

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-502365

(P2015-502365A)

(43) 公表日 平成27年1月22日(2015.1.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B 02 4
<b>C 12 N 15/113 (2010.01)</b>	C 12 N 15/00	Z N A G 4 C 08 4
<b>A 6 1 P 37/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/00	4 C 08 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-547389 (P2014-547389)	(71) 出願人	502087552 オンコイミューニン、インコーポレイティ ド アメリカ合衆国、メリーランド 2087 7、ガイザースバーグ、ペリー パークウ エイ 207エー、スイート 6
(86) (22) 出願日	平成24年12月12日 (2012.12.12)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月8日 (2014.8.8)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/069294	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 國際公開番号	W02013/090457	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 國際公開日	平成25年6月20日 (2013.6.20)		
(31) 優先権主張番号	61/630,446		
(32) 優先日	平成23年12月12日 (2011.12.12)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

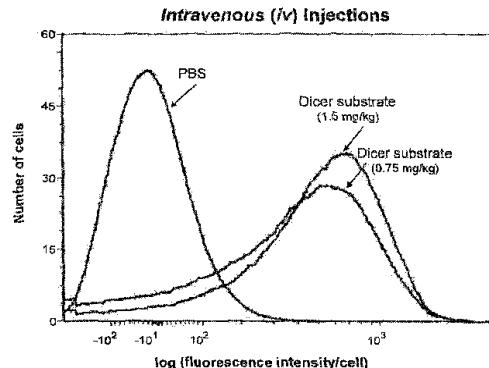
(54) 【発明の名称】オリゴヌクレオチドのイン-ビボ送達

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、オリゴヌクレオチドのイン-ビボ送達のための方法を提供する。

【解決手段】本発明は、生物の細胞の細胞質及び組織に注目の核酸配列を送達するために、オリゴヌクレオチドに連結された1又は複数のHESの存在を利用する。送達ベヒクルは細胞及び生物にとって非毒性である。送達は配列非依存性であり、そして受容体非依存的態様で膜を通過するので、送達されるオリゴヌクレオチドは、生きた細胞の細胞質及び核における相補的配列を標的とすることができる。細菌又はウイルス由来配列もまた標的化され得る。この方法は、生きた生物中の、特定の蛋白質の発現をコードする遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、ディサー(Dicer)基質、miRNA、anti-miRNA、又は任意の核酸配列の送達のために使用され得る。生きた生物には、哺乳類、植物、並びに細菌、原生動物及びウイルスの如き微生物が含まれる。

【選択図】なし



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象に療法的オリゴヌクレオチドを送達するための組成物において、当該組成物は、療法的オリゴヌクレオチドを含む療法的有効量のH-タイプ励起構造(H-type excitonic structure; HES) - オリゴヌクレオチドを含んで成り、当該療法的オリゴヌクレオチドは、イン-ビボで核酸配列に特異的にハイブリダイズし、そして当該核酸によりコードされ又は制御される蛋白質のレベルを変更する、ことを特徴とする前記組成物。

## 【請求項 2】

前記療法的オリゴヌクレオチドが、約8ヌクレオチド～約750ヌクレオチドである、請求項1に記載の組成物。

10

## 【請求項 3】

前記療法的オリゴヌクレオチドが1本鎖である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

前記療法的オリゴヌクレオチドが2本鎖である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記HES - オリゴヌクレオチドが、1又は複数のHESを形成することができる3又はそれより多くのフルオロフォアを含んで成る、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記療法的オリゴヌクレオチドが、siRNA、shRNA、miRNA、ダイサー(Dicer)基質、アプタマー(aptamer)、デコイ(decoy)及びアンチセンスから選択されるメンバーである、請求項1に記載の組成物。

20

## 【請求項 7】

前記療法的オリゴヌクレオチドが、RNAに特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 8】

前記療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドが、RNAにハイブリダイズしたとき、RNase Hのための基質である、請求項7に記載の組成物。

30

## 【請求項 9】

前記療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ギャップマー(gapmer)である、請求項8に記載の組成物。

## 【請求項 10】

前記療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドが、RNAにハイブリダイズしたとき、RNase Hのための基質でない、請求項7に記載の組成物。

40

## 【請求項 11】

前記療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドが、DNA又はDNA模倣物である、請求項7に記載の組成物。

## 【請求項 12】

療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが、2'-位に修飾を含む修飾された糖成分、PNAモチーフ、又はモルホリノモチーフ(morpholino motif)を含んで成る、請求項10に記載の組成物。

## 【請求項 13】

前記療法的アンチセンスオリゴヌクレオチドが、  
(a) mRNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内にある配列；  
(b) miRNAのヌクレオチド1-10；  
(c) mRNAの5'-非翻訳領域における配列；  
(d) mRNAの3'-非翻訳領域における配列；  
(e) mRNAのイントロン/エキソン連結部；  
(f) オリゴヌクレオチドにより結合されたとき、miRNAのプロセシングを遮断するプレカーサー-pre-miRNA(pri-miRNA)又は一次(プライマー)-miRNA(pri-miRNA)における配列；及び

50

(g) RNAのイントロン／エキソン連結部及びイントロン／エキソン連結部の5'の1～50ヌクレオ塩基の領域；

から成る群から選択されるRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズすることができる、請求項7に記載の組成物。

【請求項14】

前記療法的オリゴヌクレオチドが、RNAインターフェアレンス(RNAi)を誘導することができる、請求項1に記載の組成物。

【請求項15】

前記療法的オリゴヌクレオチドが、siRNA、shRNA又はダイサー(Dicer)基質である、請求項14に記載の組成物。

10

【請求項16】

18～35ヌクレオチドの長さを有する、請求項15に記載の療法的オリゴヌクレオチド。

【請求項17】

前記療法的オリゴヌクレオチドがダイサー(dicer)基質であり、そして組成物が、それぞれが18～25ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチド3'オーバーハングを有する2つの相補的核酸鎖を含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項18】

2'OME、ロックされた核酸(LNA)、LNA、2' - フルオロ(2'F)、2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、2'-OCH<sub>3</sub>(2'-O-メチル)、PNA及びモルホリノから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシドモチーフを含む、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項19】

修飾されたヌクレオシドモチーフが、LNA又はLNA(ここで、メチレン(-CH<sub>2</sub>-)n基が2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋し、nは1又は2である)である、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記LNA又はLNAが、5'位にメチル基を含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミド、3' - メチレンホスホネート、0 - メチルホスホロアミジエート、PNA及びモルホリノから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結を含む、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項22】

C-5プロピン及び5-メチルCから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオ塩基を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項23】

対象における標的核酸又は蛋白質対象の調節、対象における核酸の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、対象における蛋白質の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、対象における異常な核酸又は蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、における請求項1～19のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項24】

エクス - ビボでの、細胞中の標的核酸又は蛋白質の調節、エクス - ビボでの、核酸の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、エクス - ビボでの、蛋白質の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、エクス - ビボでの、異常な核酸又は蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、における請求項1～22のいずれか1項に記載の組成物の使用。

40

【請求項25】

療法的有効量の療法的オリゴヌクレオチドを含む、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドを含んで成る組成物において、当該療法的オリゴヌクレオチドは、イン - ビボでの標的核酸配列に特異的にハイブリダイズし、そして当該核酸によりコードされ又は制御される蛋白質のレベルを変更し、イン - ビボでの、細胞中の標的核酸又は蛋白質対象の調節、イ

50

ン - ビボでの、標的核酸の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、イン - ビボでの、対象における蛋白質の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、イン - ビボでの、対象における異常な核酸又は蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、における使用のための組成物。

【請求項 26】

感染性疾患、癌、増殖性疾患又は障害、神経性疾患又は障害、及び炎症性疾患又は障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝性疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、及び皮膚又は眼の疾患又は障害から選択される疾患又は障害、の治療のための、請求項25に記載の組成物の使用。

【請求項 27】

療法的有効量の療法的オリゴヌクレオチドを含む、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドを含んで成る組成物において、当該療法的オリゴヌクレオチドは、エクス - ビボで標的核酸配列に特異的にハイブリダイズし、そして当該核酸によりコードされ又は制御される蛋白質のレベルを変更し、エクス - ビボでの、細胞中の標的核酸又は蛋白質対象の調節、エクス - ビボでの、対象における核酸の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、エクス - ビボでの、対象における蛋白質の過剰発現又は過小発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、エクス - ビボでの、対象における異常な核酸又は蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療、における使用のための組成物。

【請求項 28】

感染性疾患、癌、増殖性疾患又は障害、神経性疾患又は障害、及び炎症性疾患又は障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝性疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、及び皮膚又は眼の疾患又は障害から選択される疾患又は障害、の治療のための、請求項27に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチド療法の分野に関する。特に、本発明は、修飾されたオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド模倣物を含めてのオリゴヌクレオチドのための改良されたイン - ビボ送達を提供する。

【背景技術】

【0002】

過去数十年にわたり、療法剤としてのオリゴヌクレオチドの使用は、多くの興味の焦点であった。特定の遺伝子の転写の遮断及び特定のタンパク質をコードするオリゴヌクレオチド配列の付加の両方が、癌、感染性疾患、及び神経変性状態を含む多くの病的状態の療法として試みられてきた。更に、潜在的なオリゴヌクレオチドを基礎とする薬物及び薬物剤形の合成的、免疫的、及び生物物理的性質に取り組むために、多くの化学的アプローチが開発されてきた。しかしながら、溶液での及びエクス - ビボ系での幾つかの成功にも拘わらず、生物の存在する細胞膜及び細胞外マトリクスの如き生物的障壁、並びに細胞壁の如き感染性因子の構造成分を通ってのオリゴヌクレオチドの送達は最適には至っていない。したがって、イン - ビボでの細胞及び組織内の分子標的への接近性が、オリゴヌクレオチド療法分野の発達を限定している。

