagcctt tggttctggc cagaatgctg caggacttga gaagacctca ctagaaatt
2941 gacacaagtg gaccttaggc ctctctctct ccagatgttt ccgacttcc ttgagacag
3001 gagcccagcc ctccccatgg agccagctcc ctctatttat gtttgactt gtgattattt
3061 attatttatt tattatttat ttatttacag atgaatgtat ttatttggga gaccgggta
3121 tcctggggga cccaatgtag gagctgcctt ggctcagaca tgtttccgt gaaaacggag
3181 ctgaacaata ggctgttccc atgtagcccc ctggcctctg tgccttcttt tgattatgtt
3241 ttttaaaata tttatctgat taagtgtct aaacaatgct gatttgggtga ccaactgtca
3301 ctcatgtctg agcctctgct ccccagggga gttgtgtctg taatcgccct actattctga
3361 ggcgagaaat aaagtctgct tagaaaagaa acatggctct cttcttgga ttaattctgc
3421 atctgcctct tcttgtgggt gggaagaagc tccctaagtc ctctctccac aggccttaag
3481 atccctcgga ccagtcacca tccttagact cctagggccc tggagaccct acataaacia
3541 agcccaacag aatattcccc atccccagg aaacaagagc ctgaacctaa ttacctctcc
3601 ctcagggcat ggggaatttcc aactctggga attc (配列番号 34)

```

10

20

【0075】

本明細書で述べるナノ構造体は、安定な自己集合ナノ構造体であり得る。例えば、ナノ構造体は、T G G G A G T A G A T G A G G T A C（配列番号 4）を含む長さが 18～19ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、3'または5'末端における疎水性基が自己会合して、水中または適切な溶媒中でナノ構造体のコアを形成し得る、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。本明細書で用いられる疎水性基は、コレステロール、コレステリルもしくは修飾コレステリル残基、アダマンチン、ジヒドロテストロン、長鎖アルキル、長鎖アルケニル、長鎖アルキニル、オレイルリトコール (olely-lithoc holic)、コレン、オレオイルーコレン、パルミチル、ヘプタデシル、ミリスチル (myris ityl)、胆汁酸、コール酸もしくはタウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコ ール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和もしくは不飽和のいずれかの脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ピオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、トープチルジメチルシリル、トープチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy 3もしくはCy 5）、ヘキスト 3 3 2 5 8 染料、ソラレンまたはイブプロフェンを含み得る。

30

40

【0076】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般的に 15～20塩基の長さを有し、これは、一般的に哺乳類ゲノムにおける 1つの相補的配列を有するのに十分に長い。さらに、長さが少なくとも 12、一般的に少なくとも 15ヌクレオチドの長さを有するアンチセンス化合物は、それらの標的 mRNA と十分にハイブリダイズする。したがって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般的に 8～100ヌクレオチドのサイズ範囲にあり、より好ましくは長さが 12～50ヌクレオチドである。本発明の一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが 18～19ヌクレオチドであり、T G G G A G T A G A T G A G G T A C（配列番号 4）を含む。配列番号 4 を含むアンチセンスオリゴ

50

ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの 5' および／または 3' 末端にさらなるヌクレオチドを含み得る。しかし、配列番号 4 を含み、長さが 18 ヌクレオチドに制限されているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その分子の 5' または 3' 末端にさらなるヌクレオチドを有さない。他の非ヌクレオチド分子は、それらのオリゴヌクレオチドの 5' および／または 3' 末端に共有結合または非共有結合により結合させ得る。

【0077】

一部の例において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下のオリゴヌクレオチド：T-G-G-G-A-G-T-A-G-A-T-G-A-G-G-T-A-C（配列番号 4）、mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC（配列番号 10、Oligo 3742）、T*G*G*G*A*G*T*A*G*A*T*G*A*G*G*T*A*C（配列番号 9、Oligo 3500）、mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC（配列番号 16、Oligo 3534）およびmU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC（配列番号 18、Oligo 3509）の 1 つであり、一は、ホスホジエステル結合を指し、* は、ホスホロチオエート結合を指し、m は、メチルを指す。

【0078】

「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に用いられ、リン酸基に、および置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）もしくはウラシル（U））または置換プリン（例えば、アデニン（A）もしくはグアニン（G））のいずれかである、交換可能な有機塩基に結合された複数のヌクレオチド（すなわち、糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含む分子）を意味する。本明細書で用いられる「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、オリゴリボヌクレオチドおよびオリゴデオキシリボヌクレオチドを指す。「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、ポリヌクレオチド（すなわち、ポリヌクレオチドからリン酸を除いたもの）およびあらゆる他の有機塩基含有ポリマーも含むものとする。核酸分子は、好ましくは合成分子である（例えば、核酸合成により生成された）。オリゴヌクレオチドは、アンチセンス効果をもたらすのに有用な任意のサイズであり得る。一部の実施形態では、それらは、長さが 18 ～ 23 ヌクレオチドである。他の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが 18 ヌクレオチドである。

【0079】

「核酸」および「オリゴヌクレオチド」という用語はまた、例えば、塩基および／または糖などにおける、置換または修飾を有する核酸またはオリゴヌクレオチドを包含し得る。例えば、それらは、2' 位におけるヒドロキシル基以外および 5' 位におけるリン酸基またはヒドロキシ基以外の低分子量有機基に共有結合している主鎖糖を有する核酸を含む。したがって、修飾核酸は、2'-O-アルキル化リボース基を含み得る。さらに、修飾核酸は、リボースの代わりにアラビノースまたは 2'-フルオロアラビノースなどの糖を含み得る。したがって、核酸は、主鎖組成が不均質であり、それにより、ペプチド-核酸（核酸塩基を含むアミノ酸主鎖を有する）のような連結したポリマー単位のあらゆる可能な組合せを含有し得る。他の例は、下文でより詳細に述べる。

【0080】

オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、PNA、LNA、ENA またはそれらの任意の化学修飾もしくは天然修飾を含むハイブリッドであり得る。化学修飾および天然修飾は、当技術分野で周知である。そのような修飾は、例えば、標的鎖への結合を増大させる（すなわち、それらの融解温度を上昇させる）ように、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド-標的複合体の同定を補助するように、細胞浸透を増加させるように、オリゴヌクレオチドの構造または活性を分解しまたは妨げるヌクレアーゼおよび他の酵素に対して安定させるように、標的に配列特異的に結合したならば中断の状態（終結事象）をもたらすように、ならびにオリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するように設計された修飾を含む。

10

20

30

40

50

【0081】

修飾は、例えば、(a) 末端修飾、例えば、5' 末端修飾（リン酸化、脱リン酸化、コンジュゲーション、反転結合 (inverted linkage) など）、3' 末端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、反転結合など）、(b) 塩基修飾、例えば、修飾塩基、安定化塩基、不安定化塩基、またはパートナーのより広範なレパートリーと塩基対形成する塩基、または共役塩基 (conjugated base) による置き換え、(c) 糖修飾（例えば、2' 位または4' 位における）または糖の置き換え、ならびに (d) ホスホジエステル結合の修飾または置き換えを含む、ヌクレオシド間結合修飾を含むが、これらに限定されない。そのような修飾が翻訳を妨げる（すなわち、例えば、*in vitro* 翻訳アッセイにおいて、修飾の欠如している場合と比べて翻訳の50%、60%、70%、80%または90%またはそれ超の減少をもたらす）限りは、修飾は、本明細書で述べる方法および組成物について最適でない可能性がある。

10

【0082】

修飾ヌクレオシド間結合の非限定的な例は、正常3' - 5' 結合を有する、ホスホチオエート、キラルホスホチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルならびに3' - アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3' - アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにボラノホスフェート、これらの2' - 5' 結合類似体、ならびにヌクレオシド単位の隣接対が結合している極性が3' - 5' から5' - 3' に、または2' - 5' から5' - 2' に反転しているものを含む。様々な塩、混合塩および遊離酸型も含まれる。

20

【0083】

リン原子をその中に含まない修飾ヌクレオシド間結合は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1もしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環式ヌクレオシド間結合により形成されるヌクレオシド間結合を有する。これらは、モルホリノ結合を有するもの（ヌクレオシドの糖部分から一部分は形成された）；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン主鎖；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ主鎖；スルホネートおよびスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；ならびに混合N、O、SおよびCH₂成分部分を有するその他のものを含む。

30

【0084】

置換糖部分は、2' 位における以下のもの：H（デオキシリボース）；OH（リボース）；F；O-、S-もしくはN-アルキル；O-、S-もしくはN-アルケニル；O-、S-もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキルの1つを含むが、これらに限定されず、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換C₁ ~ C₁₀ アルキルまたはC₂ ~ C₁₀ アルケニルおよびアルキニルであり得る。

40

【0085】

化学的にまたは天然で修飾されたオリゴヌクレオチドは、例えば、糖の2' 位において修飾されている少なくとも1つのヌクレオチド、最も好ましくは2' - O-アルキル、2' - O-アルキル-O-アルキルもしくは2' - フルオロ修飾ヌクレオチドまたは末端キャップを含み得る。他の実施形態では、RNA修飾は、RNAの3' 末端におけるピリミジンのリボース、脱塩基残基または反転塩基上の2' - フルオロ、2' - アミノおよび2' - O-メチル修飾を含む。

【0086】

本発明により有用なオリゴヌクレオチドは、単一修飾ヌクレオシドを含み得る。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも2個の修飾ヌクレオシド、少なくとも3

50

個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個またはそれ超、最大オリゴヌクレオチドの全長までのヌクレオシドを含み得る。

【0087】

ヌクレオシドまたは核酸塩基は、天然プリン塩基アデニン（A）およびグアニン（G）ならびにピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）およびウラシル（U）を含む。修飾ヌクレオシドは、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、イソグアニシン、ツベルシジン、2-（ハロ）アデニン、2-（アルキル）アデニン、2-（プロピル）アデニン、2（アミノ）アデニン、2-（アミノアルキル（aminoalkyl））アデニン、2（アミノプロピル）アデニン、2（メチルチオ）N6（イソペンテニル）アデニン、6（アルキル）アデニン、6（メチル）アデニン、7（デアザ）アデニン、8（アルケニル）アデニン、8-（アルキル）アデニン、8（アルキニル）アデニン、8（アミノ）アデニン、8-（ハロ）アデニン、8-（ヒドロキシル）アデニン、8（チオアルキル）アデニン、8-（チオール）アデニン、N6-（イソペンチル）アデニン、N6（メチル）アデニン、N6，N6（ジメチル）アデニン、2-（アルキル）グアニン、2（プロピル）グアニン、6-（アルキル）グアニン、6（メチル）グアニン、7（アルキル）グアニン、7（メチル）グアニン、7（デアザ）グアニン、8（アルキル）グアニン、8-（アルケニル）グアニン、8（アルキニル）グアニン、8-（アミノ）グアニン、8（ハロ）グアニン、8-（ヒドロキシル）グアニン、8（チオアルキル）グアニン、8-（チオール）グアニン、N（メチル）グアニン、2-（チオ）シトシン、3（デアザ）5（アザ）シトシン、3-（アルキル）シトシン、3（メチル）シトシン、5-（アルキル）シトシン、5-（アルキニル）シトシン、5（ハロ）シトシン、5（メチル）シトシン、5（プロピニル）シトシン、5（プロピニル）シトシン、5（トリフルオロメチル）シトシン、6-（アゾ）シトシン、N4（アセチル）シトシン、3（3アミノ-3カルボキシプロピル）ウラシル、2-（チオ）ウラシル、5（メチル）2（チオ）ウラシル、5（メチルアミノメチル）-2（チオ）ウラシル、4-（チオ）ウラシル、5（メチル）4（チオ）ウラシル、5（メチルアミノメチル）-4（チオ）ウラシル、5（メチル）2，4（ジチオ）ウラシル、5（メチルアミノメチル）-2，4（ジチオ）ウラシル、5（2-アミノプロピル）ウラシル、5-（アルキル）ウラシル、5-（アルキニル）ウラシル、5-（アリルアミノ）ウラシル、5（アミノアリル）ウラシル、5（アミノアルキル）ウラシル、5（グアニジニウムアルキル）ウラシル、5（1，3-ジアゾール-1-アルキル）ウラシル、5-（シアノアルキル）ウラシル、5-（ジアルキルアミノアルキル）ウラシル、5（ジメチルアミノアルキル）ウラシル、5-（ハロ）ウラシル、5-（メトキシ）ウラシル、ウラシル-5オキシ酢酸、5（メトキシカルボニルメチル）-2-（チオ）ウラシル、5（メトキシカルボニル-メチル）ウラシル、5（プロピニル）ウラシル、5（プロピニル）ウラシル、5（トリフルオロメチル）ウラシル、6（アゾ）ウラシル、ジヒドロウラシル、N3（メチル）ウラシル、5-ウラシル（すなわち、プソイドウラシル）、2（チオ）プソイドウラシル、4（チオ）プソイドウラシル、2，4-（ジチオ）プソイドウラシル、5-（アルキル）プソイドウラシル、5-（メチル）プソイドウラシル、5-（アルキル）-2-（チオ）プソイドウラシル、5-（メチル）-2-（チオ）プソイドウラシル、5-（アルキル）-4（チオ）プソイドウラシル、5-（メチル）-4（チオ）プソイドウラシル、5-（アルキル）-2，4（ジチオ）プソイドウラシル、5-（メチル）-2，4（ジチオ）プソイドウラシル、1置換プソイドウラシル、1置換2（チオ）プソイドウラシル、1置換4（チオ）プソイドウラシル、1置換2，4-（ジチオ）プソイドウラシル、1（アミノカルボニルエチレニル）-プソイドウラシル、1（アミノカルボニルエチレニル）-2（チオ）プソイドウラシル、1（アミノカルボニルエチレニル）-4（チオ）プソイドウラシル、1（アミノカルボニルエチレニル）-2，4-（ジチオ）プソイドウラシル、1（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル（arninoalkylarninocarbonylethylene））-プソイドウラシル、1（アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル）-2（チオ）プソイドウラシル、1（アミノアルキルアミノカルボニルエチ