【0003】

DNA及びRNA配列の送達の限界の幾つかを克服するための最近の努力において、注目のオリゴヌクレオチド配列に結合した又はそれを包埋する、脂質、糖及び蛋白質から構成される送達ベヒクル (vehicle)、例えばリポソーム、及び脂質ナノ粒子、コレステロール接合体、及び抗体接合体が開発されている。しかしながら、これらの剤形の何れも、疾患治療におけるその期待される役割を達成するための、オリゴヌクレオチド療法の分野のためのオリゴヌクレオチド積荷の送達を可能にしていない。したがって、オリゴヌクレオチドに基礎を置く療法剤の改良されたイン - ビボ送達系の需要が存在する。

10

20

30

40

50

**【発明の概要】****【0004】**

本発明は、H-型励起構造(HES)を含むオリゴヌクレオチド複合体、並びにこれらの複合体の製造及び使用の方法に関する。本発明は、1本鎖、2本鎖及び多本鎖オリゴヌクレオチド配列への1又は複数のHESの結合が、イン-ビボ系において見出されるHES-オリゴヌクレオチド配列の生理的境界を通しての増加した送達をもたらすという、本発明者らの重要な発見に部分的に基づいている。

**【0005】**

遺伝子発現変更療法におけるRNAi及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、PNA(PNAs)及びPMOsの使用を制限する最も堅固な障害の一つは、真核細胞によるこれらの化合物の低い取込みであった。このことは、現在利用可能な送達方法と共に、実際の細胞に入る化合物の隔離(sequestration)及び/又は変質(degradation)により増加され；細胞に入るには主としてエンドサイトーシスによる。当業者に直ぐに明らかのように、本発明の非-毒性HES-オリゴヌクレオチド複合体が配列非依存的受動核酸を介して細胞に送達される際の驚くべき高い効率、及びこれらのオリゴヌクレオチドが細胞内リソゾームと共に同時局在化しないという本発明者らによる発見は、本発明のHES-オリゴヌクレオチド送達ベヒクルが、すべての細胞内空間/区画(compartment)に入る可能性を有することを示す。したがって、例えば、研究、診断及び療法の分野において本質的に無限定の用途が存在する。特定の態様において、本発明は、疾患、障害又は状態の治療又は予防のための、HES及び少なくとも1つの療法的オリゴヌクレオチドを含んで成るHES-オリゴヌクレオチド複合体のイン-ビボ送達に関する。

10

20

30

40

**【0006】**

更に、現在利用可能な送達方法をもって、外因性核酸配列に対する哺乳類細胞における生来の抗ウイルス防御の誘導が、同様に、療法的オリゴヌクレオチドの開発及び使用を有意に制限している。本発明者らは、HES-オリゴヌクレオチドが低い毒性(10倍より高い濃度における決定されたオリゴヌクレオチドのイン-ビボ細胞負荷レベル)を有することを発見し、そして実際に、驚くべきことに、HES-オリゴヌクレオチドの化学的連結が、他の送達ベヒクルをもって観察されるインターフェロン応答に比べて、宿主対象(すなわち、マウス)におけるインターフェロン応答を誘導しないことを見出した。したがって、追加の態様において、本発明は、投与された外因性核酸(すなわち、オリゴヌクレオチド)に対する宿主におけるインターフェロン応答を限定する方法を包含し、この方法は、1、2、3又はそれより多くのオリゴヌクレオチドをHESに連結してHES-オリゴヌクレオチド複合体を形成し、そして当該HES-オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成る。

**【0007】**

幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体送達ベヒクルは、注目の核酸の存在をイン-ビボで同定及び/又は定量するための診断剤として使用される。他の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体送達ベヒクルは、宿主生物における感染物、例えば哺乳類組織におけるウイルス又は細菌、の存在を同定するために使用される。これらの態様において、当該複合体のHESの崩壊の際に生ずる蛍光の変化が、細胞中の核酸標的配列への、当該複合体中の1又は複数のHES-オリゴヌクレオチド配列の結合についてのイン-ビボマーカーとして役立ちうる。したがって、幾つかの態様において、本発明の複合体は、診断的用途及び療法的用途の両方を有する。このアプローチはまた、宿主中の異常遺伝子のコピー数をイン-ビボで定量するために使用され得る。

**【0008】**

更なる態様において、本発明は、疾患又は障害についての核酸バイオマーカーのレベルの変化をイン-ビボで検出するための方法を提供し、当該方法は、前記核酸バイオマーカーと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチドを対象に投与し、当該対象における蛍光のレベルを決定し、そしてこの蛍光レベルを、HES-オリゴヌクレオチドが投与された対照としての対象について得られたそれとを比較する

50

ことを含んで成り、ここで、対照と比べて変化した蛍光が、前記対象が核酸バイオマーカーの変化したレベルを有することを示す。このアプローチはまた、宿主由来の異常遺伝子のコピー数をイン・ビボで定量するためにも使用され得る。

【0009】

幾つかの態様において、疾患又は障害は、癌、線維症、増殖性疾患又は障害、神経疾患又は障害、及び炎症性疾患又は障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝性疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、或いは皮膚又は眼の疾患又は障害である。

【0010】

追加の態様において、本発明の方法は、異なる疾患又は障害の間を同定及び／又は区別するために使用される。本発明の方法は同様に、特に、正常な及び疾患性の（例えば癌性の）組織又は細胞の間を区別する変化した核酸（例えば、DNA及びRNA）プロファイルを決定するため、疾患性の細胞の異なるサブタイプの間（例えば、異なる癌及び特定の癌のサブタイプの間）を区別するため、異なる疾患状態を生じさせるか又は当該疾患状態と関連する変異（例えば発癌性変異）の間を区別するため、及び組織の由来（特に、転移した腫瘍）を同定するために使用され得る。

【0011】

本発明は、核酸、及び当該調節された核酸によりコードされる又は制御される蛋白質を調節するための組成物及び方法を提供する。特定の態様において、本発明は、mRNA、小さい非コードRNA（例えば、miRNA）、遺伝子又は蛋白質のレベル、発現、プロセッシング又は機能を調節するための組成物及び方法を提供する。特定の態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することにより、オリゴヌクレオチドを細胞にイン・ビボで送達する方法を提供する。特定の態様において、前記オリゴヌクレオチドは療法的オリゴヌクレオチドである。

【0012】

更に、幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチドにおけるオリゴヌクレオチドは、療法的オリゴヌクレオチドであり、そして当該療法的オリゴヌクレオチドが標的核酸に特異的にハイブリダイズする場合に増加した蛍光において生ずるHESの破壊又は有意な喪失が、当該療法的オリゴヌクレオチドが標的核酸に送達されそして当該標的核酸にハイブリダイズしたことを示す。したがって、幾つかの態様において、本発明は、標的核酸への療法的オリゴヌクレオチドのイン・ビボでの送達のモニタリング及び／又は定量のための方法を提供し、当該方法は、前記標的核酸に特異的にハイブリダイズする療法的オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチドを対象に投与し、そして当該対象の細胞又は組織における蛍光のレベルを決定することを含んで成り、ここで、対照細胞又は組織と比べての、前記細胞又は組織における増加した蛍光が、前記療法的オリゴヌクレオチドが前記標的核酸に送達されそして当該標的核酸とハイブリダイズしたことを示す。

【0013】

追加の態様において、本発明は療法的オリゴヌクレオチドを対象に送達するための組成物に向けられ、ここで、当該組成物は、療法的有効量の療法的オリゴヌクレオチドと作用可能に関連する1又は複数のH - 型励起構造（HES）を含んで成り、当該療法的オリゴヌクレオチドは、核酸配列にイン・ビボで特異的にハイブリダイズし、そして当該核酸によりコードされるか又は制御される蛋白質のレベルを調節するものである。幾つかの態様において、前記療法的オリゴヌクレオチドは、約8ヌクレオチド～約750ヌクレオチドの長さを有する。幾つかの態様において、前記療法的オリゴヌクレオチドは、約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さを有する。

【0014】

幾つかの態様において、前記療法的オリゴヌクレオチドは1本鎖である。幾つかの態様において、前記療法的オリゴヌクレオチドは2本鎖である。追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、1又は複数のHESを形成することができる3又はそれより多くのフルオロフォアを含んで成る。更なる態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、siRN

10

20

30

40

50

A、shRNA、miRNA、ダイサー (Dicer) 基質、アプタマー (aptamer)、デコイ (decoy) 及びアンチセンスから選択されるメンバーである。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はDNA模倣物である。

【0015】

幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド中の療法的オリゴヌクレオチドは、RNAに特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズしたときRNase Hの基質である。特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはキャップマー (gapmer) である。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミド、3' - メチレンホスホネート、0 - メチルホスホロアミジエート、PNA及びモルホリノから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結を含む。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、C-5プロピン及び5-メチルCから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシドを含む。

10

【0016】

幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、2' - 位に修飾を含む修飾された糖成分、PNAモチーフ、又はモルホリノモチーフ (morpholino motif) を含む。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、2'OME、LNA、LNA、2' - フルオロ (2'F)、2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>及び2' - OCH<sub>3</sub>(2' - 0 - メチル)から選択される修飾されたヌクレオシドモチーフを含む。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシドモチーフは、LNA又はLNA (ここで、メチレン (-CH<sub>2</sub>-)n基が2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋し、nは1又は2である)である。更なる態様において、LNA又はLNAは、5'位にメチル基を含む。

20

【0017】

追加の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド中の療法的オリゴヌクレオチドは、RNAに特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドであるが、しかしながら当該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズしたときRNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA又はDNA模倣物である。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミド、3' - メチレンホスホネート、0 - メチルホスホロアミジエート、PNA及びモルホリノから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結を含む。

30

【0018】

追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、C-5プロピン及び5-メチルCから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、2' - 位に修飾を含む修飾された糖成分、PNAモチーフ、又はモルホリノモチーフ (morpholino motif) を含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位に修飾を含む修飾された糖成分、PNAモチーフ、又はモルホリノモチーフ (morpholino motif) を含んで成る。

40

【0019】

追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、2'OME、LNA、LNA、2' - フルオロ (2'F)、2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>及び2' - OCH<sub>3</sub>(2' - 0 - メチル)から選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシドモチーフを含む。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシドモチーフは、LNA又はLNA (ここで、メチレン (-CH<sub>2</sub>-)n基が2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋し、nは1又は2である)である。更なる態様において、LNA又はLNAは、5'位にメチル基を含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'OME、LNA、LNA、2' - フルオロ (2'F)、2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>及 (2'OME) び2' - OCH<sub>3</sub>(2' - 0 - メチル)から選択される修飾されたヌクレオシドモチーフを含む。

【0020】

50

更なる態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド中の療法的オリゴヌクレオチドは、

- ( a ) mRNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内にある配列；
- ( b ) miRNAのヌクレオチド1 - 10；
- ( c ) mRNAの5' - 非翻訳領域における配列；
- ( d ) mRNAの3' - 非翻訳領域における配列；
- ( e ) mRNAのイントロン / エキソン連結部；
- ( f ) オリゴヌクレオチドにより結合されたとき、miRNAのプロセシングを遮断するブレカーサー - miRNA (pre-miRNA) 又は一次 (プライマリー) - miRNA (pri-miRNA) における配列；及び
- ( g ) RNAのイントロン / エキソン連結部及びイントロン / エキソン連結部の5'の1 ~ 50ヌクレオ塩基の領域；

に特異的にハイブリダイズする配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

#### 【0021】

他の態様において、本発明は、医療的オリゴヌクレオチドを対象に送達するための組成物に向けられ、ここで当該組成物は、療法的有効量の療法的オリゴヌクレオチドと作用可能に関連する1又は複数のH - 型励起構造 (HES) を含んで成り、当該医療的オリゴヌクレオチドは、核酸配列とイン - ピボで特異的にハイブリダイズし、そして当該核酸によりコードされ又は制御される蛋白質のレベルを、RNAインターフェアランス (RNAi) の誘導を介して調節するものである。幾つかの態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー (Dicer) 基質である。更なる態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、18 ~ 35ヌクレオチドの長さを有する。

#### 【0022】

幾つかの態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、ダイサー (dicer) 基質であり、それぞれ18 ~ 25ヌクレオチドの長さを有する2本の相補的核酸鎖を含み、そして2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ダイサー (Dicer) 酵素活性によりプロセシングされるdsRNA又はdsRNA模倣物である。追加の態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、RNAインターフェアレンスを誘導することができるRNA又はRNA模倣物である。幾つかの態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホラミド、3' - メチレンホスホネート、0 - メチルホスホアミジエート、PNA及びモルホリノから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結を含む。追加の態様において、療法的オリゴヌクレオチドは、C-5プロピン及び5-メチルCから選択される1又は複数の修飾されたヌクレオ塩基を含む。

#### 【0023】

幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、2' - 位に修飾を含む修飾された糖成分、PNAモチーフ、又はモルホリノモチーフ (morpholino motif) を含む。更なる態様において、療法的オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドは、2'OME、LNA、LNA、2' - フルオロ (2'F) 、2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (2' - OME) 及び2' - OCH<sub>3</sub> (2' - O - メチル) から選択される修飾された糖モチーフを含む。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシドモチーフは、LNA又はLNA (ここで、メチレン (-CH<sub>2</sub>- )n基が2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋し、nは1又は2である) である。更なる態様において、LNA又はLNAは、5'位にメチル基を含む。

#### 【0024】

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、細胞へのオリゴヌクレオチドの高度に効果的なイン - ピボ送達を提供し、そして標的核酸及び蛋白質のレベル及び活性を調節することにおける、限定の無い適用を本質的に有する。HES - オリゴヌクレオチドは、医療用途において特に有用である。

#### 【0025】

幾つかの態様において、本発明は、対象において標的核酸を調節する方法を提供し、当

10

20

30

40

50

該方法は、当該対象にHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することを含んで成り、ここで当該複合体のオリゴヌクレオチドは、当該標的核酸に対して実質的に相補的な配列を含み、核酸に特異的にハイブリダイズしそして核酸のレベルを調節し、またはそのプロセシング若しくは機能を干渉する。幾つかの態様において、標的核酸はRNAであり、更なる態様において、RNAはmRNA又はmiRNAである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、対象の1又は複数の細胞又は組織において、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%、標的RNAのレベルを低下させる。幾つかの態様において、標的核酸はDNAである。

#### 【0026】

本発明はまた、核酸を調節する、及び調節された核酸によりコードされ又は制御される蛋白質を調節するための組成物及び方法を提供する。特定の態様において、本発明は、mRNA、小さい非 - コードRNA( 例えば、miRNA )、遺伝子及び蛋白質のレベル、発現、プロセシング又は機能を調節するための組成物及び方法を提供する。

10

#### 【0027】

1つの態様において、対象において標的核酸の活性を阻害し、そして / 又はその発現を低下させる方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含んで成るHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、核酸を含んで成る又はコードする核酸に標的化され、そして細胞における当該核酸のレベルを低下させ、そして / 又はその機構を干渉するものである。特定の態様において、標的核酸は、小さい非 - コードRNA、例えばmiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸に対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

20

#### 【0028】

追加の態様において、本発明は、標的RNAの発現の低下が必要な対象において標的RNAの発現を低下させる方法を提供し、当該方法は、当該対象にアンチセンスHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することを含んで成る。特定の態様において、当該複合体中のオリゴヌクレオチドは、当該標的mRNAに結合したとき、RNase Hの基質である。更なる態様において、オリゴヌクレオチドはギャップマー( gapmer )である。

30

#### 【0029】

追加の態様において、本発明は、対象における核酸の発現又は活性を増加させる方法を提供し、当該方法は、当該対象に、オリゴヌクレオチドを含んで成るHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、当該核酸を含んで成るか若しくはコードする又は当該核酸の内因性発現、プロセッシング又は機能を増加させ( 例えば、当該核酸をコードする遺伝子中の制御配列に結合することによる )、そして細胞中での核酸のレベルを増加させ、及び / 又はその機能を増加させるものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該核酸を含んで成るか又はコードする核酸と実質的に同じ配列を含んで成る。

30

#### 【0030】

本発明はまた、対象における核酸の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を治療する方法を含み、当該方法は、前記対象に、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、核酸を含んで成るか又はコードする核酸に対して標的化されており、そして前記対象において前記核酸のレベルを低下させ、そして / またはその機能に干渉するものである。

40

#### 【0031】

更なる態様において、本発明は、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を治療する方法を含み、当該方法は、前記対象に、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、前記蛋白質をコードする核酸に対して標的化されており、又は前記対象において、前記蛋白質の内因性発現、プロセッシング又は機能を低下させるものである。幾つかの態様において、前記核酸はDNA、mRNA又はmiRNAである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗 - miRNA、ダイサー( dicer )基質、アンチセンスオリ

50

ゴヌクレオチド、或いはsiRNA、miRNA、リボザイム（ribozyme）及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。

【0032】

追加の態様において、本発明はまた、対象における蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害を治療する（例えば、軽減する）方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、前記蛋白質をコードするmRNAに特異的にハイブリダイズし、そして標的RNAのスプライシングを変更する（例えば、特定のスプライス生成物の生産又は過剰生産が疾患において関連する場合にエキソンスキッピングを促進する）ものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位における修飾を含む少なくとも1つの修飾された糖成分を含んで成る。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、2'OME又は2'アリルである。

10

【0033】

追加の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、LNA、LNA（例えば、5'位に立体的に嵩高な成分（例えば、メチル基）を含むLNA又はLNA）である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、PNA又はホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、AUG開始コドンの30ヌクレオチド以内の配列、標的RNAの5'若しくは3'非翻訳領域における配列、又は標的mRNAのスプライシングを変更する配列に特異的にハイブリダイズする。特に、オリゴヌクレオチドは、デュセンヌ型筋ジストロフィー（DMD）における標的mRNAのスプライシングを変更する配列に特異的にハイブリダイズする。更なる態様において、変更されたスプライシングは、生ずるmRNAのエキソン51のスピッキングをもたらす。

20

【0034】

種々の態様において、本発明は、対象におけるイン - ビボで、又はエクス - ビボで、細胞中の標的核酸又は蛋白質を調節するために使用する組成物を提供する。本発明のHES - オリゴヌクレオチド組成物は、例えば、イン - ビボ又はエクス - ビボでの、対象における核酸又は蛋白質の過剰発現、過小発現及び/又は異常発現により特徴付けられる疾患又は障害の治療において用途を有する。感染性疾患、癌、増殖性疾患又は障害、神経性疾患又は障害、及び炎症性疾患または障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝性疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、及び皮膚又は眼の疾患又は障害、から選択される例示的疾患又は障害の治療における発明の組成物の使用もまた、本発明に含まれる。

30

【0035】

追加の態様において、本発明は、細胞核再プログラミングの方法を提供する。幾つかの態様において、1又は複数のmiRNA、又は1又は複数のmiRNA模倣物及び/又は阻害剤を含むHES - オリゴヌクレオチドが細胞、例えばヒト及びマウスの体細胞にエクス - ビボで投与され、当該細胞が、誘導された多能性幹細胞（iPSC）又は胚幹（ES） - 様多能性細胞の1又は複数の性質を有するように再プログラミングされる。本発明の、非 - 毒性の高度に効果的なHES - オリゴヌクレオチド送達系は、常用のオリゴヌクレオチド送達系（例えば、米国特許公開US2010/0075421、US 2009/0246875、US 2009/0203141、及びUS 2008/0293143を参照のこと）に比べて、細胞の再プログラミングのための送達方法に非常に増加した効率を提供する。

40

【0036】

定義

本明細書において、下記の略号を使用される。

「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」なる用語は、共有結合した少なくとも2個のヌクレオチドに関する。本発明の核酸 / オリゴヌクレオチドは、好ましくは、1本鎖または2本鎖であり、そして一般にホスホジエステル結合を含む。但し、下に概略記載するように、幾つかの場合には、例えば下記のものを含んで成る他の主鎖を有する核酸 / オリゴヌクレオチド類似体が含まれる：