10

20

30

40

50

レニル) - 4 (チオ) プソイドウラシル、1 (アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル) - 2, 4 - (ジチオ) プソイドウラシル、1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェノキサジン - 1 - イル、1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェノキサジン - 1 - イル、1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェンチアジン - 1 - イル、1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - 置換 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - 置換 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - 置換 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - 置換 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - (アミノアルキルヒドロキシ (arninoalkylhydroxy)) - 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - (アミノアルキルヒドロキシ) - 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - (アミノアルキルヒドロキシ) - 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - (アミノアルキルヒドロキシ) - 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) - 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) - 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェノキサジン - 1 - イル、7 - (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) - 1, 3 - (ジアザ) - 2 - (オキソ) - フェンチアジン - 1 - イル、7 - (グアニジニウムアルキルヒドロキシ) - 1 - (アザ) - 2 - (チオ) - 3 - (アザ) - フェンチアジン - 1 - イル、1, 3, 5 - (トリアザ) - 2, 6 - (ジオキサ) - ナフタレン、イノシン、キサントシン、ヒポキサントシン、ヌブラリン、ツベルシジン、イソグアニシン、イノシニル、2 - アザ - イノシニル、7 - デアザ - イノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニル、3 - (メチル) イソカルボスチリリル、5 - (メチル) イソカルボスチリリル、3 - (メチル) - 7 - (プロピニル) イソカルボスチリリル、7 - (アザ) インドリル、6 - (メチル) - 7 - (アザ) インドリル、イミジゾピリジニル、9 - (メチル) - イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリリル、7 - (プロピニル) イソカルボスチリリル、プロピニル - 7 - (アザ) インドリル、2, 4, 5 - (トリメチル) フェニル、4 - (メチル) インドリル、4, 6 - (ジメチル) インドリル、フェニル、ナフタレニル (naphthalenyl)、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、ジイルオロトリル、4 - (イルオロ) - 6 - (メチル) ベンゾイミダゾール、4 - (メチル) ベンゾイミダゾール、6 - (アゾ) チミン、2 - ピリジノン、5 ニトロインドール、3 ニトロピロール、6 - (アザ) ピリミジン、2 (アミノ) プリン、2, 6 - (ジアミノ) プリン、5 置換ピリミジン、N 2 - 置換プリン、N 6 - 置換プリン、O 6 - 置換プリン、置換 1, 2, 4 - トリアゾール、ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、パラ置換 - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、オルト - 置換 - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、ビス - オルト - 置換 - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、パラ - (アミノアルキルヒドロキシ) - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、オルト - (アミノアルキルヒドロキシ) - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、ビス - オルト - (アミノアルキルヒドロキシ) - 6 - フェニル - ピロローピリミジン - 2 - オン - 3 - イル、ピリドピリミジン - 3 - イル、2 - オキソ - 7 - アミノ - ピリドピリミジン - 3 - イル、2 - オキソ - ピリドピリミジン - 3 - イルまたはそれらの任意の O - アルキル化もしくは N - アルキル化誘導体などの他の合成および天然核酸塩基を含む。

【0088】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドであり得る。本発明のキメラアンチセンス化合物は、上述のような 2 つまたはそれ超のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチド模倣体の複合構造体として形成することができる。そのような化合物は、当技術分野でハ

10

20

30

40

50

イブリッドまたはギャップマーとも呼ばれている。特に、ギャップマーは、少なくとも3つの別個の部分を含むオリゴヌクレオチドであり、それらの部分のうちの2つは、類似しており、すなわち、1つまたは複数の主鎖修飾を含んでおり、異なる、すなわち、主鎖修飾を含まない領域を取り囲んでいる。

【0089】

オリゴヌクレオチドは、1つまたは両方の末端に、すなわち、3'および/または5'末端に分子種を含み得る。本明細書で用いられる分子種は、天然ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドでない任意の化合物を指す。分子種は、スパーサー、脂質、ステロール、コレステロール部分などの脂質部分、コール酸、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホネート、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分、ステアシル、C16アルキル鎖、胆汁酸、コール酸、タウロコール酸、デオキシコレート、オレイルリトコール酸、オレオイルコレン酸、糖脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロイドなどのイソプレノイド、ビタミンEなどのビタミン、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、トリグリセリドなどの脂肪酸エステル、ピレン、ポルフィリン、テキサフィリン、アダマンタン、アクリジン、ビオチン、クマリン、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、ジゴキシゲニン、ジメトキシトリチル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、シアニン染料（例えば、Cy3もしくはCy576）、ヘキスト33258染料、ソラレンまたはイブプロフェンを含むが、これらに限定されない。

【0090】

分子種は、オリゴヌクレオチドの様々な位置に付着させることができる。上述のように、分子種は、オリゴヌクレオチドの3'-末端または5'-末端に結合させることができ、3'-または5'-エキソヌクレアーゼに対するオリゴマーの安定性を増大させる目的も果たす。あるいは、分子種は、内部ヌクレオチドまたは分枝上のヌクレオチドに結合させることができる。分子種は、ヌクレオチドの2'位に付着させることができる。分子種は、ヌクレオチドのヘテロ環塩基にも結合させることができる。

【0091】

分子種は、リンカー部分によりオリゴヌクレオチドに接続させることができる。任意選択でリンカー部分は、非ヌクレオチドリリンカー部分である。非ヌクレオチドリリンカーは、例えば、脱塩基残基（dSpacer）、トリエチレングリコールもしくはヘキサエチレングリコールなどのオリゴエチレングリコール、またはブタンジオールなどのアルカンジオールである。スパーサー単位は、好ましくはホスホジエステルまたはホスホロチオエート結合により結合されている。リンカー単位は、分子中に1回だけ出現し得るまたは例えば、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネートまたはアミド結合を介して数回組み込まれ得る。

【0092】

本発明のオリゴヌクレオチド（ヌクレオチドを分子種に接続するリンカーから分離した）は、非ヌクレオチドリリンカー、とりわけ脱塩基リンカー（dSpacer）、トリエチレングリコール単位またはヘキサエチレングリコール単位も含有し得る。さらなる好ましいリンカーは、C3、C6、C12アミノリンカーなどのアルキルアミノリンカー、およびまたC3またはC6チオールリンカーなどのアルキルチオールリンカーである。

【0093】

TNF α は、様々なTNF α 関連障害に役割を果たす。本明細書で用いられるTNF α 障害は、TNF α 活性が対象における特定の生理的機能に有害である障害を指す。本明細書で用いられる「TNF α 活性が有害である障害」という用語は、障害に罹っている対象において発現するTNF α のレベルが障害の病態生理にまたは障害の悪化もしくは維持に

寄与する因子としての役割を果たす疾患および他の障害を含むものとする。したがって、TNF α 活性が有害である障害は、TNF α 活性の阻害が障害の少なくとも1つの症状および／または進行もしくは悪化を軽減すると期待される障害である。そのような障害は、例えば、それぞれTNF α メッセージまたはタンパク質を検出するためのTNF α プローブまたは抗TNF α 抗体を用いて検出することができる、障害に罹っている対象の生体液中のTNF α の濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液などの中のTNF α の濃度の増加）により証明することができる。

【0094】

TNF α 障害は、敗血症、感染、自己免疫疾患、がん、移植拒絶反応および移植片対宿主病、移植拒絶反応、悪性腫瘍、肺障害、腸障害、心臓障害、敗血症、脊椎関節症、代謝障害、貧血、疼痛、肝障害、皮膚障害、爪障害、関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎を伴う乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、血管炎、ベーチェット病、強直性脊椎炎、喘息、慢性閉塞性肺障害（chronic obstructive pulmonary disorder；COPD）、特発性肺線維症（IPF）、再狭窄、糖尿病、貧血、疼痛、クローン病関連障害、若年性関節リウマチ（JRA）、C型肝炎ウイルス感染、乾癬性関節炎および慢性尋常性乾癬を含むが、これらに限定されない。

10

【0095】

これらの疾患のいくつかにおいてTNF α により果たされる生物学的役割を以下に述べる。これらの疾患におけるTNF α 発現を阻害することは、障害に対する治療処置となる。TNF α は、敗血症に役割を果たす。生物学的作用は、低血圧、心筋抑制、血管漏出症候群、臓器壊死、有毒二次メディエーターの放出の刺激および凝固カスケードの活性化を含む。

20

【0096】

TNF α は、例えば、関節リウマチにおける組織炎症を活性化し、関節破壊をもたらすことにより自己免疫疾患に関連付けられ、また膵島細胞の死を促進し、糖尿病におけるインスリン抵抗性を媒介すること、多発性硬化症におけるオリゴデンドロサイトに対する細胞傷害性を媒介することおよび炎症性プラークの誘導に、ならびにクローン病の発現に関連付けられている。

【0097】

様々な感染症で認められる生物学的影響は、TNF α に起因する。例えば、TNF α は、マラリアにおける脳炎症ならびに毛細血管血栓症および梗塞の媒介に、髄膜炎における脳炎症の媒介、血液脳関門の破綻の誘発、敗血症ショック症候群の誘発および静脈梗塞の活性化に、ならびに後天性免疫不全症候群（AIDS）における悪液質の誘発、ウイルス増殖の刺激および中枢神経系損傷の媒介に関連付けられている。

30

【0098】

TNF α はまた、同種移植片拒絶および移植片対宿主病（GVHD）の重要なメディエーターとして、およびT細胞受容体CD3複合体に対するラット抗体OKT3を用いて腎移植の拒絶を阻害する場合に認められた有害反応の媒介に関与するとされている。

【0099】

TNF α は、悪性腫瘍における悪液質の誘発、腫瘍成長の刺激、転移能の増強および細胞傷害性の媒介に関連付けられている。

40

【0100】

肺障害もTNF α に関連付けられる。例えば、TNF α は、成人呼吸促迫症候群（ARDS）における、白血球内皮活性化の刺激、肺細胞に対する細胞傷害性の誘導および血管漏出症候群の誘発を含む役割を果たす。本発明の組成物は、成人呼吸促迫症候群、ショック肺、慢性肺炎症性疾患、肺サルコイドーシス、肺線維症、ケイ肺病、特発性間質性肺疾患および慢性閉塞性気道障害を含む、様々な肺障害を処置するために用いることができる。慢性閉塞性気道障害の例は、喘息および慢性閉塞性肺疾患（COPD）を含む。

【0101】

クローン病を含む炎症性腸障害もTNFと関連する。クローン病に関連する障害の例は

50

、膀胱、膣および皮膚における瘻孔；腸閉塞；膿瘍；栄養欠乏；コルチコステロイドの使用による合併症；関節の炎症；結節性紅斑；壊疽性膿皮症；および眼の病変を含む。

【0102】

TNF α は、心臓の虚血を含む、心臓または冠動脈障害に役割を果たす。TNF α 活性が有害である心臓障害は、障害に罹っている対象におけるTNF α の存在が、障害の病態生理に関与すること、または心血管障害、例えば再狭窄を含む障害の悪化に寄与する因子であることのいずれかが示されたまたは疑われる冠動脈および心血管疾患を含むものとする。これらの障害は、心血管系、例えば、心臓、血管および／または血液に関わる任意の疾患、障害または状態を指す。心血管障害の例は、冠動脈疾患、狭心症、心筋梗塞、心臓停止によりもたらされた心血管組織の損傷、心臓バイパスによりもたらされた心血管組織の損傷、心原性ショック、および高血圧、アテローム動脈硬化症、冠動脈れん縮、冠動脈疾患、弁膜症、不整脈、および心筋症を含むが、これらに限定されない。

10

【0103】

脊椎関節症などの炎症性疾患もTNF α により悪化する。脊椎関節症は、脊椎の関節を侵すいくつかの疾患のうちのいずれか1つを指し、そのような疾患は、共通の臨床的、放射線学的小および組織学的特徴を共有する。

【0104】

糖尿病および肥満などの代謝障害は、TNF α に関連付けられている。代謝障害という用語は、身体が生理機能を遂行するために必要な物質をどのように保有するかに影響を及ぼす疾患または障害を指す。糖尿病の例は、1型糖尿病、2型糖尿病、糖尿病性神経障害、末梢神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性潰瘍形成、網膜症潰瘍形成、糖尿病性大血管障害および肥満を含む。