50

## 【0037】

ホスホラミド (phosphoramido) : 例えば、Beaucage et al. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) 及びその中に引用されている文献 : Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl et al. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81 :579; Letsinger et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3587; Sawai et al. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; 及びPauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419を参照のこと : これらの文献のそれぞれの全内容を引用により本明細書に組み入れる。

ホスホラチオエート (phosphorathioate) (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; 及び米国特許第5,644,048号 : 当該文献の全内容を引用により本明細書に組み入れる。 10

## 【0038】

ホスホロジチオエート (phosphorodithioate) : Briu et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 :2321)。

O-メチルホスホロアミジエート結合 : 例えば、Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press)を参照のこと。

ペプチド核酸主鎖及び結合 : 例えば、Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31 : 1008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380:207を参照のこと : これらの文献の全内容を引用により本明細書に組み入れる。

## 【0039】

他の類似体核酸 / オリゴヌクレオチドには、陽性主鎖を有するもの (例えば、Dempcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:6097を参照のこと : 当該文献の全内容を引用により本明細書に組み入れる)、非 - イオン性主鎖を有するもの (例えば、米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号及び第4,469,863号; Angew. (1991) *Chem. Intl., Ed. English* 30:423; Letsinger et al. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13: 1597; Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series* 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34: 17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)を参照のこと : これらの文献のそれぞれの全内容を引用により本明細書に組み入れる)、及び米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号、及びChapters 6 and 7, *ASC Symposium Series* 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cookに記載されている非 - リボース主鎖が含まれる。 30

## 【0040】

1又は複数のカルボキシル糖を含む核酸 / オリゴヌクレオチドもまた、核酸 / オリゴヌクレオチドの定義に含まれる (例えば、Jenkins et al. (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp 169-176を参照のこと)。この文献の全内容を引用により本明細書に組み入れる。幾つかの核酸 / オリゴヌクレオチド類似体が、Rawls, *C & E News* Jun. 2 1997 page 35に記載されており、この文献の記載の全体を引用により本明細書に組み入れる。リボース - リン酸主鎖のこれらの修飾は、例えば、標識のごとき追加の成分の付加を促進するため、又は生理的環境でのそのような分子の安定性及び半減期を増加させるために行われる。 40

## 【0041】

本発明において使用されるオリゴヌクレオチドの核酸 / オリゴヌクレオチド主鎖は、約5ヌクレオチド ~ 約750ヌクレオチドに亘る。本発明において使用される好ましいオリゴヌクレオチドの核酸 / オリゴヌクレオチド主鎖は、約5ヌクレオチド ~ 約500ヌクレオチドに亘り、そして好ましくは約10ヌクレオチド ~ 100ヌクレオチドの長さである。本明細書で使用される場合、数に関連して使用される「約」または「およそ」なる用語は、参照される数の0.25%、0.5%、1%、5%又は10%以内の任意の数を意味する。

## 【0042】

10

20

30

40

50

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の少なくとも領域に特異的にハイブリダイズすることができるヌクレオシド及び／又はヌクレオチドモノマーのポリマー構造を有する。上に示したように、HES - オリゴヌクレオチドは、天然の対応物、及び天然の及び非天然のモノマーの組み合わせと同様に機能する、天然の塩基、糖及び糖間（主鎖）連結、非天然修飾モノマー又はその部分を含んで成る化合物（例えば、オリゴヌクレオチド類似体又は模倣物）を包含するが、それらに限定されない。本明細書で使用される場合、「修飾された」又は「修飾」なる用語は、出発の又は天然のオリゴマー化合物、例えばオリゴヌクレオチド、からの任意の置換及び／又は任意の変化を包含する。オリゴヌクレオチドへの修飾は、ヌクレオシド間連結、糖成分、又は塩基成分に対する置換又は変化、例えば本明細書に記載されているもの及び当業界で知られているものを包含する。

10

#### 【0043】

「アンチセンス」は、本明細書で使用される場合、5'から3'の方向に記載して、標的核酸の対応する領域の逆相補体を含み、そして／又は生理的条件下で標的核酸に特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド配列を意味する。したがって、幾つかの態様において、用語「アンチセンス」は、小さい非コードRNA、非翻訳mRNA、及び／又はゲノムDNA配列の対応する領域に逆相補体を含んで成るオリゴヌクレオチドを意味する。特定の態様において、本発明の複合体中のアンチセンスHES - オリゴヌクレオチドは、一旦標的核酸にハイブリダイズした後、標的遺伝子の発現、標的遺伝子のレベル、又は標的核酸によりコードされる蛋白質のレベルの低下を誘導し、又は開始することができる。

20

#### 【0044】

「相補的」は、本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドのモノマー成分と、標的にされる核酸（例えば、DNA、mRNA、及び非 - コードRNA、例えばmiRNA）中のヌクレオチドとの間の、対合（pairing）のための容量を意味する。例えば、オリゴヌクレオチドの或る位置のヌクレオチドが、DNA / RNA分子の同じ位置のヌクレオチドと水素結合することができれば、当該オリゴヌクレオチド及びDNA / RNAはその位置において相補的であると考えられる。

30

#### 【0045】

この発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」は、オリゴヌクレオチドと相補的核酸配列との対合を意味する。このような対合は典型的には水素結合を含み、当該水素結合は、オリゴヌクレオチドの相補的ヌクレオシド又はヌクレオチド塩基（ヌクレオ塩基）と、標的核酸配列との間のWatson-Crick, Hoogsteen又は逆Hoogsteen水素結合であることができる（例えば、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の対応する領域の逆相補的ヌクレオチド配列を含む）。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは標的核酸に特異的にハイブリダイズする。用語「特異的にハイブリダイズする」及び「特異的にハイブリダイズし得る」は、オリゴヌクレオチドと標的核酸（すなわち、DNA又はRNA）との間に安定な且つ特異的な結合が生ずる程度に十分な相補性を示すために、交換可能に使用される。特異的にハイブリダイズし得るためには、オリゴヌクレオチドは、その標的核酸配列に対して100%相補的である必要ないと理解される。

40

#### 【0046】

特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列への当該オリゴヌクレオチドの結合が、当該標的核酸の正常な機能を妨害し、そしてそれからの発現の喪失又は変更された有用性をもたらす場合に、特異的にハイブリダイズし得ると考えられる。好ましい態様において、特異的結合が望まれる条件下（例えば、イン - ビボ測定又は治療の場合の生理的条件下、及びイン - ビトロ測定の場合の測定が行われる条件下）で、不所望の非 - 標的配列へのオリゴヌクレオチドの非 - 特異的結合を回避又は最小にするのに十分な程度の相補性が存在する。最小の非 - 特異的ハイブリダイゼーション事象を伴って標的核酸への特異的ハイブリダイゼーションのために条件が最適である時を日常的に決定することは、十分に当業者のレベルの範囲内にある。

50

## 【0047】

したがって、幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、それが特異的にハイブリダイズする標的DNA又はRNA配列の領域の対応する相補性配列に比べて、1、2又は3つの塩基置換を含む。幾つかの態様において、非-相補的ヌクレオチドの位置は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'又は3'末端である。追加の態様において、非-相補的ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中の内部位置に存在する。オリゴヌクレオチド中に2個又はそれより多くの非-相補的ヌクレオチドが存在する場合、それらは連続的（すなわち連結されている）、非-連続的、又は両方である。幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的核酸内の標的領域に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の配列同一性を有する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸内のポリヌクレオチド配列に対して100%の配列同一性を有する。

10

## 【0048】

パーセント同一性は、それに対してオリゴヌクレオチドは比較される対応する核酸配列に対して同一である塩基の数にしたがって計算される。この同一性は、オリゴマー化合物（すなわち、オリゴヌクレオチド）の全長にわたるか、又はオリゴヌクレオチドの部分内であろう（例えば、オリゴヌクレオチドに対するオリゴヌクレオチドのパーセント同一性を決定するために、27-マーのヌクレオチド1-20が20-マーと比較されるであろう）。オリゴヌクレオチドと標的核酸との間のパーセント同一性は、当業界で知られているアライメントプログラム及びBLASTプログラム（基本的地域的アライメント検索ツール）を用いて決定され得る（例えば、Altschul et al, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656を参照のこと）。

20

## 【0049】

本明細書で使用される場合、用語「標的核酸」及び「標的をコードする核酸」は、標的化され得る任意の核酸を包含するように使用され、限定的ではなく、所与の分子標的（すなわち、蛋白質又はポリペプチド）をコードするDNA、このようなDNAから転写されるRNA（miRNA、pre-mRNA及びmRNAを含む）、及び更にこのようなRNAに由来するcDNAが含まれる。妨害されるべき例示的なDNAの機能には、複製、転写及び翻訳が含まれる。標的核酸の機能に対するこのような妨害の全体的効果は、標的分子の発現の調節である。本発明の文脈において、「調節」は、例えば遺伝子の発現における、量的変化、増加（刺激）又は減少（阻害）の何れか、を意味する。RNAレベルの低下を介しての遺伝子発現の阻害が、本発明に従う調節の好ましい形態である。

30

## 【0050】

「クロモフォア」は、光りの吸収を担当する基、構造、又は分枝である。典型的なクロモフォアは、それぞれ特徴的な吸収スペクトルを有する。

「フルオロフォア」は、特徴的な波長において光を吸収し、そして次に、最も典型的には特徴的に異なる波長において光を再放出するクロモフォアである。フルオロフォアは当業界においてよく知られており、そしてキサンテン（xanthene）、キサンテン誘導体、ロダミン（rhodamine）及びロダミン誘導体、シアニン（cyanine）及びシアニン誘導体、クマリン（coumarin）及びクマリン誘導体、並びにランタニドイオン系列のキレーターを含むが、これ等に限定されない。フルオロフォアは、光りを吸収するが特徴的に再放出しないクロモフォアから区別される。

40

## 【0051】

「H-型励起構造」（HES）は、2又はそれ以上のフルオロフォアであって、それらの遷移双極子が平行配置で配置されており、励起された一重項状態の分裂をもたらすものを意味し、基底状態と高い励起状態との間の遷移が認められると考えられ、そして基底状態と低い励起状態との間の遷移は禁じられると考えられる。或る種のフルオロフォアに関連するHESの形成は当業界で知られており、そして本発明は、オリゴヌクレオチド（例えば、診断的及び治療的オリゴヌクレオチド）へのこれ等のフルオロフォアの取付け、及び得られるHES-オリゴヌクレオチドの、本明細書に記載の方法に従っての使用を含む。本発

50

明の方法に従って使用され得るHES形成フルオロフォアの例は、本明細書に開示され、又は当業界で知られており、そしてキサンテン(xanthene)、キサンテン誘導体、シアニン(cyanine)及びシアニン誘導体、クマリン(coumarin)及びランタニドイオン系列のキレーターを含むが、これ等に限定されない。

【0052】

用語「HES - オリゴヌクレオチド」は、HESを形成する2又はそれより多くのフルオロフォアを含む1又は複数のオリゴヌクレオチド鎖(例えば、同じ、相補的又は異なるオリゴヌクレオチド配列を含む、線状又は環状のオリゴヌクレオチドの1本鎖、2本鎖、3本鎖又はそれより多くの鎖)の複合体を意味する。HES - オリゴヌクレオチドのフルオロフォアは、集合HES - オリゴヌクレオチドが1又は複数のHESを含む限り、1つのオリゴヌクレオチド又は異なる複数のオリゴヌクレオチド内で、5'及び/又は3'主鎖ホスフェート及び/又は他の塩基に取付けることができる。フルオロフォアは、任意には、リンカー、例えば柔軟性脂肪族鎖を介してオリゴヌクレオチドに取付けられる。

10

【0053】

HES-オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、又はそれより多くのHESを含むことができる。更に、HES-オリゴヌクレオチド中のHESは、2、3、4又はそれより多くの同じ又は異なるフルオロフォアを含むことができる。例えば、Toptygin et al, *Chem. Phys. Lett.* 277:430-435 (1997)を参照のこと。幾つかの態様において、HESは、本発明のHES-オリゴヌクレオチド間のフルオロフォア凝集の結果として形成される。幾つかの態様において、HESは、HESを形成することができるフルオロフォアにより単一標識された本発明のオリゴヌクレオチド間のフルオロフォア凝集の結果として形成される。

20

【0054】

本明細書において使用する場合、用語「医薬として許容される」又は「生理的に許容できる」及びこれ等の文法的変形は、それらが組成物、キャリアー、希釈剤及び試薬に関する場合、交換可能に使用され、そして療法的に禁止される不所望の生理的効果、例えば吐気、めまい、急性胃蠕動などを伴わないで、対象(例えば、哺乳類、例えばマウス、ラット、ウサギ、又は靈長類、例えばヒト)に又は対象上に投与することができることを示す。

【0055】

本明細書において使用される場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチドを含んで成る医薬組成物」は、HES-オリゴヌクレオチド複合体及び医薬として許容される希釈剤を含んで成る組成物を意味する。例えば、適当な医薬として許容される希釈剤はリン酸緩衝塩溶液である。

30

【0056】

「修飾の安定化」又は「モチーフの安定化」とは、ヌクレアーゼの存在下で、ホスホジエステルヌクレオシド間連結により連結された2'-デオキシヌクレオシドにより提供される安定化に較べて増強された安定性を提供することを意味する。したがって、このような修飾は、オリゴヌクレオチドに、「増強されたヌクレアーゼ安定性」を提供する。修飾の安定化は、少なくともヌクレオシドの安定化及びヌクレオシド間連結基の安定化を含む。

40

【0057】

用語「イン-ビボ生物」は、再生、成長及び発達のごとき刺激並びに安定な全体としての恒常性の維持が可能な連続生物系を意味する。例には哺乳類、植物、及び微生物、例えば細菌、原生動物及びウイルスが含まれる。

用語「対象」は、任意の動物(例えば、哺乳類)を意味し、特定の処理の受容者であるヒト、非-ヒト靈長類、齧歯類などを含むがこれらに限定されない。典型的には、用語「対象」及び「患者」は、ヒト対象に関しては交換可能に使用される。

【0058】

用語「投与する」及び「投与」は、本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドのごとき化学物質を、イン-ビボ又はエクス-ビボで対象に加えることを意味する。したが

50

って、「投与する」は、対象へのHES - オリゴヌクレオチドの直接的付加、並びに細胞とHES - オリゴヌクレオチド複合体の接触及びこれに続く当該接触された細胞の対象への導入、の両方を含む。1つの態様においては、対象から取り出された細胞がHES - オリゴヌクレオチドと接触され、そして次に当該接触された細胞が対象に再導入される。

【0059】

用語「接触させる」は、化学物質、例えばオリゴヌクレオチドを、イン - ビボ生物、例えば哺乳類、植物、細菌、又はウイルスに加えることを意味する。哺乳類については、接触の一般的経路は、経口（口を通して）、局所（皮膚）、経粘膜（経鼻、頬側／舌下、膣、眼、直腸）、吸入（肺）、経筋（筋肉）及び静脈内（静脈）を含む。細菌及びウイルスについては、接触が宿主生物の細胞又は組織内への送達であろう。

10

【0060】

「処理する」又は「処理」は、症状、併合症、又は疾患の生化学的事象、状態又は障害の開始を回避又は遅延させるため、症状を軽減するため、あるいは疾患、状態又は障害の更なる進行を阻止又は阻害するために、HES - オリゴヌクレオチドを投与することを含む。処理は、予防的（疾患の開始の回避又は遅延、或いはその臨床的又は潜在的症状の顕在化の回避）、或いは疾患、状態又は障害の顕在化後の症状の療法的抑制又は軽減であることができる。処理は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を含む組成物のみを用いてもよく、或いは1、2、3、又はそれより多くの追加の療法剤との組合せであってもよい。

【0061】

用語「療法的有効量」は、所望の療法的結果を達成するため、及び／又は対象における疾患又は障害を「処理する」ために効果的なHES - オリゴヌクレオチド複合体（療法剤）又は他の薬剤の量を意味する。用語「療法的有効量」はまた、疾患の進行の遅延、生存期間の延長、及び／又は疾患の1若しくは複数の症状、もしくは疾患を有する対象における疾患の進行の改善を達成するために要求される量を意味することができる。

20

【0062】

例えば、癌の場合、HES - オリゴヌクレオチド複合体の療法的有効量は、血管新生及び新生血管形成を減少させ、癌細胞の数を減少させ、HES - オリゴヌクレオチド複合体の療法的有効量は、腫瘍のサイズを減少させ、癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害し（すなわち、遅くし又は停止し）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、遅くし又は停止し）、腫瘍の増殖又は腫瘍の発生率を阻害又は遅延し、癌細胞に対する免疫応答を刺激し、そして／又は癌に関連する1又は複数の症状を救済するであろう。

30

【0063】

感染性疾患の場合、HES - オリゴヌクレオチド複合体の療法的有効量は、感染物（例えば、ウイルス負荷）の減少した数に関連し、そして／又は感染物により惹起される感染に関連する1又は複数の症状又は状態の改善に関連するであろう。「療法的有効量」はまた、投与量及び必要な時間において、所望の療法結果を達成するために効果的な量を意味するであろう。本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体の療法的有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別及び体重、並びに対象において所望の応答を惹起するHES - オリゴヌクレオチド複合体の能力、のごとき因子にしたがって変わるであろう。療法的有効量はまた、HES - オリゴヌクレオチド複合体の毒性又は有害効果に比べて、療法的に有利な効果が勝るような量である。

40

【0064】

治療指數（therapeutic index）は、HES - オリゴヌクレオチド複合体の、所望の効果を惹起する投与量に対する不所望の効果を生成する投与量の比率である。本発明の開示の文脈において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、活性が維持されており、しかし不所望の効果が減少したまたは存在しない場合、「改良された治療指數」を示す。例えば、改良された治療指數を有するHES - オリゴヌクレオチド複合体は、不所望の効果、例えば免疫刺激活性をもたらすことなく、又は少なくとも複合体の投与を禁止する程度に不所望の効果をもたらすことなく、miRNA活性を阻害する能力を維持する。

【0065】

50

本明細書で使用される場合、「療法的オリゴヌクレオチド」は、所望の療法結果を達成し、そして／又は十分な量で投与される場合に、又はエクス・ビボで対象における疾患又は障害を「処理する」ことができるオリゴヌクレオチドを意味する。このような好ましい結果には、例えば、疾患の進行を遅らせること、生存時間の延長、及び／又は疾患を有する対象における疾患、疾患の進行、又は疾患関連状態の指標の1又は複数における改善が含まれる。療法的オリゴヌクレオチドの例には、siRNA、shRNA、ダイサー(Dicer)基質(例えば、dsRNA)、miRNA、抗-miRNA、アンチセンス、デコイ(decoy)、アプタマー(aptamer)、及びsiRNA、miRNA、リボザイム(ribozyme)、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は蛋白質コード配列を発現することができるプラスミドが含まれる。所望の療法的結果を達成することができないプローブ及びプライマーのごときオリゴヌクレオチドは、この開示の目的のために療法的オリゴヌクレオチドとは考えられない。

10

## 【0066】

平均して、mRNAの1%未満がアンチセンスオリゴヌクレオチドのための適当な標的である。本発明のHES-オリゴヌクレオチドへの導入のために適当な多くのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、本明細書に記載され、又は当業界において知られている。同様に、適当な療法的オリゴヌクレオチドが、当業界で知られているガイドライン、アルゴリズム及びプログラムを用いて日常的に設計することができる(例えば、Aartsma-Rus et al., Mol Ther 17(3):548-553 (2009)及びReynolds et al., Nat. Biotech. 22(3):326-330 (2004)、並びにZhang et al., Nucleic Acids Res. 31:e72 (2003)を参照のこと、これらの文献のそれぞれの内容が、引用により本明細書に繰り入れられる)。