20

【0105】

TNF α は、貧血の発現に関連付けられている。貧血は、循環赤血球の数が異常に低いことまたは血液中のヘモグロビンの濃度が低いことである。関節リウマチに関連する貧血の例は、例えば、慢性疾患の貧血、鉄欠乏性貧血および自己免疫性溶血性貧血を含む。

【0106】

TNF α は、多種の疼痛症候群にも関連付けられている。本明細書で用いられる「疼痛」という用語は、神経障害性疼痛および術後疼痛、慢性腰痛、群発頭痛、帯状疱疹性神経痛、幻肢痛、中枢性疼痛、歯痛、オピオイド耐性疼痛、内臓痛、術後痛、骨損傷痛、陣痛および分娩時の疼痛、日焼けを含む、熱傷に起因する疼痛、産後の疼痛、片頭痛、狭心症痛および膀胱炎を含む尿生殖路関連痛などの急性および慢性疼痛を含むすべての種類の疼痛を指す。当用語は、侵害受容性疼痛または侵害受容も含む。

30

【0107】

肝障害もTNF α に関連する。肝障害は、障害に罹っている対象におけるTNF α の存在が、障害の病態生理に関与していること、または障害の悪化に寄与する因子であることが示されたまたは疑われる肝臓の疾患および他の障害または肝細胞損傷もしくは胆管障害に関連する状態を含む。肝障害は、アルコール性肝硬変、 α 1アンチトリプシン欠損、自己免疫性肝硬変、特発性肝硬変、劇症肝炎、B型およびC型肝炎ならびに脂肪性肝炎を含む、肝細胞損傷に関連する障害を含む。胆管障害の例は、嚢胞性線維症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎および胆管閉塞を含む。

40

【0108】

TNF α は、皮膚および爪障害に関連付けられている。皮膚障害は、炎症を伴う皮膚の、創傷以外の異常を指す。皮膚障害の例は、乾癬、尋常性天疱瘡、強皮症、アトピー性皮膚炎、サルコイドーシス、結節性紅斑、化膿性汗腺炎、扁平苔癬、スイート症候群および白斑を含むが、これらに限定されない。

【0109】

TNF α は、血管の炎症によって特徴付けられる障害の群である、血管炎に関連付けられている。TNF α 活性が有害である血管炎の例は、ベーチェット病、巨細胞動脈炎、リウマチ性多発筋痛および高安病もしくは動脈炎などの大血管疾患、古典的結節性多発性動

50

脈炎および川崎病などの中血管疾患またはベーチェット症候群、ウェグナー肉芽腫症、顕微鏡的多発性血管炎、過敏性血管炎、小血管血管炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、アレルギー性肉芽腫症および血管炎などの小血管疾患、ならびに孤立性中枢神経系血管炎および閉塞性血栓性血管炎を含むが、これらに限定されない。

【0110】

TNF α 活性が有害である様々な他の障害は、若年性動脈炎、子宮内膜症、前立腺炎、脈絡膜血管新生、坐骨神経痛、シェーグレン症候群、ぶどう膜炎、滲出型黄斑変性、骨粗鬆症、骨関節炎、炎症性骨障害、骨吸収疾患、凝固障害、熱傷、再灌流傷害、ケロイド形成、瘢痕組織形成、発熱、歯周病、肥満、放射線毒性、加齢性悪液質、アルツハイマー病、脳浮腫、炎症性脳損傷、がん、慢性疲労症候群、皮膚筋炎、スティーヴンズ・ジョンソン症候群およびヤーリッシュ・ヘルクスハイマー反応などの薬物反応、脊髄内および／または周囲浮腫、家族性周期熱、フェルティ症候群、線維症、糸球体腎炎（例えば、溶連菌感染後糸球体腎炎またはIgA腎症）、プロテアーゼの緩み、顕微鏡的多発性血管炎、混合性結合組織障害、多発性骨髄腫、がんおよび悪液質、多臓器障害、骨髄異形成症候群、睾丸炎骨溶解、急性、慢性を含む、膵炎および膵膿瘍、多発性筋炎、進行性腎不全、偽性痛風、壊疽性膿皮症、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、サルコイドーシス、硬化性胆管炎、脳卒中、胸腹部大動脈瘤修復（TAAA）、TNF受容体関連周期性症候群（TRAPS）、黄熱ワクチン接種に関連する症状、耳に関連する炎症性疾患、慢性耳炎、コレステリン腫を伴うまたは伴わない慢性中耳炎、小児耳炎、筋炎、卵巣がん、結腸直腸がん、誘発性炎症症候群（例えば、IL-2投与後の症候群）に関連する療法、ならびに再灌流傷害に関連する障害を含むが、これらに限定されない。

【0111】

オリゴヌクレオチドは、TNF α 障害の処置のために単独または別の治療剤と共に投与することができる。本発明のTNF α 阻害剤と併用することができる治療剤の非限定的な例は、以下のもの：非ステロイド抗炎症薬（複数可）（NSAID）；サイトカイン抑制性抗炎症薬（複数可）（CSAID）；CDP-571/BAY-10-3356（ヒト化抗TNF α 抗体；Celltech/Bayer）；cA2/インフリキシマブ（キメラ抗TNF α 抗体；Centocor）；75kd TNFR-IgG/エタネルセプト（75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質；ImmuneX）；55kd TNF-IgG（55kd TNF受容体-IgG融合タンパク質；Hoffmann-La Roche）；IDEC-CE9/SB210396（非枯渴霊長類化抗CD4抗体；IDEC/SmithKline）；DAB486-IL-2および／またはDAB389-IL-2（IL-2融合タンパク質；Seragen）；抗Tac（ヒト化抗IL-2R α ；Protein Design Labs/Roche）；IL-4（抗炎症性サイトカイン；DNAX/Schering）；IL-10（SCH52000；組換えIL-10、抗炎症性サイトカイン；DNAX/Schering）；IL-4；IL-10および／またはIL-4アゴニスト（例えば、アゴニスト抗体）；IL-1RA（IL-1受容体アンタゴニスト；Synergen/Amgen）；アナキンラ（Kineret/Amgen）；TNF-bp/s-TNF（可溶性TNF結合タンパク質）；R973401（ホスホジエステラーゼIV型阻害剤；MK-966（COX-2阻害剤；Iloprost）；メトトレキセート；サリドマイドおよびサリドマイド関連薬物（例えば、Celgen）；レフルノミド（抗炎症性およびサイトカイン阻害剤；トラネキサム酸（プラスミノゲン活性化の阻害剤；T-614（サイトカイン阻害剤）；プロスタグランジンE1；テニダップ（非ステロイド抗炎症薬）；ナプロキセン（非ステロイド抗炎症薬）；メロキシカム（非ステロイド抗炎症薬）；イブプロフェン（非ステロイド抗炎症薬）；ピロキシカム（非ステロイド抗炎症薬）；ジクロフェナク（非ステロイド抗炎症薬）；インドメタシン（非ステロイド抗炎症薬）；スルファサラジン；アザチオプリン；ICE阻害剤（インターロイキン-1ベータ変換酵素の阻害剤）；zap-70および／またはIck阻害剤（チロシンキナーゼzap-70またはIckの阻害剤）；VEGF阻害剤および／またはVEGF-R阻害剤（血管内皮細胞増殖因子または血管内皮細胞増

殖因子受容体の阻害剤；血管形成の阻害剤）；コルチコステロイド抗炎症薬（例えば、S B 2 0 3 5 8 0）；TNFコンベルターゼ阻害剤；抗IL-12抗体；抗IL-18抗体；インターロイキン-11；インターロイキン-13；インターロイキン-17阻害剤；金；ペニシラミン；クロロキン；ヒドロキシクロロキン；クロラムブシル；シクロスポリン；シクロホスファミド；全リンパ節照射；抗胸腺細胞グロブリン；抗CD4抗体；CD5毒素；経口投与ペプチドおよびコラーゲン；ロベンザリット二ナトリウム；サイトカイン調節薬（CRA）HP228およびHP466（Houghten Pharmaceuticals, Inc.）；ICAM-1アンチセンスホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド（ISIS2302；ISIS Pharmaceuticals, Inc.）；可溶性補体受容体1（TP10；T Cell Sciences, Inc.）；プレドニゾン；オルゴテイン；ポリ硫酸化グリコサミノグリカン；ミノサイクリン；抗IL2R抗体；海産および植物脂質（魚および植物種子脂肪酸）；オーラノフィン；フェニルブタゾン；メクロフェナム酸；フルフェナム酸；静脈内免疫グロブリン；ジロートン；アザリピン；ミコフェノール酸（RS-61443）；タクロリムス（FK-506）；シロリムス（ラパマイシン）；アミプリロース（テラフェクチン）；クラドリピン（2-クロロデオキシシアデノシン）；メトトレキセート；抗ウイルス薬；および免疫調節薬を含む。

【0112】

本発明の予防および／または治療プロトコールの毒性および有効性は、例えば、LD₅₀（集団の50％に対して致死的な用量）およびED₅₀（集団の50％において治療上有効な用量）を決定するための細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順により判断することができる。毒性および治療効果との間の用量比は、治療指数であり、LD₅₀／ED₅₀比として表すことができる。大きい治療指数を示す予防および／または治療剤が好ましい。毒性副作用を示す予防および／または治療剤を用いることができるが、未感染細胞の生じ得る損傷を最小限にし、それにより、副作用を低減するために罹患組織の部位にそのような薬剤をターゲティングする送達システムを設計するように注意を払うべきである。

【0113】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトに用いる予防および／または治療剤の一連の用量を処方するために用いることができる。そのような薬剤の用量は、好ましくは毒性をほとんどまたは全く有さないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある。用量は、用いられる剤形および用いられる投与経路によってこの範囲内で変化し得る。本発明の方法に用いるあらゆる薬剤について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養において決定されたようにIC₅₀（すなわち、症状の半阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成する用量を動物モデルにおいて処方することができる。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。いくつかの試験で、アンチセンスオリゴヌクレオチドの最適用量が検討された。

【0114】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、少なくとも約0.1％の活性化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化合物は、約2％～約75％の間の重量単位、または例えば、約25％～約60％の間、およびそれにおいて導き出せるあらゆる範囲を含み得る。

【0115】

本明細書で述べる化合物の対象の用量は、一般的に約0.1μg～10,000mgの範囲、より一般的に約1μg／日～8000mgの範囲、最も一般的に約10μg～100μgの範囲である。対象の体重に関して述べると、一般的な用量範囲は、1回の投与につき約1マイクログラム／kg／体重、約5マイクログラム／kg／体重、約10マイクログラム／kg／体重、約50マイクログラム／kg／体重、約100マイクログラム／

kg/体重、約200マイクログラム/kg/体重、約350マイクログラム/kg/体重、約500マイクログラム/kg/体重、約1ミリグラム/kg/体重、約5ミリグラム/kg/体重、約10ミリグラム/kg/体重、約50ミリグラム/kg/体重、約100ミリグラム/kg/体重、約200ミリグラム/kg/体重、約350ミリグラム/kg/体重、約500ミリグラム/kg/体重から約1000mg/kg/体重またはそれ超、およびそれにおいて導き出せるあらゆる範囲にある。本明細書で列挙した数から導き出せる範囲の非限定的な例において、約5mg/kg/体重～約100mg/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重～約500ミリグラム/kg/体重などの範囲を上述の数に基づいて投与することができる。絶対量は、併用療法、投与の数ならびに年齢、健康状態、体格および体重を含む個々の患者パラメーターを含む様々な因子に依存する。これらは、当業者に周知の因子であり、せいぜい通常の実験により対応することができる。最大用量、すなわち、妥当な医学的判断による最高安全用量を用いることが一般的に好ましい。

【0116】

本発明の分子の複数回の投与も企図される。一部の例において、本発明の分子を別の治療剤、例えば、抗炎症薬と共に投与する場合、本分子もしくは他の薬剤のいずれかの治療量以下の用量、または両方の治療量以下の用量をTNF α 障害を有するもしくは発現するリスクのある対象の処置に用いる。2つのクラスの薬物を一緒に使用する場合、望ましい治療結果をもたらすために他の薬剤を治療量以下の用量で投与することができる。本明細書で用いられる「治療量以下の用量」は、他の薬剤の非存在下で投与した場合に対象における治療結果をもたらす用量より少ない用量を指す。したがって、治療剤の治療量以下の用量は、本発明の分子の投与の非存在下で対象における所望の治療結果をもたらさないものである。TNF α 障害を処置するのに有用な薬剤の治療用量は、医療分野で周知である。これらの用量は、Remington's Pharmaceutical Sciencesなどの参考文献；ならびに感染症、がんおよび自己免疫疾患の処置のための指針として医療専門家が依拠している多くの他の医学文献に広範囲に記載されている。オリゴヌクレオチドの治療用量も当技術分野で記載されている。

【0117】

投与計画は、1日数回、毎日、1日おき、毎週、隔週、それらの間の任意の回数またはより低頻度であり得る。本明細書で用いられる「隔週投与」という用語は、物質（例えば、抗TNF α 核酸）を2週間ごとに1回対象に投与する時間的経過を指す。オリゴヌクレオチドは、例えば、7～20日ごと、11～17日ごと、または13～15日ごとに投与することができる。

【0118】

オリゴヌクレオチドは、有効量で投与する。本明細書で述べる疾患の処置における本発明の化合物の有効量は、用いられる特定の化合物、化合物の送達の方法およびそれが単独で使用されるかまたは併用されるかによって異なり得る。どの特定の適用例についての有効量も、処置される疾患、投与される特定の化合物、対象の体格または疾患もしくは状態の重症度のような因子によって異なり得る。当業者は、過度の実験を必要とすることなく、本発明の特定の分子の有効量を経験的に決定することができる。本明細書で示した教示と合わせて考え、様々な活性化合物の中から選択し、有効性、相対生物学的利用能、患者体重、有害副作用の重症度および好ましい投与方法などの因子を検討することによって、実質的な毒性をもたらさず、それにもかかわらず、特定の対象を処置するのに完全に有効である効果的な予防または処置処置計画を計画することができる。

【0119】

本明細書で述べるオリゴヌクレオチドは、本明細書でより詳細に述べるように、本発明の検出および処置方法に単独で、または検出または細胞傷害性薬剤などの他の分子とのコンジュゲートとして用いることができる。

【0120】

オリゴヌクレオチドは、例えば、検出可能標識にカップリングまたはコンジュゲートす

ることができる。検出可能標識は、その存在を直接的または間接的に確認することができる、部分である。一般的に、標識の検出は、標識によるエネルギーの放出を必要とする。標識は、特定の波長の光子または他の原子粒子（例えば、放射能、発光、光学または電子密度など）を放出および／または吸収するその能力によって直接的に検出することができる。標識は、それ自体特定の波長の光を放出または吸収し得る別の部分（例えば、F L A G エピトープなどのエピトープタグ、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素タグなど）に結合する、それを動員する、また場合によって、切断するその能力によって間接的に検出することができる。間接的検出の例は、基質を可視生成物に切断する第1の酵素標識の使用である。標識は、そのように限定されないが、化学物質、ペプチドまたは核酸分子性によるものであり得る。他の検出可能標識は、 P^{32} もしくは H^3 などの放射性同位体、10
蛍光色素、光学もしくは電子密度マーカーなどの発光マーカー、または F L A G エピトープもしくは H A エピトープ、ビオチン、アビジンなどのエピトープタグ、および西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどの酵素タグを含む。標識は、その合成中または後にオリゴヌクレオチドに結合させることができる。当業者に公知の多くの異なる標識および標識化の方法が存在する。本発明に用いることができる標識の種類の例は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、コロイド金属、化学発光化合物および生物発光化合物を含む。当業者は、本明細書で述べるオリゴヌクレオチドに対する他の適切な標識について知り、または通常の実験を用いて、上記のものを確認することができる。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドへのこれらの標識のカップリングまたはコンジュゲーションは、当業者10
に一般的である標準的技術を用いて実施することができる。

【0121】

検出可能標識へのオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションは、とりわけ、診断アッセイにおけるそのような薬剤の使用を促進する。検出可能標識の別のカテゴリーは、例えば、磁気共鳴画像化法（MRI）：Gd（DOTA）；核医学用： ^{201}Tl 、ガンマ線放出放射性核種 ^{99m}Tc ；陽電子放出断層撮影（PET）：陽電子放出同位体、（18）F-フルオロデオキシグルコース（（18）FDG）、（18）F-フッ化物、銅-64、ガドジアミド、および ^{203}Pb などの Pb （II）の放射性同位体； ^{111}In などの診断および画像化標識（一般的に *in vivo* 検出可能標識と呼ばれる）を含む。そのような場合、オリゴヌクレオチドがアンチセンス効果をもたらすので、オリゴヌクレオチドの使用を観測することが可能となる。30

【0122】

本明細書で述べるコンジュゲーションまたは修飾は、通常の化学反応を用いるものであり、その化学反応は、本発明の一部を構成せず、またその化学反応は、化学の分野の技術者に周知のものである。保護基ならびにモノおよびヘテロ二官能性リンカーなどの公知のリンカーの使用は、文献に十分に記録されており、ここで繰り返さない。

【0123】

本明細書で用いられる「コンジュゲートされた」は、2つの実体が任意の物理化学的手段により互いに安定に結合していることを意味する。付着の本質が、どちらの実体の有効性も実質的に損なわないというものであることは、重要である。これらのパラメーターを念頭において、当業者に公知の任意の共有または非共有結合を用いることができる。一部の30
の実施形態では、共有結合が好ましい。非共有結合性コンジュゲーションは、疎水性相互作用、イオン相互作用、ビオチン-アビジンおよびビオチン-ストレプトアビジン錯形成などの高アフィニティー相互作用ならびに他のアフィニティー相互作用を含む。付着のそのような手段および方法は、当業者に周知である。標識および他のアッセイ構成要素の性質によって、様々な方法を用いて標識を検出することができる。

【0124】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に溶解または分散した、有効量の1つまたは複数の薬剤を含む。「薬学的にまたは薬理的に許容される」という語句は、必要に応じて、例えば、ヒトなどの動物に投与した場合に有害、アレルギーまたは他の不都合な反応をもたらさない分子実体および組成物を指す。さらに、動物（例えば、ヒト）投40
与

与について、調製物がFDA Office of Biological Standardsにより要求されている、無菌性、発熱原性、一般安全性および純度基準を満たすべきであることは、理解される。化合物は、一般的にヒトへの投与に適している。この用語は、ヒトへの投与の前に化合物または組成物のさらなる操作が必要でないように、化合物または組成物が非毒性であり、十分に純粋であることを要求している。

【0125】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」は、当業者に公知であるように、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定剤、ゲル剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味料、着色料、染料、この種の材料およびそれらの組合せを含む（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences（1990年）を参照のこと）。通常のいかなる担体も有効成分と不適合である場合を除いて、治療用または医薬組成物におけるその使用が企図される。

10

【0126】

薬剤は、それを固体、液体またはエアゾールの形態で投与すべきであるか、またそれが注射のような投与経路のため無菌である必要があるかによって、異なる種類の担体を含み得る。本発明は、静脈内に、皮内に、動脈内に、病巣内に、腫瘍内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所に、腫瘍内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、結膜下に、小胞体内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口で、局所に、局所的に、吸入（例えば、エアゾール吸入）、注射、注入、持続注入、標的細胞を直接浸す局所的環流、カテーテルにより、洗浄により、クリーム剤で、脂質組成物（例えば、リポソーム）で、または当業者に公知であるような他の方法もしくは前述のもののいずれかの組合せにより投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照のこと）。特定の実施形態では、腹腔内注射が企図される。

20

【0127】

いずれの場合にも、組成物は、1つまたは複数の成分の酸化を遅らせるための様々な抗酸化剤を含み得る。さらに、微生物の作用の防止は、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルまたはそれらの組合せを含むが、これらに限定されない、様々な抗菌および抗真菌剤などの防腐剤によってもたらされ得る。

30

【0128】

薬剤は、遊離塩基、中性または塩の形で組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基により形成されるもの、または例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸のような有機酸により形成されるものを含む。遊離カルボキシル基により形成される塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンもしくはプロカインのような有機塩基から得ることができる。

【0129】

組成物が液体の形である実施形態では、担体は、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）およびそれらの組合せを含むが、これらに限定されない溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、例えば、液体ポリオールもしくは脂質などの担体における分散による必要な粒径の維持により、例えば、ヒドロキシルプロピルセルロースなどの界面活性剤の使用により、またはそのような方法の組合せにより、維持することができる。多くの場合に、例えば、糖、塩化ナトリウムまたはそれらの組合せなどの等張剤を含めることが好ましい。

40

【0130】

50

本発明の化合物は、組織に直接投与することができる。直接組織投与は、直接的な注射により達成することができる。化合物は、1回投与することができ、または代わりに複数回の投与で投与することができる。複数回投与する場合、化合物を異なる経路により投与することができる。例えば、最初の（または最初の数回の）投与を罹患組織中に直接行うことができ、一方、後の投与は、全身的であってよい。

【0131】

本発明の製剤は、通常薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合性担体、アジュバントおよび任意選択で他の治療用成分を含み得る、薬学的に許容される溶液で投与する。

【0132】

本発明の方法によれば、化合物は、医薬組成物で投与することができる。一般的に、医薬組成物は、本発明の化合物および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で用いられる薬学的に許容される担体は、有効成分の生物学的活性の有効性を妨げない非毒性材料を意味する。

【0133】

薬学的に許容される担体は、希釈剤、増量剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤および当技術分野で周知の他の材料を含む。そのような調製物は、塩、緩衝剤、保存剤、適合性担体および任意選択で他の治療剤を通常含み得る。医薬に用いる場合、塩は、薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩は、その薬学的に許容される塩を調製するために好都合に用いることができ、本発明の範囲から除外されない。そのような薬理学的および薬学的に許容される塩は、以下の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸などから調製されるものを含むが、これらに限定されない。また、薬学的に許容される塩は、ナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属酸化物として調製することができる。

【0134】

本発明の化合物は、錠剤、カプセル剤、散剤、粒剤、軟膏剤、水剤、デポ剤、吸入剤および注射剤などの固体、半固体、液体または気体の形態の調製物に、経口、非経口または外科的投与のための通常の方法で製剤化することができる。本発明はまた、インプラントなどによる、局所的な投与用に製剤化されている医薬組成物を含む。

【0135】

経口投与に適する組成物は、それぞれ所定の量の活性薬剤を含む、カプセル剤、錠剤、ロゼンジ剤などの不連続単位として提供することができる。他の組成物は、シロップ剤、エリキシル剤またはエマルジョンなどの水性液体または非水性液体中懸濁液を含む。

【0136】

経口投与用に、活性化合物を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と混ぜ合わせることによって、化合物を容易に製剤化することができる。そのような担体は、本発明の化合物が、処置を受ける対象による経口摂取用の錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー（slurries）、懸濁液などとして製剤化されることを可能にする。経口使用のための医薬調製物は、所望の場合、錠剤または糖衣錠コアを得るために適切な補助剤を加えた後に任意選択で得られた混合物を粉砕し、粒剤の混合物を処理して、固体賦形剤として得ることができる。適切な賦形剤は、とりわけ、ラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む、糖などの増量剤；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース調製物、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）である。所望の場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤を加えることができる。任意選択で経口製剤は、生理食塩水または内部酸性条件を中和するための緩衝液で製剤化することもでき、あるいは担体を用いずに投与することができる。

10

20

30

40

50

【0137】

糖衣錠コアは、適切なコーティングを施す。この目的のために、濃縮糖溶液を用いることができ、これは、任意選択でアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび／または二酸化チタン、ラッカー溶液ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る。識別のためまたは活性化化合物の用量の異なる配合を明らかにするために染料または顔料を錠剤または糖衣錠コーティングに加えることができる。

【0138】

経口で用いることができる医薬調製物は、ゼラチンから作製されたプッシュフィット型カプセル剤、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤から作製された軟質密封カプセル剤を含む。プッシュフィット型カプセル剤は、ラクトースなどの増量剤、デンプンなどの結合剤、および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、および任意選択で安定剤と混合された有効成分を含み得る。軟カプセル剤では、活性化化合物は、脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁することができる。さらに、安定剤を加えることができる。経口投与用に製剤化されたマイクロスフェアも用いることができる。そのようなマイクロスフェアは、当技術分野で明確に定義される。経口投与用のすべての製剤は、そのような投与に適する用量のものであるべきである。

【0139】

口腔投与のために、組成物は、通常の方法で製剤化した錠剤またはロゼンジ剤の形をとり得る。

【0140】

吸入による投与のために、本発明による使用のための化合物は、適切な高圧ガス、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガスの使用により、加圧パックまたは噴霧器からエアゾール噴霧放出の形で好都合に送達することができる。加圧エアゾールの場合、投薬単位は、定量を送達するための弁を備えることにより決定することができる。化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤の粉末混合物を含む、吸入器または吹込器に用いる例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジを製剤化することができる。エアゾール送達システムを調製する技術は、当業者に周知である。一般的に、そのようなシステムは、活性薬剤の生物学的特性を著しく損なわない成分を用いるべきである（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences中のSciarraおよびCutie、「Aerosols」を参照のこと）。当業者は、過度の実験に頼ることなくエアゾールを生産するための様々なパラメーターおよび条件を容易に決定することができる。

【0141】

化合物は、全身的に送達することが望ましい場合、注射、例えば、ボーラス注射または持続注入による非経口投与用に製剤化することができる。注射用製剤は、単位剤形で、例えば、添加保存剤を含む、アンプル入りまたは複数回投与容器入りで提供することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中懸濁剤、液剤またはエマルジョンのような形をとり、懸濁化、安定化および／または分散剤などの製剤化薬剤を含有し得る。

【0142】

非経口投与用の調製物は、無菌の水性または非水性溶液、懸濁剤およびエマルジョンを含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体は、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む。非経口投与用ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液または不揮発性油を含む。静脈内投与用ビヒクルは、補給液および栄養補給剤、電解質補給液（リンゲルデキストロースに基づくものなど）などを含む。例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加剤も存在し得る。低用量は、静脈内投与などの他の形

態の投与に起因する。適用した初回用量で対象の反応が不十分である場合、患者の耐容能が許容する程度までのより高用量（または異なる、より局所的な送達経路による効果的により高用量）を用いることができる。化合物の適切な全身レベルを達成するために1日当たり複数回投与が企図される。

【0143】

本発明の組成物は、皮膚または体腔への投与用の局所組成物に製剤化することができる。適切な局所用ビヒクルおよびビヒクル成分は、化粧品および医薬品技術分野で周知であり、水のようなビヒクル（またはビヒクル成分）；アルコール（とりわけエタノールなどの皮膚から容易に蒸発することができる低級アルコール）、グリコール（プロピレングリコール、ブチレングリコールおよびグリセリンなど）、脂肪族アルコール（ラノリンなど）などの有機溶媒；水および有機溶媒の混合物（水およびアルコール）ならびにアルコールおよびグリセリンなどの有機溶媒の混合物（任意選択で水も含む）；脂肪酸、アシルグリセロール（鉱油および天然または合成由来の脂肪などの油を含む）、ホスホグリセリド、スフィンゴ脂質およびワックスなどの脂質ベースの材料；コラーゲンおよびゼラチンなどのタンパク質ベースの材料；シクロメチコン、デメチコノールおよびジメチコンポリオール（Dow Corning）などのシリコーンベースの材料（不揮発性および揮発性）；ワセリンおよびスクアランなどの炭化水素ベースの材料；陰イオン、陽イオンおよび両性界面活性剤ならびに石けん；マイクロスポンジおよびポリマーマトリックスなどの持続放出ビヒクル；安定化および懸濁化剤；乳化剤；ならびに皮膚への投与に適する他のビヒクルおよびビヒクル成分、ならびに上記または当技術分野で公知の別の局所用ビヒクル成分の混合物を含む。ビヒクルは、保存剤、抗酸化剤、皮膚浸透促進剤、持続放出材料などの、適用製剤の安定性または有効性を改善するように構成された成分をさらに含む。そのようなビヒクルおよびビヒクル成分の例は、当技術分野で周知であり、Martindale - The Extra Pharmacopoeia (Pharmaceutical Press, London, 1993年) およびMartin (編)、Remington's Pharmaceutical Sciencesのような参考文献に記載されている。

【0144】