20

## 【0067】

適当な療法的オリゴヌクレオチドは同様に、商業的に入手可能なプログラムを用いて日常的に設計することができる(例えば、MysirNA-Designer, AsIDesigner (Bioinformatics Research Center, KRIBB)、siRNA Target Finder (Ambion)、Block-iT RNAi Designer (Invitrogen)、Gene specific siRNA selector (The Wistar Institute)、siRNA Target Finder (GeneScript)、siDESIGN Center (Dharmacon)、SiRNA at Whitehead、siRNA Design (IDT)、D: T7 RNAi Oligo Designer (Dudek P and Picard D.)、sfold-software、及びRNAstructure 4.5)；インターネットで入手可能なプログラム、例えばヒトスプライシングファインダーソフトウェア(例えば".umd.be/HSF/")及びTargetfinder ("bioit.org.cn/ao/targetfinder"から入手可能)；及び商業的提供者(例えば、Gene Tools, LLC)を参照のこと)。場合によっては、文脈が特に断らない限り、本明細書において、HES-オリゴヌクレオチド及び療法的オリゴヌクレオチドは相互交換的に使用される。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0068】

【図1a】図1aは、200 μLの緩衝液(PBS)又はダイサー(Dicer)基質の注射の3時間後にBALB/Cマウスから単離された血液細胞のフィールドヒストグラムを示す。後者はこれらのマウスに存在しない遺伝子の配列を含む。細胞は、1.5 mg/kgの濃度でのPBS又はダイサー(Dicer)基質の1回のip注射の後で単離された。

40

【図1b】図1bは、200 μLの緩衝液(PBS)又はダイサー(Dicer)基質の注射の3時間後にBALB/Cマウスから単離された血液細胞のフィールドヒストグラムを示す。後者はこれらのマウスに存在しない遺伝子の配列を含む。細胞は、PBS、1.5 mg/kgの濃度でのダイサー(Dicer)基質、又は0.75 mg/kgの濃度でのダイサー(Dicer)基質、の1回のip注射の後で単離された。

## 【0069】

【図2】図2は、(左欄)放射スペクトル、及び(右欄)相互添加の前(上方の2列)及び後(下列)のRNAのフルオロフォアで標識された各相補的单鎖のhplcクロマトグラムを示す。図の中央欄は、センス鎖のみ(0秒と約80秒の間)及びそれに続くアンチセンス鎖の添加後(約80秒)での蛍光強度を示す。

【図3】図3は、組換えダイサー(Dicer)酵素の添加後の時間の関数としての、RNAの標識されたセンス鎖と標識されたアンチセンス鎖との間で形成された2本鎖の蛍光強度を示

50

す。

【0070】

【図4】図4は、eGFPについてトランスジェニックであるマウスからの単一血液細胞の蛍光強度を示す。対照細胞からのヒストグラムと、eGFPを標的化する2本鎖RNAの曝露された細胞のヒストグラムとが重ねられている。

【発明を実施するための形態】

【0071】

病的状態、例えば癌、感染性疾患、及び神経変性疾患、の検出及び処理のための分子標的は、ユニークなDNA及びRNA配列であることができる。このような標的と相補的配列を含むプローブとの結合、すなわちハイブリダイゼーションとして知られる工程、についての研究は、高い精度及び特異性をもって行われてきており、これ等のデータは現在利用できない処理の開発についての楽観性の基礎を提供した。しかしながら、このような研究の多くは、非生理的条件下で、例えば溶液中で、又は透過性にされた若しくは固定された細胞及び組織において行われてきた。あいにく、生理的条件下で同じプローブが試された場合、透過性障壁、例えば宿主の細胞膜、細胞外マトリクス又は細胞壁の存在と相俟って相補配列のサイズ及び電荷のため、それらの標的接近性がかなり限定され、効率の低下が生じた。したがって、過去10年の間、多くの資源が、イン-ビボで遺伝子の転写及び翻訳を遮断することができるオリゴヌクレオチド配列を送達する方法の開発に向けられた。

10

【0072】

送達方法を開発するために、生物的アプローチ及び化学的アプローチの両方が用いられてきた。例えば、生物的アプローチは、プロモーターにより発現される配列の幾つかのウイルスベクターの作成であり、他方化学に基づく送達ベヒクルは、コレステロール、糖、アプタマー(aptamer)及び抗体を含めての種々の分子と核酸との接合により作製された。しかしながら、最も研究されたイン-ビボ化学的送達系は、脂質二重層から構成される小胞であるリポソーム中に核酸が封入されるナノ粒子を使用した。後者は、増強された安定性を有するポリエチレングリコール(PEG)ポリマーにより修飾される場合、SNALPを称され、そしてときには更に、特定の細胞型上の受容体への標的化のために、ナノ粒子表面上のペプチドリガンドにより更に修飾される。

20

【0073】

上記のアプローチにより若干の成功が達成されたが、次の問題点に遭遇した：ウイルス性送達を用いて、宿主において免疫原性を開始する高い可能性が存在する。更に、ウイルス配列における変異による宿主での変異及び異常な遺伝子発現の危険性をモニターしなければならない。イン-ビボ化学的送達ベヒクルに関しては、あいにく、特異性についての増強された修飾をもってしても、送達が次の点に欠けることが示されている：(1)標的細胞による特異的取込み。むしろ、細綱内皮系の細胞は、食細胞-様過程により、核酸構成物、特にナノ粒子を非特異的に取り込む。(2)所望の細胞の標的化が好結果である場合でさえ、送達ベヒクルを伴う又は伴わないプローブの内在化はしばしば、オリゴヌクレオチドがリソソーム内で止まる細胞のエンドサイトシス系に向けてであり、この場合、化学環境、例えば低pHが、(a)核酸の破壊、又は(b)細胞質中の標的化されるmRNA又は核内のDNAからの隔離をもたらし得る。

30

【0074】

上記の送達ベヒクルに対して、本発明は、従来の送達技法を用いて要求される投与に比べて、療法効果を達成するのに桁違いに少ない投与量を要求する高度に効果的なイン-ビトロ及びイン-ビボオリゴヌクレオチド送達系を提供する。本発明のHES-オリゴヌクレオチド送達ドベヒクルは、配列非依存性であり(例えば、核酸、修飾された核酸、PNA、モルホリノの送達)、そして細胞エンドサイトシス系をバイパスするために受動拡散を利用し、それによりすべての細胞内環境へのアクセスを提供し、そしてオリゴヌクレオチド(例えば、医療的オリゴヌクレオチド、例えばsiRNA、shRNA、ダイサー(Dicer)基質(例えばdsRNA)、miRNA、抗-miRNA、デコイ(decoy)、アプタマー(aptamer)及び例えば細胞質中の標的化RNA又は核中のDNAに対するアンチセンス)の送達を増加させる。

40

50

## 【0075】

特に、好ましい態様において、本発明は、細胞の細胞質及び／又は核及び生物の組織にイン・ビボで注目の核酸配列を送達するために、オリゴヌクレオチド及び2又は複数のHESを形成することができるフルオロフォアを含んで成るHES-オリゴヌクレオチド複合体を用いる。HES-オリゴヌクレオチド送達ベヒクルは、細胞及び生物に対して無毒である。本発明の送達ベヒクルの優れた配列非依存性の細胞膜透過性は、受容体非-依存性態様で膜を通過し、そして生きた細胞の細胞質及び核内の相補的核酸配列へのオリゴヌクレオチドの増加した送達及び標的化を導く、HES-オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの能力を促進する。

## 【0076】

本発明のHES-オリゴヌクレオチド送達系はまた、細菌又はウイルス由来の核酸配列を標的化するためにも用いることができる。更に、本発明のHES-オリゴヌクレオチド送達ベヒクルは、広範囲の診断的及び機能的オリゴヌクレオチドをイン・ビボで細胞に送達する用途を有し、当該オリゴヌクレオチドには、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、ダイサー(Dicer)基質、リボザイム、miRNA、抗-miRNA、アプタマー(aptamer)、デコイ(decoy)、蛋白質コード配列、又は生きた生物中の任意の核酸配列が含まれるが、これらに限定されない。このような生きた生物には、例えば、哺乳類、植物、及び微生物、例えば細菌、原生動物、及びウイルスが含まれる。

## 【0077】

本発明の観点又は態様がマーカッシュ群又は他の代替物の群分けにより記載される場合、本発明は、全体としてリストされる全群のみならず、群の個々の各メンバー及び主群の全ての可能性ある亜群、及びまた、1又は複数のメンバーを欠く主群も含む。本発明はまた、特許請求される群メンバーの任意の1又は複数の明示的排除も予想する。

## 【0078】

「A及び／又はB」の如き句において使用される「及び／又は」なる語は、A及びBの両方；A又はB；Aのみ；Bのみ、を含むことが意図される。同様に、「A、B及び／又はC」の如き句において使用される「及び／又は」なる語は、次の態様：A、B、及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；Aのみ；Bのみ；並びにCのみ、を含むことが意図される。

## 【0079】

本発明のオリゴヌクレオチド複合体中のフルオロフォアは、複合体中でホモ型の又はヘテロ型の同種のフルオロフォアを有するHESを形成することができる、複合体中の任意のフルオロフォアであることができる。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、H-型励起構造を形成することができる2つのフルオロフォアを含む。追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、H-型励起構造を形成することができる3、4、5又はそれより多くのフルオロフォアを含む。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、H-型励起構造を形成することができる約2～20、約2～10、約2～6、又は約2～4のフルオロフォアを含む。追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、H-型励起構造を形成することができる3、4、5又はそれより多くのフルオロフォアを含んでなる。