適切なビヒクルの選択は、特定の物理的形態および製剤が達成すべき送達の方法に依存する。適切な形態の例は、液体（例えば、溶解型のストロンチウム陽イオンを含む、うがい剤および洗口薬ならびに懸濁剤、エマルジョンなど）；ゲル剤、フォーム、ペースト剤、クリーム剤、軟膏剤、「スティック」（リップスティックまたは腋の下脱臭スティックのような）、散剤などの固体および半固体；リポソームまたは他の送達小胞を含有する製剤；直腸および腔坐剤、クリーム剤、フォーム、ゲル剤または軟膏剤；ならびにその他の形態を含む。一般的な送達方法は、手指を用いる適用；布、ティッシュ、スワブ、スティックまたはブラシなどの物理的アプリーケーターを用いる適用（例えば、適用直前に製剤でアプリーケーターを浸漬することにより、または皮膚に、処理済みまたはあらかじめ湿らせた包帯、ワイプ、ウォッシュクロスもしくはスティックなどの、製剤を既に含有する調製済みアプリーケーターを適用もしくは接着することにより達成される）；噴霧（ミスト、エアゾールまたはフォーム噴霧を含む）；点滴器適用（例えば、点耳剤を用いるような）；ふりかけること（sprinkling）（適切な粉末形態の製剤を用いるような）；および浸漬を含む。

【0145】

局所製剤は、直腸および腔投与用の製剤も含む。直腸投与用の製剤は、例えば、ココアバターを含む適切な基剤を含む坐剤として提供することができる。腔投与に適する製剤は、当技術分野で適切であることが公知であるような担体を有効成分に加えて含有する錠剤、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、フォームまたは噴霧製剤として提供することができる。

【0146】

さらに他の実施形態では、送達ビヒクルは、哺乳類レシピエントへのインプラントに適する生体適合性微粒子またはインプラントである。他の送達システムは、長期徐放、遅延

放出または持続放出送達システムを含み得る。そのようなシステムは、化合物の反復投与を回避し、対象および医師の利便性を増大させ得る。多くの種類の放出送達システムが利用可能であり、当業者に公知である。それらは、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸およびポリ酸無水物などのポリマーベースのシステムを含む。

【0147】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸を安定な自己集合ナノ構造体として製剤化する。このナノ構造体は、コアに会合しているTNF α アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。コアは、中実コアまたはリボソームコアのように中空コアであり得る。中実コアは、中空の中心部を有さない球形の材料である。本明細書で用いられる、球という用語は、一般的な形状を指し、完全な球または円形の形状を意味せずまたはそれに限定されない。これには、不完全なものも含まれる。

10

【0148】

中実コアは、貴金属（金、銀）、遷移金属（鉄、コバルト）および金属酸化物（シリカ）を含むが、これらに限定されない当業者に公知の様々な材料から構築することができる。さらに、これらの中実コアは、不活性、常磁性または超常磁性であり得る。これらの中実コアは、述べる材料の純粋組成物から、または任意の数の材料の混合物の組合せで、もしくは材料の層状組成物としてのいずれかで構築することができる。さらに、中実コアは、両親媒性ブロックコポリマー、ポリスチレンなどの疎水性ポリマー、ポリ乳酸、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトンおよび当業者に公知の生体適合性ポリマーなどのポリマーコアから構成され得る。

20

【0149】

コアは、代わりになるべきものとして、シェル材料の中心領域に少なくとも多少の空間を有する、中空コアであり得る。中空コアは、リボソームコアを含む。本明細書で用いられるリボソームコアは、脂質二重層を形成する脂質またはリン脂質の成分により形成された中心に位置するコアコンパートメントを指す。「リボソーム」は、様々なサイズおよび構造の人工的な自己閉鎖小胞構造体であり、1層または数層の膜が水性コアを封入している。最も一般的にはリボソーム膜は、親水性頭基が水性環境の方向に配向し、脂質鎖が親油性コアに埋め込まれている、脂質二重層膜から形成される。リボソームは、ブロックコポリマーまたはポリペプチドのような、ポリマーなどの他の両親媒性モノマーおよびポリマー分子からも形成することができる。ユニラメラ（unilamellar）小胞は、水性空間を取り囲む単一の膜により定義されるリボソームである。これと対照的に、オリゴ（oligo-）またはマルチラメラ（multilamellar）小胞は、数層の膜から構成されている。一般的に、膜は、厚さが約4 nmであり、天然または合成由来のリン脂質などの両親媒性脂質から構成されている。任意選択で、膜特性は、ステロールまたはコール酸誘導体などの他の脂質の取込みにより修飾することができる。

30

【0150】

脂質二重層は、脂質分子の2つの層から構成されている。層における各脂質分子は、隣接する脂質二重層と実質的に平行に配向し、二重層を形成する2つの層は、それらの分子の極性末端が水性相に露出し、非極性末端が互いに隣接している。リボソームコアの中心の水性領域は、空である、あるいは水、水性エマルジョン、オリゴヌクレオチドまたは他の治療もしくは診断薬により完全または部分的に満たされている。

40

【0151】

「脂質」は、脂肪、脂質、水に不溶性である、原形質のアルコール-エーテル可溶性構成成分を包含する一般用語として、その通常の意味を指す。脂質は通常、親水性部分および疎水性部分からなる。水中では、脂質は、自己集合して、親水性部分（頭基）が水性相の方向に配向しており、親油性部分（アシル鎖）が二重層コアに埋め込まれている、二重層膜を形成し得る。脂質は、2つの親水性部分（ボラアンフィフィル（bola amphiphiles））も含み得る。その場合、膜は、単一脂質層から形成することができ、二重層ではない。現在の文脈における脂質の一般的な例は、脂肪、脂肪油、精油、ワックス、ステロイ

50

ド、ステロール、リン脂質、糖脂質、スルホ脂質、アミノ脂質、クロモ脂質および脂肪酸である。この用語は、天然および合成脂質の両方を包含する。本発明に関連する好ましい脂質は、ステロイドおよびステロール、とりわけコレステロール、ホスファチジル、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含む、リン脂質ならびにスフィンゴミエリンである。脂肪酸が存在する場合、それらは、最大6つの二重結合を含有する、長さが約12～24炭素鎖であり得る。脂肪酸は、グリセロールに由来し得る、主鎖に結合している。1つの脂質内の脂肪酸は、異なることがあり得る（不斉）。または1つの脂肪酸鎖のみ、例えば、リゾレシチンが存在し得る。とりわけ非陽イオン脂質が、卵黄、ウシ心臓、脳、肝臓またはダイズから精製されたレシチン（ホスファチジルコリン）などの天然源に由来する場合、混合製剤も可能である。

10

【0152】

リボソームコアは、スフィンゴシン、スフィンゴシンホスフェート、メチル化スフィンゴシンおよびスフィンガニン、セラミド、セラミドホスフェート、1-0アシルセラミド、ジヒドロセラミド、2-ヒドロキシセラミド、スフィンゴミエリン、グリコシル化スフィンゴ脂質、スルファチド、ガングリオシド、ホスホスフィンゴ脂質、ならびに様々な長さおよび飽和状態のフィトスフィンゴシンおよびそれらの誘導体などのスフィンゴ脂質、ホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、リソホスファチジン酸、環状LPA、ホスファチジルエタノールアミン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、リソホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リソホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、イノシトールホスフェート、LPI、カルジオリピン、リソカルジオリピン、ビス（モノアシルグリセロ）ホスフェート、（ジアシルグリセロ）ホスフェート、エーテル脂質、ジフィタニルエーテル脂質、ならびに様々な長さおよび飽和状態のプラスマロゲンおよびそれらの誘導体などのリン脂質、コレステロール、デスモステロール、スチグマステロール、ラノステロール、ラトステロール、ジオスゲニン、シトスタノール、チモステロール、チモステノール、14-デメチルラノステロール、コレステロール硫酸、DHEA、DHEA硫酸、14-デメチル-14-デヒドロラノステロール、シトスタノール、カンペステロール、エーテルアニオン脂質、エーテルカチオン脂質、ランタニドキレート化脂質、A環置換オキシステロール、B環置換オキシステロール、D環置換オキシステロール、側鎖置換オキシステロール、二重置換オキシステロール、コレスタン酸誘導体、フッ素化ステロール、蛍光ステロール、スルホン化ステロール、リン酸化ステロール、ならびに異なる長さ、飽和状態の多価不飽和ステロールおよびそれらの誘導体などのステロールを含むが、これらに限定されない、当業者に公知の1つまたは複数の脂質から構築することができる。

20

30

【0153】

オリゴヌクレオチドは、コアの外側、コアの壁の内側および／またはコアの中心に配置することができる。コア上に配置されているオリゴヌクレオチドは、一般的にコアにカップリングされていると呼ばれる。カップリングされた状態は、直接または間接であり得る。一部の実施形態では、少なくとも25、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900もしくは1,000個のオリゴヌクレオチドまたはそのいずれかの範囲の組合せがコアの外側に存在する。一部の実施形態では、1～1000、10～500、50～250または50～300個のオリゴヌクレオチドが表面上に存在する。

40

【0154】

オリゴヌクレオチドシェルのオリゴヌクレオチドは、様々な方向に配向している可能性がある。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、半径方向に外向きに配向している。これらのオリゴヌクレオチドの配向は、コアに対して5'遠位／3'末端もしくはコアに対して3'遠位／5'末端であり、またはコアの周りに横方向に配向することがあり得る。一実施形態では、1つまたは複数の異なるオリゴヌクレオチドが単一SNAの同じ表面上に存在する。すべての場合に、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが表面上に存在するが、最大10,000個が存在し得る。

50

【0155】

オリゴヌクレオチドは、直接的にまたはリンカーを介して間接的にのいずれかで、コアにもしくは互いにおよび／または活性薬剤のような他の分子に結合し得る。オリゴヌクレオチドは、5'末端または3'末端を介してリンカーにコンジュゲートさせることができる。例えば、[配列、5'-3']-リンカーまたはリンカー-[配列、5'-3']であり得る。ナノ構造体のオリゴヌクレオチドの一部またはすべては、共有または非共有結合により、直接的または間接的にのいずれかで互いに結合し得る。別のオリゴヌクレオチドへの1つのオリゴヌクレオチドの結合は、リボソームコアへの当オリゴヌクレオチドの結合に加えてのものまたはそれに代わるものであり得る。

【0156】

オリゴヌクレオチドシェルは、様々な鎖長のアルカンチオール、環状ジチオール、リボ酸または当業者に公知の他のチオールリンカーなどの、1つまたは複数のチオールを含むあらゆる化学構造を含むが、これらに限定されない、1つまたは複数のリンカー分子を介してコアの表面に固定することができる。

【0157】

リボソームコアを含有する一実施形態では、オリゴヌクレオチドシェルは、トコフェロール、スフィンゴシン、スフィンゴシンホスフェート、メチル化スフィンゴシンおよびスフィンガニン、セラミド、セラミドホスフェート、1-0アシルセラミド、ジヒドロセラミド、2-ヒドロキシセラミド、スフィンゴミエリン、グリコシル化スフィンゴ脂質、スルファチド、ガングリオシド、ホスホスフィンゴ脂質、ならびに様々な長さおよび飽和状態のフィトスフィンゴシンおよびそれらの誘導体などのスフィンゴ脂質、ホスファチジルコリン、リソホスファチジルコリン、ホスファチジン酸、リソホスファチジン酸、環状LPA、ホスファチジルエタノールアミン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、リソホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、リソホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、イノシトールホスフェート、LPI、カルジオリピン、リソカルジオリピン、ビス(モノアシルグリセロ)ホスフェート、(ジアシルグリセロ)ホスフェート、エーテル脂質、ジフィタニルエーテル脂質、ならびに様々な長さおよび飽和状態のプラスマロゲンおよびそれらの誘導体などのリン脂質、コレステロール、デスモステロール、スチグマステロール、ラノステロール、ラトステロール、ジオスゲニン、シトスタノール、チモステロール、チモステノール、14-デメチルラノステロール、コレステロール硫酸、DHEA、DHEA硫酸、14-デメチル-14-デヒドロラノステロール、シトスタノール、カンペステロール、エーテルアニオン脂質、エーテルカチオン脂質、ランタニドキレート化脂質、A環置換オキシステロール、B環置換オキシステロール、D環置換オキシステロール、側鎖置換オキシステロール、二重置換オキシステロール、コレスタン酸誘導体、フッ素化ステロール、蛍光ステロール、スルホン化ステロール、リン酸化ステロール、ならびに異なる長さ、飽和状態の多価不飽和ステロールおよびそれらの誘導体などのステロールを含むが、これらに限定されない、1つまたは複数のリンカー分子とのコンジュゲーションによりリボソームコアの表面に固定することができる。

【0158】

オリゴヌクレオチドは、コア(リボソームコア)内に埋め込むことによってコアと会合させることもできる。またはそれを、間接的に(すなわち、リンカーのような他の分子を介して非共有結合によりもしくは共有結合により)または直接的に(すなわち、共有結合により)のいずれかで、付着または結合させることができる。

【0159】

本発明はまた、構成要素のいずれか1つまたは集合を指す、物品を含む。一部の実施形態では、物品は、キットである。物品は、1つまたは複数の容器中に本発明の医薬用または診断用化合物を含む。物品は、本発明の化合物の使用を奨励するまたは記述する指示またはラベルを含み得る。

【0160】

本明細書で用いられる「奨励」は、TNF α 障害の処置に関連する本発明の組成物に関連する、教育、病院および他の臨床指示の方法、医薬品販売、ならびにあらゆる形の書面、口述による伝達および電子通信を含む任意の広告または他の販売促進活動を含む医薬品産業活動を含む業務を実施するすべての方法を含む。

【0161】

「指示」は、奨励の構成要素を規定し、一般的に本発明の組成物の包装に関するまたは関連する書面による指示を含み得る。指示はまた、あらゆる方法で行われる口述または電子指示を含み得る。

【0162】

したがって、本明細書で述べる薬剤は、一部の実施形態では、治療、診断または研究応用におけるそれらの使用を促進するための医薬または診断または研究キットに結集することができる。キットは、本発明の構成要素および使用説明書を収容する1つまたは複数の容器を含み得る。具体的には、そのようなキットは、本明細書で述べる1つまたは複数の薬剤、ならびにこれらの薬剤の意図される治療応用および適正な投与を記述した指示書を含み得る。ある特定の実施形態では、キット中の薬剤は、医薬製剤中に存在し、薬剤の特定の応用および投与の方法に適する用量であり得る。

【0163】

キットは、医師による本明細書で述べる方法の使用を促進するように設計することができ、多くの形をとり得る。キットの組成のそれぞれは、該当する場合、液体の形態で（例えば、溶液で）または固体の形態で（例えば、乾燥粉末）用意することができる。ある特定の場合に、組成物の一部は、例えば、キットと共に供給され得るまたはされ得ない、適切な溶媒または他の種（例えば、水もしくは細胞培養培地）の添加により、構成可能または別の状態に処理可能（例えば、活性型に）であり得る。本明細書で用いられる「指示」は、指示および／または奨励の構成要素を規定し得るものであり、一般的に本発明の包装に関するまたは関連する書面による指示を含む。指示はまた、使用者が、指示がキットに関連するものであることを明確に認識するようなあらゆる方法、例えば、視聴覚（例えば、ビデオテープ、DVDなど）、インターネットおよび／またはウェブベースの通信などにより与えられる口述または電子的指示を含み得る。書面による指示は、医薬品または生物製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された形であり得る。その指示は、ヒト投与のための製造、使用または販売の当機関による承認も反映し得る。

【0164】

キットは、1つまたは複数の容器に入れた本明細書で述べる任意の1つまたは複数の構成要素を含有し得る。例として、一実施形態では、キットは、キットの1つまたは複数の構成要素を混合することおよび／または単離し、試料を混合し、対象に適用することに関する指示を含み得る。キットは、本明細書に記載する薬剤を収容する容器を含み得る。薬剤は、無菌的に調製し、注射器に包装し、冷凍して出荷され得る。あるいは、それをバイアルまたは貯蔵用の他の容器に収容することができる。第2の容器は、無菌的に調製された他の薬剤を有し得る。あるいは、キットは、事前に混合した活性薬剤を含み、注射器、バイアル、管または他の容器で出荷され得る。