## 【0080】

2又はそれより多くのフルオロフォアは、それらの集合蛍光が、例えば溶液中約1μM又はそれ以下においてそれらが分離される場合のフルオロフォアの集合蛍光に比べて検出可能に低い場合、HES中で相互に消光(quench)されると言われる。個々のフルオロフォアのスペクトルと比べてのHES吸収スペクトルの最大は、より短い波長にシフト(すなわち、ブルーシフト)されるべき最大の吸収波長を示す。H-型励起構造(以下、「HES」と記す)又は集合体の蛍光強度は、その成分の蛍光強度より低い強度を示す。H-型励起構造又は集合体の、吸収スペクトルのブルーシフト又は蛍光強度挙動の低下の何れかは、シグナルレポーター成分の指標として使用することができる。好ましい態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中の2又はそれより多くのフルオロフォアは、少なくとも5

10

20

30

40

50

0%、好ましくは少なくとも70%。より好ましくは少なくとも80%、そして最も好ましくは少なくとも90%、95%、又は更に少なくとも99%で、増強又は消光する。H-型励起構造を形成することができるフルオロフォアの例には、キサンタン類、シアニン類及びクンマリン類が含まれる。

【0081】

幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、カルボキシロダイン110、カルボキシテトラメチルロダミン、カルボキシロダミン-X、ジエチルアミノクマリン及びカルボシアニン色素から選択されるフルオロフォアを含む。

【0082】

更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、ロダミングリーン (Rhodamine Green) (商標) カルボン酸、サクシンイミジルエステル又は塩酸塩；ロダミングリーン (商標) カルボン酸トリフルオロアセタミド又はサクシンイミジルエステル；ロダミングリーン (商標) -X サクシンイミジルエステル又は塩酸塩；ロドルグリーン (Rhodol Green) (商標) カルボン酸、N,0-ビス-(トリフルオロアセチル) 又はサクシンイミドエステル；ビス-(4-カルボキシペリジニル)スルホンロダミン又はジ(サクシンイミジルエステル)；5-(及び-6)-カルボキシナフトフルオレセイン；5-(及び-6)-カルボキシナフトフルオレセイン；サクシンイミジルエステル；5-カルボキシロダミン6G塩酸塩；6-カルボキシロダミン6G塩酸塩；5-カルボキシロダミン6Gサクシンイミジルエステル；6-カルボキシロダミン6Gサクシンイミジルエステル；5-(及び-6)-カルボキシロダミン6Gサクシンイミジルエステル；5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラプロモスルホンフルオレセインサクシンイミジルエステル又はビス-(ジイソプロピルエチルアンモニウム)塩；5-カルボキシテトラメチルロダミン；6-カルボキシテトラメチルロダミン；5-(及び-6)-カルボキシテトラメチルロダミン；5-カルボキシテトラメチルロダミンサクシンイミジルエステル；6-カルボキシテトラメチルロダミンサクシンイミジルエステル；5-(及び-6)-カルボキシ-X-ロダミン；5-カルボキシ-X-ロダミンサクシンイミジルエステル；6-カルボキシ-X-ロダミンサクシンイミジルエステル；5-(及び-6)-カルボキシ-X-ロダミンサクシンイミジルエステル；5-カルボキシ-X-ロダミントリエチルアンモニウム塩；リッサミン (Lissamine) (商標) ロダミンBスルホニルクロリド；マラカイトグリーンイソチオシアネート；ロダミンレッド (Rhodamine Red) (商標) -X サクシンイミジルエステル；6-(テトラメチルロダミン-5-(及び-6)-カルボキサミド)ヘキサン酸サクシンイミジルエステル；テトラメチルロダミン-5-イソチオシアネート；テトラメチルロダミン-6-イソチオシアネート；テトラメチルロダミン-5-(及び-6)イソチオシアネート；テキサスレッド (Texas Red) (登録商標) スルホニル；テキサスレッド (登録商標) スルホニルクロリド；テキサスレッド (登録商標) -X STPエステル又はナトリウム塩；テキサスレッド (登録商標) -X サクシンイミジルエステル；テキサスレッド (登録商標) -X サクシンイミジルエステル；X-ロダミン-5-(及び-6)-イソチオシアネート；及びカルボシアニン類から成る群から選択されるフルオロフォアを含む。

【0083】

幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、異なるフルオロフォアから形成されるヘテロHESを含む。特定の態様において、ヘテロ-HESは、ロダミン又はロダミン誘導体、及びフルオレセイン又はフルオレセイン誘導体、又は2つのカルボシアニンを含む。更なる態様において、ヘテロ-HESは、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセインサクシンイミジルエステル；5-(及び-6)-カルボキシエオシン；5-カルボキシフルオレセイン；6-カルボキシフルオレセイン；5-(及び-6)-カルボキシフルオレセイン；5-カルボキシフルオレセイン-ビス-(5-カルボキシメトキシ-2-ニトロベンジル)エステル、-アラニン-カルボキサミド、又はサクシンイミジルエステル；5-カルボキシフルオレセインサクシンイミジルエステル；6-カルボキシフルオレセインサクシンイミジルエステル；5-(及び-6)-カルボキシフルオレセインサクシンイミジルエステル；5-(4,6-ジクロロトリアジニル)アミノフルオレセイン；2',7'-ジフルオロフルオレセイン；エオシン-5-イソチオシアネート；エリスロシン-5-イソチオシアネート；6-(フルオレセ

10

20

30

40

50

イン-5-カルボキサミド)ヘキサン酸又はサクシンイミジルエステル；6-(フルオレセイン-5(及び-6)-カルボキサミド)ヘキサン酸又はサクシンイミジルエステル；フルオレセイン-5-EXサクシンイミジルエステル；フルオレセイン-5-イソチオシアネート；及びフルオレセイン-6-イソチオシアネート、から選択されるフルオレセイン又はフルオレセイン誘導体を含む。

【0084】

オリゴヌクレオチド

本発明の文脈において、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)又はこれらの模倣物のオリゴマー又はポリマーを意味する。この用語は、天然ヌクレオ塩基、糖、及びヌクレオシド間共有結合(主鎖)から構成されるオリゴヌクレオチド(すなわち、非-修飾オリゴヌクレオチド)、並びに非-天然ヌクレオ塩基、糖、及び/又はヌクレオシド間結合を有するオリゴマー化合物、及び/又は同様に機能するDNA及び/又はRNAの類似体(すなわち、核酸「模倣物」)を含む。このような模倣オリゴヌクレオチドは、しばしば、例えは核酸標的に対する増強された親和性及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などの好ましい性質のため、天然型を超えて好ましい。

10

【0085】

例えは、本明細書で使用する場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド主鎖の1又は複数のリボース環がモルホリン環により置き換えられているモルホリノ(MNO)、及びヌクレオチド主鎖の1又は複数のリボース環がモルホリン環により置き換えられておりそして負に荷電したサブユニット間結合が荷電を有しないホスホジアミデート結合により置き換えられているホスホジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)を含む。同様に、用語「オリゴヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドの1又は複数の糖リン酸主鎖がアミド含有主鎖に置きかえられているPNAを包含する。この明細書の目的のため、及び時には当業界において言及されるように、そのヌクレオシド間主鎖にリン原子を有しない修飾されたオリゴヌクレオチドもまた、オリゴヌクレオチドであると考えられる。更に、オリゴヌクレオチドはオリゴマーとも称される。

20

【0086】

本発明のHES-オリゴヌクレオチドベヒクルの送達は、配列非-依存性であり、そしてそれ故のHES-オリゴヌクレオチドベヒクルに含まれるオリゴヌクレオチドは、細胞に導入されることが好ましいことが知られている核酸又は模倣物の任意の形態であつてよい。

30

【0087】

HES-オリゴヌクレオチドベヒクル中のオリゴヌクレオチドは、1本鎖、2本鎖、環状又はヘアピン形オリゴヌクレオチドの形態であることができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1本鎖DNA、RNA、又は核酸模倣物(例えは、PMO、MNO、PNA、又は1若しくは複数の修飾されたヌクレオチド、例えは2'OME及びLNAを含むオリゴヌクレオチド)である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2本鎖DNA、RNA、核酸模倣物、DNA/核酸模倣物、2本鎖DNA、DNA/RNA、RNA核酸模倣物である。

【0088】

本発明者らが、驚くべきことに発見したところによれば、HES-オリゴヌクレオチド例えはssDNA及びdsRNAを含む複合体が、従来のオリゴヌクレオチド送達ベヒクルにより要求される投与に比べて数桁少ないオリゴヌクレオチドを必要とする卓越した配列非-依存性細胞内送達を示す。本発明の複合体に含まれる1本鎖核酸の例には、アンチセンス、siRNA、shRNA、リボザイム、miRNA、抗miRNA、トリプレックス形成性オリゴヌクレオチド及びアプタマー(aptamer)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0089】

幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、1本鎖DNA(ssDNA)である。好ましい態様において、ssDNAオリゴヌクレオチドの少なくとも部分は、標的RNAと特異的にハイブリダイズしてオリゴヌクレオチド-RNAの2本鎖を形成する。更なる好ましい態様において、オリゴヌクレオチド-RNAの2本鎖は、RNase開裂メカニズム(例えは、RNase H)に対して感受性である。幾つかの態様において、複合

50

体中の1本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された主鎖連結、少なくとも1つの修飾された糖、及び/又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基（例えば、本明細書に記載のもの）を含んで成る。

【0090】

幾つかの態様において、複合体中の1本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された主鎖連結、少なくとも1つの修飾された糖、及び/又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基（例えば、本明細書に記載のもの）を含んで成り、そしてRNAase開裂メカニズムに対して感受性のオリゴヌクレオチド-RNAの2本鎖を形成することができる。  
特定の態様において、1本鎖オリゴヌクレオチドは、ギャップマー（gapmer）（すなわち、本明細書に記載されているもの、又は当業界で知られているもの）である。追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された主鎖連結、少なくとも1つの修飾された糖、及び/又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基を含んで成り、それは、RNase開裂メカニズム（本明細書に記載されているように）に対するオリゴヌクレオチドの感受性を低下させる。特定の態様において、1本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの2'OME、LNA、MNO又はPNAモチーフを含んで成る。