【0165】

キットは、パウチ内に付属品が緩やかに詰め込まれているブリスターパウチ、収縮ラップパウチ、真空シラブルパウチ、シラブル熱成型トレー、または類似のパウチもしくはトレー形態、1つもしくは複数の管、容器、ボックスまたはバッグなどの様々な形態を有し得る。キットは、付属品を加えた後に滅菌することができ、それにより、容器中の個々の付属品の包装を別途解くことができる。キットは、放射線滅菌、熱滅菌または当技術分野で公知の他の滅菌法などの任意の適切な滅菌技術を用いて滅菌することができる。キットは、特定の応用に応じて、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝液、試薬、注射器、針、消毒剤を塗布または除去するためのガーゼなどの布、使い捨て手袋、投与前の薬剤の支持体などの他の構成要素も含み得る。

【0166】

キットの組成は、任意の適切な形態、例えば、液状の溶液または乾燥粉末として供給することができる。供給された組成物が乾燥粉末である場合、粉末は、供給されることもある、適切な溶媒を加えることによって再構成することができる。液体の形態の組成物が適する実施形態では、液体の形態のものは、濃縮するか、またはそのまま使用することができる。溶媒は、化合物および使用または投与方法に依存する。薬物組成物の適切な溶媒は、周知であり、文献で閲覧可能である。溶媒は、化合物および使用または投与方法に依存する。

【0167】

キットは、一連の実施形態では、それぞれの容器が方法に用いられる別個の要素の1つを含む、バイアル、管などの1つまたは複数の容器手段を厳重に閉じ込められた状態に入れるために区分化された運搬手段を含み得る。例えば、容器の1つは、アッセイの陽性対照を含み得る。さらに、キットは、他の構成要素、例えば、アッセイに有用な緩衝液用の容器を含み得る。

10

【0168】

本発明はまた、最終包装およびラベル表示された医薬品を包含する。この製造品は、密閉されているガラスバイアルまたは他の容器などの適切な器または容器に入れた適切な単位剤形を含む。非経口投与に適する剤形の場合、有効成分は、無菌であり、粒子状物質不含有の溶液として投与に適している。換言すると、本発明は、非経口用の溶液および凍結乾燥粉末の両方を包含し、それぞれが無菌であり、後者は、注射前の再構成に適している。あるいは、単位剤形は、経口、経皮、局所または粘膜送達に適する固体であり得る。

20

【0169】

好ましい実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内または皮下送達に適する。したがって、本発明は、好ましくは無菌で、各送達経路に適する、溶液を包含する。

【0170】

あらゆる医薬品と同様に、包装材料および容器は、貯蔵および出荷中の製品の安定性を保護するように設計されている。さらに、本発明の製品は、TNF α 疾患もしくは障害をどのようにして適切に防止または処置するかを医師、技師または患者に助言する使用説明書または他の情報資料を含む。換言すると、この製造品は、実際の用量、モニタリング手順および他のモニタリング情報を含むが、これらに限定されない投与計画を示すまたは提案する指示手段を含む。

30

【0171】

より具体的には、本発明は、ボックス、ビン、管、バイアル、容器、噴霧器、吹込器、静注(i. v.)バッグ、封筒などの包装材料；および前記包装材料内に含有される医薬品の少なくとも1つの単位剤形を含む製造品を提供する。本発明はまた、ボックス、ビン、管、バイアル、容器、噴霧器、吹込器、静注(i. v.)バッグ、封筒などの包装材料；および前記包装材料内に含有される各医薬品の少なくとも1つの単位剤形を含む製造品を提供する。本発明はさらに、ボックス、ビン、管、バイアル、容器、噴霧器、吹込器、静注(i. v.)バッグ、封筒などの包装材料；および前記包装材料内に含有される各医薬品の少なくとも1つの単位剤形を含む製造品を提供する。本発明はさらに、製剤の注射のための、好ましくは無菌の形で包装された針または注射器、および／または包装されたアルコールパッドを含む製造品を提供する。

40

【0172】

本発明は、以下の説明に示すまたは図面に例示した成分の構築および配置の詳細にその適用が限定されない。本発明は、他の実施形態および様々な方法で実施または実行する能力がある。また、本明細書で用いる表現法および用語は、記述の目的のためであり、限定的であると見なすべきでない。本明細書における「を含む(including)」、「を含む(comprising)」、「を有する」、または「を含有する」、「を含む(involve)」およびそれらの変形形態の使用は、その後に列挙する項目およびその同等物ならびにさらなる項目を包含することを意味する。

【0173】

50

当業者は、単に通常の実験を用いて、本明細書で述べる本発明の特定の実施形態の多くの同等物を認識するまたは確認することができる。そのような同等物は、以下の特許請求の範囲により包含されるものとする。

【0174】

本明細書で開示した、特許文書を含む、すべての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【実施例】

【0175】

(実施例1)

阻害性オリゴヌクレオチド配列

オリゴヌクレオチドは、標準ホスホルアミダイト化学反応 (Glen Research および ChemGenes からの試薬) を用いて MerMade 48 (Bioautomation) で合成した。配列のうちの3つは、ヒト TNF mRNA の開始コドンに対して標的化した (Oligo 3482、3483 および 3484)。3つの追加の配列を、Sfold を用いて作製した (Oligo 3485、3486 および 3487)。1つの配列 Oligo 3488 をヒト化した。最後に、スクランブル対照を作製した (Oligo 3495)。それぞれの配列を表1に列挙する。

【0176】

【表1】

表 1:オリゴヌクレオチド配列の一覧

オリゴ ID	オリゴ配列 (5'→3')	配列番号
Oligo 3482	CATGGTGTCTTCCAGG	1
Oligo 3483	TCAGTGCTCATGGTGTC	2
Oligo 3484	CATGCTTTCAGTGCTCAT	3
Oligo 3485	TGGGAGTAGATGAGGTAC	4
Oligo 3486	TTGACCTTGGTCTGGTAG	5
Oligo 3487	GATGGCAGAGAGGAGGTT	6
Oligo 3488	TTATCTCTCAGCTCCACG	7
Oligo 3495	ATGGAGCAAAACCCGCAG	8

【0177】

次いでオリゴヌクレオチドを、逆相高速液体クロマトグラフィー (Aglient) を用いて精製した。オリゴヌクレオチド生成物の同一性は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析により確認した。

【0178】

合成されたオリゴヌクレオチドを最初に TNF 発現についてスクリーニングした。初代ヒトケラチノサイトを96ウェルプレートに蒔いた。翌日、細胞に Optimem (Life Technologies) においてリポフェクタミン (Life Technologies) を用いて 2 μM のアンチセンス鎖を24時間トランスフェクトした。インキュベーション期間の後、細胞を PBS で洗浄し、それらの mRNA を抽出し、cDNA を合成し、RT-PCR を用いて TNF および GAPDH レベルを決定した (図1)。オリゴヌクレオチド 3482、3485 および 3487 は、TNF 発現レベルを低下させるのに特に有効であった。

【0179】

追加の一連の修飾配列において同じ実験条件を実施した。手短に述べると、初代ヒトケラチノサイトを96ウェルプレートに蒔いた。翌日、細胞に Optimem (Life

Technologies)においてリポフェクタミン (Life Technologies) を用いて $2\mu\text{M}$ のアンチセンス鎖を 24 時間トランスフェクトした。インキュベーション期間の後、細胞を PBS で洗浄し、それらの mRNA を抽出し、cDNA を合成し、RT-PCR を用いて TNF および GAPDH レベルを精査した (図 2)。表 2 で見られる通り、各配列をそれぞれの対照 (イタリアック体) と対にした。

【0180】

【表 2】

表 2: 修飾オリゴヌクレオチド配列およびそれらの対照

オリゴ ID	オリゴ名	オリゴ配列(5'→3') (m=メチル化;*=ホスホロチオエート結合)	配列番号
Oligo 3485	hTNF 568 - PO	TGGGAGTAGATGAGGTAC	4
Oligo 3495	scr-18 PO	ATGGAGCAAAACCCGCAG	8
Oligo 3742	hTNF 568 - OmePO	mUmGmGmGmAmGmUmAmGmAmUmGmAmGmGmUmAmC	10
Oligo 3508	scr-18 OmePO	mAmUmGmGmAmGmCmAmAmAmAmCmCmCmGmCmAmG	11
Oligo 3500	hTNF 568 - PS	T*G*G*G*A*G*T*A*G*A*T*G*A*G*G*T*A*C	12
Oligo 3496	scr-18 PS	A*T*G*G*A*G*C*A*A*A*A*C*C*C*G*C*A*G	13
Oligo 3526	hTNF 568 - OmePS	mU*mG*mG*mG*mA*mG*mU*mA*mG*mA*mU*mG*mA*mG*mG*mU*mA*mC	14
Oligo 3607	scr-18 OmePS	mA*mU*mG*mG*mA*mG*mC*mA*mA*mA*mA*mC*mC*mC*mG*mC*mA*mG	15
Oligo 3534	hTNF 568 - ギャップマー/OmePO-PS	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC	16
Oligo 3514	scr-18 ギャップマー/OmePO-PS	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG	17
Oligo 3509	hTNF 568 - ギャップマー/OmePS-PS	mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA*mG*mG*mU*mA*mC	18
Oligo 3513	scr-18 ギャップマー/OmePS-PS	mA*mU*mG*mG*mA*mG*C*A*A*A*A*C*mC*mC*mG*mC*mA*mG	19

【0181】

(実施例 2)

球状核酸 (SNA) による TNF の阻害

各種 SNA の化学的性質をそれぞれのオリゴヌクレオチド対照と比較した。抗 TNF アンチセンス鎖を含有する SNA を調製した。0.1969 g の $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ の 490 mL 沸騰水溶液を 10 mL の水中 0.570 g のクエン酸三ナトリウムにより還元することによって、 $13 \pm 1\text{ nm}$ の直径の金ナノ粒子を調製した。次いで粒子溶液を、0.45 μm 酢酸セルロース膜に通して濾過して、あらゆる凝集ナノ粒子を除去した。ナノ粒子濃度は、調製した際、11 nM であった。

【0182】

次いで金ナノ粒子をそのまま用いて、抗 TNF および対照 SNA を調製した。SNA の合成は、チオール化 5 kDa 直鎖状ポリエチレングリコールを合成したままの金ナノ粒子に 5 μM の最終濃度となるように加えることにより開始した。混合した後、溶液を 37 °C で 1.5 時間放置し、その時点で、オリゴヌクレオチドを溶液に 5 μM の最終濃度で加えた。温度を維持しながら、塩化ナトリウム溶液を官能基付与混合物に 1 時間にわたって 2 等分割量で加えて、NaCl の濃度を 150 mM に上昇させた。当混合物を 37 °C で一夜放置した。翌日、21,000 × g で遠心分離して粒子を沈殿させ、上清を除去し、粒子を無菌 PBS 中に再懸濁した。この工程を 3 回繰返して、粒子に付着しなかった過剰の PEG およびオリゴヌクレオチドを除去した。金コアからオリゴヌクレオチドを遊離させる、つまりナノ粒子を KCN により酸化的に溶解させることによって、ナノ粒子 1 個当たり

のオリゴヌクレオチドの数を測定した。最後に、遊離したオリゴヌクレオチドの数を、製造業者の指示に従って蛍光ベースのアッセイ（Oligreen、Life Technologies）により測定した。

【0183】

初代ヒトケラチノサイトを96ウェルプレートに蒔いた。翌日、細胞に5 μMのオリゴヌクレオチド濃度でTNFまたは対照SNAをトランスフェクトした。処置は、一夜継続した。翌日、細胞を洗浄し、mRNAを収集し、cDNAを調製し、TNFおよびGAPDHの発現を精査した。結果を図3に示す。表3で見られる通り、各配列をそれぞれの対照（イタリアック体）と対にした。

【0184】

【表3】

表3:SNAの化学的性質を比較するのに使用されたオリゴヌクレオチド配列および対照

オリゴID	オリゴ名	オリゴ配列(5'→3') (m=メチル化;*=ホスホロチオエート結合)	配列番号
Oligo 3652	hTNF568-ギャップマー- OMePS/PS-SH	mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mA* mG*mG*mU*mA*mC*/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	20
Oligo 4030		<i>mA*mU*mG*mG*mA*mG*C*A*A*A*A*C*mC*mC</i> <i>*mG*mC*mA*Mg/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>	21
Oligo 3657	hTNF568-ギャップマー- OMePO/PS-SH	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGm UmAmC/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/	22
Oligo 4028		<i>mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCm</i> <i>AmG/iSp18//iSp18//3ThioMC3-D/</i>	23
Oligo 3743	hTNF568-PO-SH	TGGGAGTAGATGAGGTAC/iSp18//iSp18//3ThioM C3-D/	24
Oligo 3660		<i>ATGGAGCAAAACCCGCAG/iSp18//iSp18//3ThioMC</i> <i>3-D/</i>	25

【0185】

ヒトケラチノサイトを96ウェル組織培養プレートで平板培養し、一夜付着させた。次の日、それらを、Oligo 3661修飾SNAまたはOligo 3657（配列番号22）SNAによる処理の前に50 ng/mLヒト組換えTNFで4時間処理した。処理は、一夜継続した。翌日、細胞を洗浄し、mRNAを収集し、cDNAを調製し、TNFおよびGAPDHの発現を精査し、遺伝子ノックダウンの百分率を計算した（図4）。

【0186】

Oligo 3657修飾SNAに対するさらなるホスホロチオエート修飾の影響を検討した。ホスホロチオエート含量を増加させたオリゴヌクレオチドのファミリーを前述の金ナノ粒子を用いて調製した。粒子をヒトケラチノサイトに一夜トランスフェクトした。翌日、細胞を洗浄し、mRNAを収集し、cDNAを調製し、TNFおよびGAPDHの発現を精査し、遺伝子ノックダウンの百分率を計算した（図5）。表4における配列を解析した。

【0187】

10

20

30

40

【表 4】

表 4:ホスホロチオエート含量の増加を有するオリゴヌクレオチド

オリゴ ID	オリゴ名	オリゴ配列(5'→3') (m=メチル化;*=ホスホロチオエート結合)	配列番号
Oligo 5196	hTNF 568-1 PS	mUmGmGmGmAmG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmUm AmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	26
Oligo 5289	hTNF 568-2 PS	mUmGmGmGmA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmU mAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	27
Oligo 5290	hTNF 568-3 PS	mUmGmGmG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGmU mAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	28
Oligo 5291	hTNF 568-4 PS	mUmGmG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmGm UmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	29
Oligo 5292	hTNF 568-5 PS	mUmG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmG mUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	30
Oligo 5293	hTNF 568-6 PS	mU*mG*mG*mG*mA*mG*T*A*G*A*T*G*mAmGmG mUmAmC/isp18//isp18//3thiomc3-d/	31

10

20

【0188】

TNF発現に対する中空SNAの影響を検討した。トコフェロールホスホルアミダイトを含有するオリゴヌクレオチドを調製した（ChemGenesからの試薬）。ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）からなるリボソーム足場は、脂質を75mg/mLでDCMに溶解し、次いで溶液を窒素の気流中で乾燥し、凍結乾燥することにより調製した。残留物をHEPES（pH7.3）および150mM NaClに40mg/mLの濃度で溶解し、30分間放置した後、液体窒素を用いて3つの凍結／解凍サイクルにかけた。次いで当溶液を、100、50および30nmの直径を有する細孔を含有するポリカーボネート膜に通して押し出した。得られた溶液は、直径が約40nmのリボソームを含有していた。SNA中への官能基付与は、リボソーム溶液にトコフェロール修飾オリゴヌクレオチドを加えることによって起こった。次いで材料を接線流濾過により濃縮し、上述のようにヒトケラチノサイトに加えた。調製された配列は、表5に示す通りである。

30

【0189】

【表 5】

表 5:中空 SNA の検討用のオリゴヌクレオチド配列およびその対照

オリゴ ID	オリゴ名	オリゴ配列(5'→3') (m=メチル化;*=ホスホロチオエート結合)	配列番号
568T	TNF568 - toco	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmU mAmC/iSp18//iSp18//toco/	32
対照 T	対照- toco	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmC mAmG/iSp18//iSp18//toco/	33

40

【0190】

（実施例 3）

TNF mRNAを標的とするアンチセンスSNAの阻害効果

mRNA発現に対するTNF mRNAを標的とするアンチセンスSNAの阻害効果を非標的対照SNAと比較した。化合物6081からなる、抗TNFアンチセンス鎖を含有

50

するSNAを調製した。

【0191】

すべてのオリゴヌクレオチドを、標準UniLinker (ChemGenes) を用いて1マイクロモルスケールで合成した。DNA、RNA、2'-O-Meモノマーおよびヘキサエチレングリコールスパーサーは、ChemGenes Corporationから入手した。コレステロールモディファイアは、Glen Researchから入手した。結合は、標準ホスホジエステル、または硫化剤として1:1ルチジン:ACN中0.2Mフェニルアセチルジスルフィド (PADS) を用いて作製したホスホロチオエートのいずれかであった。合成は、5'→3'方向にDMT-offで実施した。合成後、水酸化アンモニウムおよびエタノールの4:1混合物を用いて55℃で16時間処理してオリゴヌクレオチドを支持体から切断し、脱保護した。オリゴヌクレオチドをイオン交換高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により精製した。IDT Oligo分析装置を用いて分子量および吸光係数を推定した。オリゴヌクレオチド分子量の確認は、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI) を用いて実施した。オリゴヌクレオチド濃度は、IDT Oligo分析装置からの計算吸光係数とともにマイクロプレートリーダー (BioTek) で260nmでのUV吸光度により決定した。

10

【0192】

次いでオリゴヌクレオチドを用いて、抗TNFおよび対照SNAを調製した。合成は、オリゴヌクレオチドをPBS中100μMに希釈することにより開始した。次いでオリゴヌクレオチドを遮光して4℃で一夜貯蔵した。オリゴヌクレオチドの疎水性コレステロール尾部に対する極性溶媒の静電的反発により、コレステロールコアを有し、オリゴヌクレオチドが外側に延びた構造化ミセル構造が形成される。

20

【0193】

初代ヒトケラチノサイトを96ウェルプレートで平板培養した。翌日、細胞に、1000、333.3、100、33.3、10、3.3、1、0.33、0.1、0.03および0.01nMのオリゴヌクレオチド濃度のOligo ID6081またはOligo ID6093 SNAをトランスフェクトする前に50ng/mLヒト組換えTNFで4時間処理した。処理は、一夜継続した。翌日、細胞を洗浄し、mRNAを収集し、cDNAを調製し、TNFおよびGAPDHの発現を精査し、遺伝子発現の百分率を計算した (図9)。

30

【0194】

Oligo ID6081 SNAのアンチセンス活性に対するヘキサエチレングリコール (HEG) の鎖長の変化の影響を検討した。HEGスパーサー長を増加させたオリゴヌクレオチドを調製し、自己集合SNAとして製剤化した。初代ヒトケラチノサイトを96ウェルプレートで平板培養した。翌日、細胞を、100、10、1および0.1nMのオリゴヌクレオチド濃度のOligo ID6080、6081、6082、6092、6083、6093、6094または6095 SNAを用いてトランスフェクトする前に50ng/mLヒト組換えTNFで4時間処理した。処理は、一夜継続した。翌日、細胞を洗浄し、mRNAを収集し、cDNAを調製し、TNFおよびGAPDHの発現を精査し、遺伝子発現の百分率を計算した (図10)。

40

【0195】

【表 6】

表 6:中空 SNA の検討用のオリゴヌクレオチド配列

オリゴ ID	オリゴヌクレオチド配列(5'→3')	配列番号
6080	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//iSp18//3CholTEG/	35
6081	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3CholTEG/	36
6082	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/iSp18//3CholTEG/	37
6092	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC/3CholTEG/	38
6083	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//iSp18//iSp18//3CholTEG/	39
6093	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//iSp18//3CholTEG/	40
6094	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/iSp18//3CholTEG/	41
6095	mAmUmGmGmAmGC*A*A*A*A*C*mCmCmGmCmAmG/3CholTEG/	42
「*」は、ホスホロチオエート結合を表し、「m」は、O'メチル化塩基を表し、「/iSp18/」は、ヘキサエチレングリコールスパーサーを表し、「/3CholTEG/」は、コレステロールに結合した 3'トリエチレングリコールを表す		

10

20

【0196】

(実施例 4)

ヒト乾癬性皮膚における ex vivo 活性の試験

オリゴヌクレオチドは、標準固相ホスホルアミダイト法を用いて Mermade 48 (Bioautomation) により合成した。塩基および試薬は、Glen Research および Chemgenes から購入した。すべてのオリゴヌクレオチドを逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製し、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (MALDI) 分析を用いて分子量を測定した。合成オリゴヌクレオチドを表 7 に列挙する。

30

【0197】

リポソームは、50 nm の細孔を有する 47 mm の直径のポリカーボネート膜 (Sterlitech) を用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (137 mM NaCl、10 M リン酸、2.7 mM KCl、pH 7.4、hyclone) 中で水和した 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) の押出しにより合成した。リポソームの直径は、Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments) を用いた動的光散乱法を用いて測定した。脂質濃度は、リン脂質アッセイキット (Sigma) を決定した。

【0198】

L-SNA は、オリゴヌクレオチドとリポソームとを 100:1 モル比で混合し、混合物を室温で 4 時間インキュベートすることにより合成した。L-SNA を未反応材料から単離し、30 kD 分子量カットオフ修飾ポリエーテルスルホン (mPES) 中空繊維フィルターモジュールを備えた MiniKros Pilot i System (Spectrum Labs) を用いた接線流濾過 (TFF) を用いて濃縮した。L-SNA を含有する保持液を、リン脂質アッセイキット (Sigma) を用いて脂質濃度について分析した。L-SNA を 90% メタノールで希釈し、リポソームを溶解して、表面官能基化オリゴヌクレオチドを放出させ、その濃度を Cary UV/vis 分光光度計 (Agilent) を用いて測定した。ナノ粒子にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドの平均数は、オリゴヌクレオチドの濃度をリポソームの濃度で割ることによって計算した。L-SNA の直径は、Malvern Zetasizer Nano (Malvern In

40

50

s t r u m e n t s) を用いた動的光散乱法を用いて測定した。

【0199】

ヒト乾癬性 e x v i v o 皮膚培養に対し、O l i g o 4 8 3 1 . 1 を含有する L - S N A を適用することによる遺伝子調節効果を検討した。実験群を表8に列挙する。

【0200】

4つの直径3mmの皮膚生検材料を、軽度から中等度の尋常性乾癬を有する5例の患者の乾癬プラークから採取した。正確な表示を期し、また患者の特定の反応と対照して、各複製試料を異なる患者から採取した。外植片を以下の方法で培養した。C o r n i n g 12ウェル細胞培養フィルターインサートの中心に穴をパンチした。生検材料がフィルターに埋め込まれるように外植片の真皮（底部）部分をフィルターの穴に押し込んだ。表皮は、内側チャンバー中で曝露し、真皮は、外側チャンバー中で曝露した。真皮がウェル中の培地と接触し、表皮が空気に曝露するようにこれらのフィルターを1ml細胞培養培地（DMEM、1% FBS、1.25 μg/mL アムホテリシンB、50 μg/mL ゲンタマイシン、0.1 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン）中に浸した。培養物を以下のように処理した。2 μL の各化合物をピペットを用いて各生検材料の上部（角質層）のPBSに加えた。生検材料を37℃で16時間インキュベートした。

【0201】

試料は、3mmの直径のジルコニアボールベアリングを満たした2mLスクリュージャップバイアル中300 μL のRLT緩衝液（Q i a g e n）中でボールベアリングホモジナイザーを用いて直ちにホモジナイズした。ホモジナイズした試料を直ちに急速冷凍し、-80℃で貯蔵した。溶解物をQ i a g e n 96ウェルRNeasyプレート抽出キットを用いて処理した。hTNFおよびhGAPDH（R o c h e D i a g n o s t i c s）に対するプローブおよびプライマーを用いてL i g h t c y c l e r（R o c h e D i a g n o s t i c s）でRT-PCRを実施し、TNF遺伝子発現を測定した（図11）。

【0202】

【表7】

表 7:オリゴヌクレオチド配列

名称	オリゴ ID	配列(5'→3')	配列番号
対照	Oligo4832.1	mGmUmU mUmCmA C*C*A* C*C*C* mAmAmU mUmCmC/iSp18//iSp18//3Toco/	43
TNF アンチセンス	Oligo4831.1	mUmGmGmGmAmG T*A*G*A*C*A* mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3Toco/	44
オリゴヌクレオチドに用いた特殊な塩基は、次の通りである:mX=2' O-メチル RNA、/iSp18/=スパーサー18 ホスホルアミダイト、/3Toco/=3'トコフェロール、*=ホスホロチオエート			

【0203】

【表 8】

表 8:ex vivo 乾癬性皮膚の群および処理

群	組織源	Oligo	標的	種類	濃度
1	患者 A	Oligo 4832.1	対照	L-SNA	100 μ M
2	患者 A	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	100 μ M
3	患者 A	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	10 μ M
4	患者 A	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	1 μ M
5	患者 B	Oligo 4832.1	対照	L-SNA	100 μ M
6	患者 B	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	100 μ M
7	患者 B	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	10 μ M
8	患者 B	Oligo 4831.1	TNF	L-SNA	1 μ M

10

【0204】

(実施例 5)

TNBS 誘発性炎症性腸疾患 (IBD) マウスモデルにおける抗 TNF SNA および L-SNA の有効性の試験

Oligo 227901 の効果 (表 9) を TNBS 誘発性 IBD マウスモデルにおいて評価した。その 3' 末端にコレステロールを有する Oligo 227901 を合成した (ChemGenes からの試薬)。本発明者らは、実施例 6 において、このオリゴヌクレオチドの自己集合 SNA 構造体の形成を、低温 EM を用いて示す。さらに、50 nM DOPC リポソーム溶液にオリゴヌクレオチドを加えることにより、L-SNA 型の Oligo 227901 を調製した。動物に用いるために S-SNA および L-SNA を重炭酸溶液中で pH 9.5 にした。

20

【0205】

TNBS 誘発性結腸炎の試験を 6~7 週齢の Balb/c マウスにおいて実施した。結腸炎の誘発のために、80% エタノールに溶解した 10 mg の TNBS を試験 0 日目に動物の直腸内に投与した。対照マウスは、ビヒクルのみで処置したマウスおよび無処置ナイーブマウスからなっていた。

【0206】

TNBS 誘発性結腸炎試験における Oligo 227901 の S-SNA および L-SNA の治療効果を検討するために、結腸炎の誘発後 1、2、3 および 4 日目に (合計 4 回投与) 強制経口投与により 100 μ g / 投与 / マウス ~ 300 μ g / 投与 / マウスにて化合物でマウスを処置した。マウスを臨床スコア所見について 7 日まで毎日モニターし、肉眼的病理解析のために 7 日目に安楽死させた。

30

【0207】

対照マウスおよび処置マウスの臨床スコアは、体重、便の硬さおよび直腸からの出血ならびに被毛および腹部に認められたあらゆる異常などのパラメーターを考慮することによって割り当てた。

【0208】

安楽死の後に動物から摘出した結腸の肉眼的病理スコアを、試験の最終日に対照マウスおよび処置マウスに割り当てた。0~5 の肉眼的病理スコアを、異常は検出されず (スコア 0) ; 1 つの位置における浮腫および発赤 (スコア 1) ; 複数の位置における浮腫および発赤 (スコア 2) ; 1 つの潰瘍 (スコア 3) ; 複数の潰瘍または重度潰瘍 (スコア 4) ; ならびに複数の位置における浮腫および発赤かつ 1 または複数の潰瘍 (スコア 5) という所見に基づいて割り当てた。

40

【0209】

試験の結果を図 12 に示す。群の統計的有意性は、一元配置 ANOVA とそれに続く事後チューキー検定を用いて計算した。TNBS のみの群における臨床スコアおよび肉眼的病理スコアの増加は、TNBS の直腸投与がナイーブマウスを除く群のすべてにおける結

50

腸炎疾患を定着させたことを示唆している。関連ビヒクル群と比較して平均臨床スコアの有意な低下が、0日目のTNBSによる結腸炎の誘発後、1日目～4日目に合計4回の200 μg/投与の量でS-SNA型のOligo 227901で処置した群について認められた。1日目から4日目まで4回のS-SNA (200 μg/投与および300 μg/投与) およびL-SNA (200 μg/投与) の投与にて処置した動物は、ビヒクル群と比較して肉眼的病理スコアの有意な低下を示した。全体的に見て、結果は、S-SNAの経口投与が、より低い臨床スコア、より低い病理スコアおよびより高い動物生存率を反映して、疾患症状に対し正の効果を有していたことを示唆するものである。

【0210】

【表9】

10

表 9:炎症性腸疾患(IBD)の検討におけるオリゴヌクレオチド配列

オリゴID	オリゴ名	オリゴ配列(5'→3') (m=メチル化,*=ホスホロチオエート結合)	配列番号
227901	TNF568-cho1	mUmGmGmGmAmGT*A*G*A*T*G*mAmGmGmUmAmC /iSp18// iSp18//chol/	45

【0211】

(実施例6)

自己集合SNAの低温TEM

CryoTEM撮像をOligo 6307自己集合球状核酸(S-SNA) (表10)の溶液について実施した。S-SNAは、2.4 mMオリゴヌクレオチド溶液を用いてリン酸緩衝生理食塩水(PBS) (137 mM NaCl、10 Mリン酸、2.7 mM KCl、pH 7.4、Hyclone)中で調製した。試料は、400メッシュ銅グリッド上穴あき炭素フィルムにより支持されたガラス状水中に保存した。各試料は、試料懸濁液の3 μl滴を清浄グリッドに加え、濾紙で吸取り、液体エタン中で直ちにガラス化を進めることにより調製した。グリッドは、撮像のために電子顕微鏡に移すまで液体窒素中で貯蔵した。

20

【0212】

電子顕微鏡法は、FEI Eagle 4 Kx4 k CCDカメラを装着した120 keVで操作するFEI Tecnai T12電子顕微鏡を用いて実施した。ガラス状水グリッドを-170℃未満の温度に維持する低温ステージを用いて電子顕微鏡中に移した。110000x (0.10 nm/ピクセル)の公称倍率の高倍率像が得られた。像は、-5 μm～-3 μmの公称アンダーフォーカスおよび10～40 e⁻/Å²の電子線量で取得した。

30

【0213】

試料は、視野全域にわたり主として多くの小さな約3 nmの丸い粒子からなっていた(図13)。これらの丸い粒子は、S-SNA粒子の疎水性コアからなるコレステロール分子のクラスターの直径に対応する。小さな約3 nmの丸い粒子は、3～5 nmのギャップにより均等な間隔で存在し、これは、疎水性コアの周りに球状の配向で配列したオリゴヌクレオチドコロナに対応しているようである(図14A)。オリゴヌクレオチドコロナまたはシェルは、約13 nmのS-SNAの流体力学的半径を規定し、電子密度が高い疎水性コア間の間隔が均等になる(図14B)。

40

【0214】

【表10】

表 10:オリゴヌクレオチド配列

オリゴID	配列(5'→3')	配列番号
Oligo 6307	mUmGmGmGmAmG T*A*G*A*C*A* mAmGmGmUmAmC/iSp18//iSp18//3Chol/	46

50

【図 1】

ホスホジエステルーリポフェクタミンの最初のスクリーニング

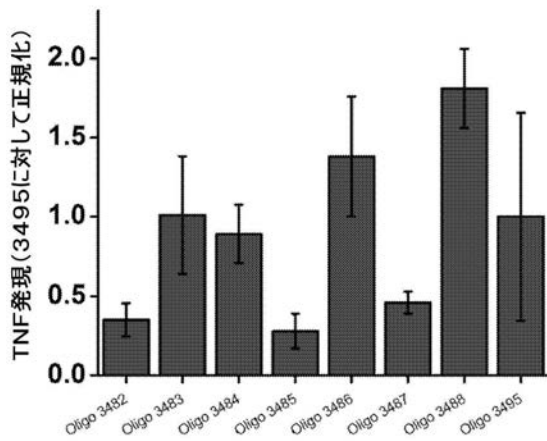


FIG. 1

【図 2】

3485に対する修飾ーリポフェクタミンによるトランスフェクション

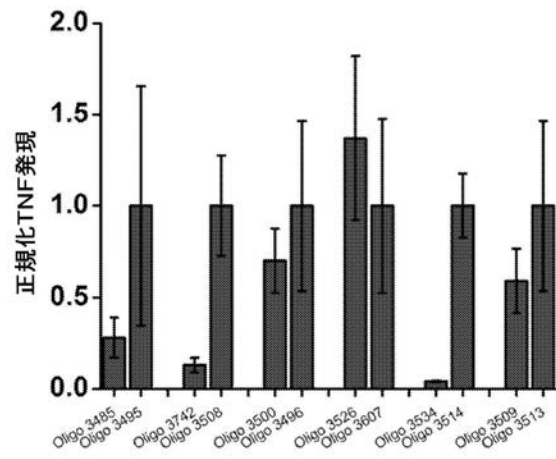


FIG. 2

【図 3】

球状核酸における化学的性質の比較一単回投与

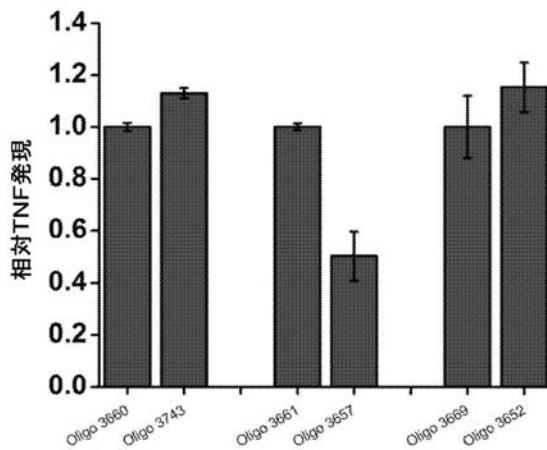


FIG. 3

【図 4 A - B】

刺激HKCにおける球状核酸によるTNFのノックダウン

FIG. 4A

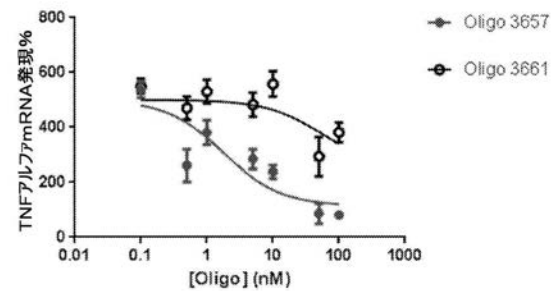


FIG. 4B

化合物	IC ₅₀
Oligo 3657	1.8 nM
Oligo 3661	>100nM

【図 5 A - B】

Oligo3657修飾球状核酸に対する
さらなるホスホロチオエート修飾の影響

FIG. 5A

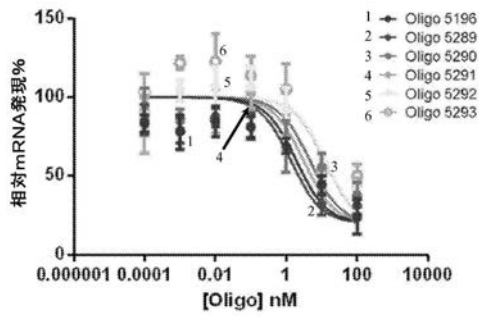


FIG. 5B

構築物	EC ₅₀
Oligo 5196	1.9 nM
Oligo 5289	1.4 nM
Oligo 5290	4.6 nM
Oligo 5291	3.0 nM
Oligo 5292	12.7 nM
Oligo 5293	12.2 nM

【図 6 A - B】

中空球状核酸によるTNFノックダウン

FIG. 6A

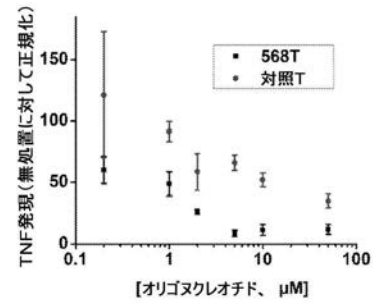


FIG. 6B

化合物	IC ₅₀
568T	0.41 μM
対照T	3.6 μM

【図 7】

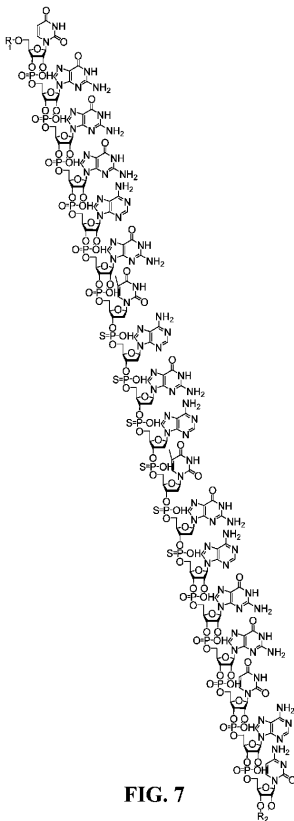


FIG. 7

【図 8】

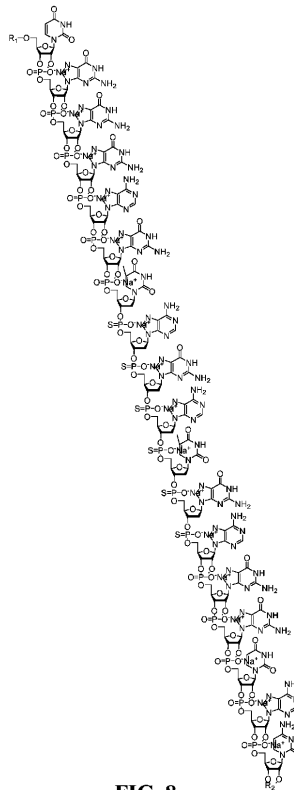


FIG. 8

【図 9】

HFKにおけるTNF mRNA発現

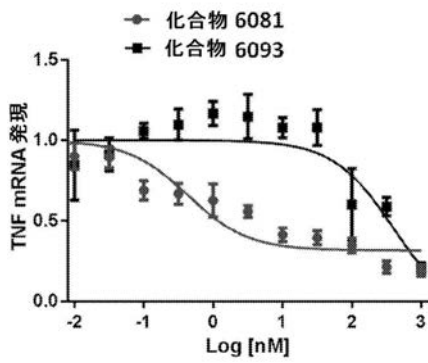


FIG. 9

【図 10】

スパーサー長の増加に伴うTNF mRNA発現の阻害の増大

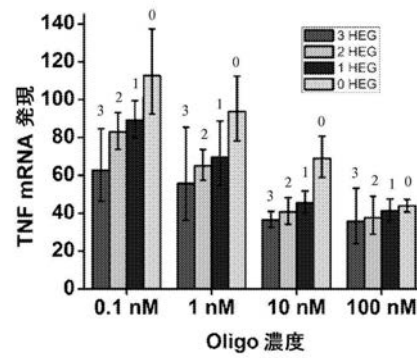


FIG. 10

【図 11】

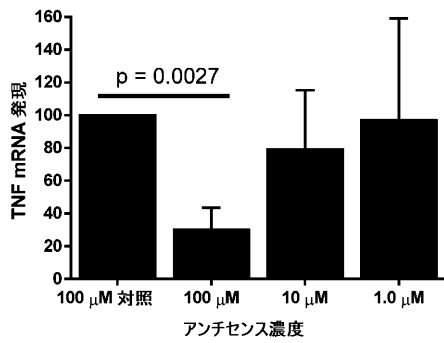


FIG. 11

【図 12 A - B】

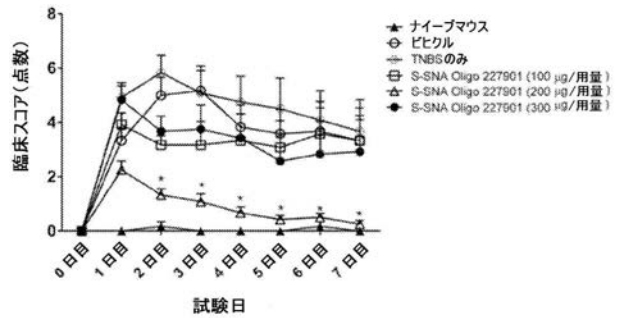


FIG. 12A

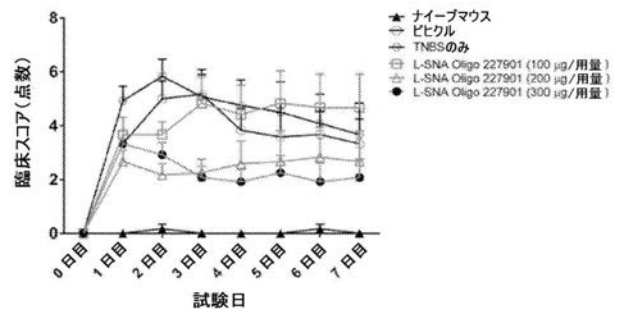


FIG. 12B

【図 12 C】

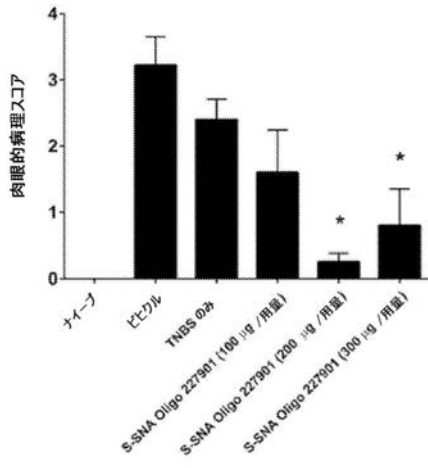


FIG. 12C

【図 12 D】

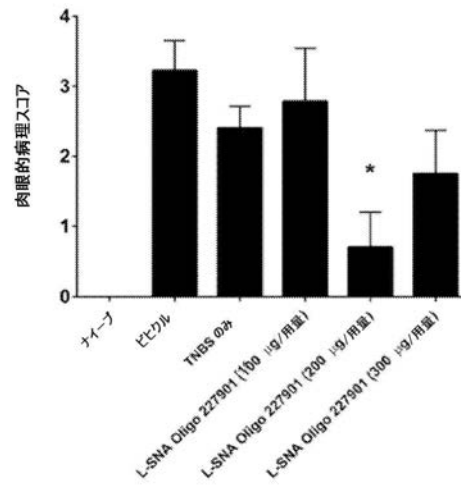


FIG. 12D

【図 13】

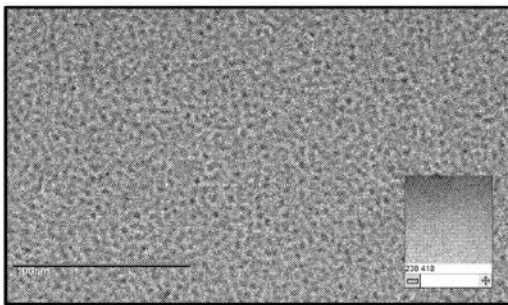


FIG. 13

【図 14 A - B】

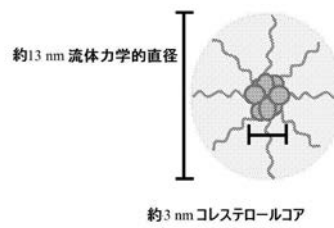


FIG. 14A

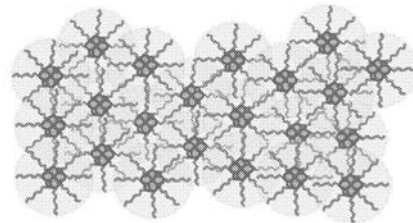


FIG. 14B

【配列表】

2017531451000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/054288
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/712 (2006.01) A61K 31/7125 (2006.01) C07H 21/02 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPIAP, EPODOC, MEOLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE and keywords: TNF, antisense oligonucleotide, gapmer, spherical nucleic acid, core, self-assembling, phosphorothioate, 2'O methyl and like terms. GENOMEQUEST, CAS REGISTRY: SEQ ID NO: 4 AUSPAT, PUBMED, ESPACENET: applicant and inventor names		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 November 2015		Date of mailing of the international search report 18 November 2015
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Richard Filmer AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2735

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2015/054288
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2000/020645 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC.) 13 April 2000 Abstract; page 5 line 30 – page 6 line 1; page 13 lines 29-30; page 16 lines 23-24; page 18 line 16 – page 19 line 9; page 20 lines 14- 30; page 22 lines 24-28; page 26 lines 3 - 27; page 27 lines 8-23; Table 1; SEQ ID NO: 18	1-47, 49, 50, 56, 57, 61-67
Y	Abstract; page 5 line 30 – page 6 line 1; page 13 lines 29-30; page 16 lines 23-24; page 18 line 16 – page 19 line 9; page 20 lines 14- 30; page 22 lines 24-28; page 26 lines 3 - 27; page 27 lines 8-23; Table 1; SEQ ID NO: 18	48, 51-55, 68-72
Y	BANGA, R. J. et al., "Liposomal Spherical Nucleic Acids", Journal of the American Chemical Society, July 2014, vol. 136, pages 9866-9869 Abstract; Scheme 1	48, 51-55, 68-72
X	WO 2009/012786 A2 (AARHUS UNIVERSITET) 29 January 2009 Abstract; page 2 lines 13-14; page 5 lines 27-35; page 6 line 32 – page 7 line 12; page 7 line 31 – page 8 line 3; page 7 lines 21-24	35-37, 41, 42, 47-60, 62-67
X	ASTHANA, G. S. et al., "Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting", BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 526391, published 26 June 2014 Abstract; Materials and Methods	35, 36, 39, 43, 44, 47-49, 51-60, 62-67
A	YIN, L. et al., "Supramolecular self-assembled nanoparticles mediate oral delivery of therapeutic TNF- α siRNA against systemic inflammation", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2013, vol. 52, no. 22, pages 5757-5761 Whole document	
A	XIAO, B., "Mannosylated bioreducible nanoparticle-mediated macrophage-specific TNF- α RNA interference for IBD therapy", Biomaterials, 2013, vol. 34, no. 30, pages 7471-7482 Abstract; Materials and Methods	
A	LENNOX, K. A. et al., "Characterization of Modified Antisense Oligonucleotides in Xenopus laevis Embryos", Oligonucleotides, 2006, vol. 16, pages 26-42 Abstract; Table 1	
P,A	WO 2014/169264 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 16 October 2014 Abstract; pages 2-5	
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2015/054288	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2000/020645 A1	13 April 2000	WO 0020645 A1	13 Apr 2000
		AU 765168 B2	11 Sep 2003
		AU 6290399 A	26 Apr 2000
		CA 2344616 A1	13 Apr 2000
		EP 1119643 A1	01 Aug 2001
		JP 2002526125 A	20 Aug 2002
		US 6080580 A	27 Jun 2000
		US 6228642 B1	08 May 2001
		US 2003022848 A1	30 Jan 2003
		US 2004142346 A1	22 Jul 2004
		US 2004152652 A1	05 Aug 2004
		US 2005053965 A1	10 Mar 2005
WO 2009/012786 A2	29 January 2009	WO 2009012786 A2	29 Jan 2009
		CA 2731399 A1	29 Jan 2009
		EP 2176411 A2	21 Apr 2010
		EP 2176411 B1	18 Apr 2012
		US 2010272813 A1	28 Oct 2010
WO 2014/169264 A2	16 October 2014	WO 2014169264 A2	16 Oct 2014
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

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	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 K	47/28	(2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/28	
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/14	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
			A 6 1 K	47/14	

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

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マダー, クリストファー シー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, コンコード ターンパイク
223, ナンバー413

(72)発明者 ハロ, ティファニー エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02140, ケンブリッジ, コンコード ターンパイク
223, ナンバー413

(72)発明者 グリャズノフ, セルゲイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, ダブリュー. ベルビュー

アベニュー 138

(72)発明者 カン, リチャード

アメリカ合衆国 イリノイ 60201, エバンストン, セントラル ストリート 3312

(72)発明者 ダニエル, ウェストン

アメリカ合衆国 イリノイ 60201, エバンストン, ヒンマン アベニュー 1513,

アパートメント 2エヌ

F ターム(参考) 4C076 AA29 AA95 CC01 CC11 CC15 CC16 CC18 CC21 CC27 CC32

CC35 DD41 DD46 DD63 DD70 EE59

4C084 AA13 MA05 NA05 ZA011 ZA081 ZA361 ZA551 ZA591 ZA661 ZA681

ZA751 ZA891 ZA961 ZB081 ZB151 ZB261 ZB331 ZB351 ZC351 ZC411

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA05 ZA01 ZA08 ZA36

ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA89 ZA96 ZB08 ZB26 ZB33

ZB35 ZC35 ZC41