10

【0091】

本発明者らが驚くべきことに発見したところによれば、2本鎖オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体は、従来のオリゴヌクレオチド送達ベヒクルに比べて、卓越した2本鎖オリゴヌクレオチドの配列非-依存性細胞内送達を示す（やはり、ナノモル及び中程度マイクロモルの範囲で）。本発明の複合体に含まれる2本鎖DNAオリゴヌクレオチドの例には、dsRNAi及びダイサー（dicer）基質及び他のRNAインターフェアランス試薬、及び構造遺伝子及び/又は制御領域及び停止領域に対応する配列が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0092】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、線状2本鎖RNA（dsRNA）である。好ましい態様において、ds-RNAは、RNase開裂メカニズム（例えば、ダイサー（Dicer）及びドロシャ（Drosha）（RNase III酵素））に対して感受性である。追加の態様において、dsRNAは、細胞のRNA誘導サイレンシング複合体（RNA Induced Silencing Complex）（RISC）に挿入されうる。更なる態様において、dsRNAのRNA鎖は、RNA標的の開裂を行なうためにRISC複合体を使用することができる。

30

【0093】

追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、2本鎖オリゴヌクレオチドを含み、当該2本鎖オリゴヌクレオチドでは、一方又は両方のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された主鎖連結、少なくとも1つの修飾された糖、及び/又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基を含む。好ましい態様において、2本鎖オリゴヌクレオチドは、RNase開裂メカニズム（例えば、ダイサー（Dicer）及びドロシャ（Drosha）（RNase III酵素））に対して感受性である。追加の態様において、2本鎖オリゴヌクレオチドは、細胞のRNA誘導サイレンシング複合体（RNA Induced Silencing Complex）（RISC）に挿入されうる。更なる態様において、2本鎖オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド鎖は、RNA標的の開裂を行なうためにRISC複合体を使用することができる。

40

【0094】

更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は3本鎖オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは3本鎖DNA/RNAキメラを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド複合体は、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾された主鎖連結、少なくとも1つの修飾された糖、及び/又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基を含んで成る。特定の態様において、複合体中の少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの2'OME、LNA、MNO及びPNAモチーフを含んで成る。

【0095】

50

HES - オリゴヌクレオチドベヒクル中のオリゴヌクレオチドは、日常的に、線状に調製されるが、連結されることができ、あるいは環状に調製され、そしてまた分枝形成も含まれる。別々のオリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズして2本鎖を形成することができ、当該2本鎖は平滑末端を有することができ、又は1端又は両端にオーバーハンギングを含むことができる。特定の態様において、本発明の複合体に含まれる2本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、dsRNA、及びオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも1つが核酸模倣物である2本鎖オリゴヌクレオチド）は、21～25ヌクレオチドの長さであり、そして1端又は両端に1、2、又は3ヌクレオチドのオーバーハンギングを有する。

【0096】

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、一般に、核酸又は模倣体の特定の形態、及び意図される用途に依存して種々の長さを有することができる。幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中の核酸 / オリゴヌクレオチドは、約5ヌクレオチド～約500ヌクレオチド、そして好ましくは約10ヌクレオチド～約100ヌクレオチドの長さに亘る。

【0097】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的核酸配列に対して相補的である少なくとも8個の連続するヌクレオチド基を含んで成る。種々の関連する態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、約8～約100モノマーサブユニット（ここで、用語「ヌクレオチド」と交換可能に使用される）、又は約8～約50ヌクレオチドの長さを有する。

【0098】

追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、約8～約30ヌクレオチド、約15～約30ヌクレオチド、約20～約30ヌクレオチド、約18～26ヌクレオチド、約19～25ヌクレオチド、約20～25ヌクレオチド、又は約21～25ヌクレオチドの長さを有する。

【0099】

更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49又は50サブユニット（ヌクレオチド）の長さを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、19、20、21、22、23、24又は25ヌクレオチドの長さを有する。

【0100】

特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、21～25ヌクレオチドの長さを有するRNAオリゴヌクレオチドの2本鎖を含み、そしていずれか又は両方の末端に1、2又は3ヌクレオチドのオーバーハンギングを有する。他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、オリゴヌクレオチドの2本鎖を含み、当該オリゴヌクレオチド鎖の少なくとも一方は21～25ヌクレオチドの長さの核酸模倣物であり、そして2本鎖オリゴヌクレオチドは何れか又は両方の末端に1、2又は3ヌクレオチドのオーバーハンギングを有する。

【0101】

修飾を含むオリゴヌクレオチド

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、好ましくは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結、修飾された糖成分及び/又は修飾されたヌクレオチド基を含む。このような修飾されたオリゴヌクレオチド（すなわち、模倣物）は、例えば、増強された細胞取込み、核酸標識に対する増強された親和性、ヌクレアーゼの存在下での増加した安定性、及び/又は増加した阻害活性を含む好ましい性質のため、典型的には天然型を超えて好ましい。

【0102】

修飾されたヌクレオシド間連結

用語「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、ヌクレオシド間主鎖にリ

10

20

30

40

50

ン原子を維持するオリゴヌクレオチド、及びヌクレオシド主鎖にリン原子を有しないオリゴヌクレオチドを意味する。幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド間連結を含んで成る。本発明のオリゴヌクレオチド中の修飾されたヌクレオシド間連結は、例えば、ホスホジエステルヌクレオサイド間連結により提供されるヌクレアーゼ安定性に比べて、オリゴヌクレオチドに対する増強されたヌクレアーゼ安定性を提供することが知られている任意の態様のヌクレオシド間連結を含む。

【0103】

修飾されたヌクレオシド間連結を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子を維持するヌクレオシド間連結、及びリンを含有しないヌクレオシド間連結が含まれる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、修飾されたヌクレオシド間連結及び非 - 修飾のヌクレオシド間連結の間で交代する修飾されたヌクレオシド間連結を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド中のヌクレオシド間連結の殆どが修飾される。更なる態様において、オリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオシド間連結が修飾されている。

10

【0104】

好みしい修飾されたオリゴヌクレオチド主鎖には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホジエステル、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、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネート及びキラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホラミデート、例えば3 - アミノホスホラミデート及びアミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、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、正常3' - 5'連結、これ等の2' - 5'連結類似体を有するセレノホスフェート及びボロノホスフェート、及び1又は複数のヌクレオシド間連結が3' - 3'、5' - 5'、又は2' - 2'連結である逆転した極性を有するものが含まれる。逆転した極性を有する好みしいオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド間連結の最3側に单一3' - 3'連結、すなわち塩基脱落でもよい单一の逆転したヌクレオシド残基（ヌクレオシド塩基が欠けているか又はそれに代えてヒドロキシル基を有する）を含んで成る。種々の塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。

20

【0105】

好みしい態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、少なくとも1個のホスホロチオエート(PS)ヌクレオシド間連結を含み、当該ホスホロチオエート(PS)ヌクレオシド間連結においては、ホスホジエステル結合中の非架橋酸素原子の1つが硫黄により置き換えられている。PSヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドは、通常のワトソン - クリック塩基対を形成し、RNase Hを活性化し、細胞送達のために負の電荷を担持し、そして他の追加の好みしい薬理動態特性を示す。幾つかの態様において、前記少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間連結はホスホロチオエートである。

30

【0106】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオシド間連結の少なくとも2、3、4、5、10又は15は、ホスホロチオエート連結である。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシド間連結の少なくとも1 ~ 10、1 ~ 20、1 ~ 30は、ホスホロチオエート連結である。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシド間連結の少なくとも2、3、4、5、10又は15は、ホスホロチオエート連結である。追加の態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結はホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

40

【0107】

他の適当な、リンを含有する修飾されたヌクレオシド間連結はN3' - P5'ホスホロアミデート(NP)であり、当該N3' - P5'ホスホロアミデート(NP)では、2' - デオキシリボースの3' - ヒドロキシ基が3' - アミノ基により置き換えられている。NPヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドは、相補的RNAに対する高い親和性及びヌクレアーゼに対する耐性を示す。ホスホロアミデートは標的RNAのRNase H開裂を含まないので、これ等の又

50

クレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドは、RNA一体化が維持される必要がある場合、例えばオリゴヌクレオチド調節、mRNAスプライシングの場合に用途を有する。

【0108】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドに含まれるヌクレオシド間連結の少なくとも2、3、4、5、10又は15は、ホスホロアミデート連結である。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシド間連結の少なくとも1～10、1～20、1～30は、ホスホロアミデート連結である。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシド間連結の少なくとも2、3、4、5、10又は15は、ホスホロアミデート連結である。追加の態様において、アンチセンス化合物の各ヌクレオシド間連結はホスホロアミデートヌクレオシド間連結である。

10

【0109】

多くの修飾されたヌクレオシド間連結及びそれらの合成方法が当業界において知られており、そして本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる修飾に包含される。リン含有ヌクレオシド間連結の調製を教示する米国特許の例には、米国特許第3,687,808号、第4,469,863号、第号、第4,476,301号、第5,023,243号、第5,177,196号、第5,188,897号、第5,194,599号、第5,264,423号、第5,276,019号、第5,278,302号、第5,286,717号、第5,321,131号、第5,399,676号、第5,405,939号、第5,489,677号、第5,453,496号、第5,455,233号、第5,466,677号、第5,476,925号、第5,519,126号、第5,527,899号、第5,536,821号、第5,541,306号、第5,550,111号、第5,563,253号、第5,565,555号、第5,602,240号、第5,571,799号、第5,587,361号、第5,625,050号、第5,646,269号、第5,663,312号、第5,672,697号、第5,677,439号、及び第5,721,218号が含まれるが、これらに限定されない。これらの開示のそれぞれを、引用により本明細書に繰り入れる。

20

【0110】

リン原子を含まないオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体もまた本発明に含まれる。このようなオリゴヌクレオチドの例には、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間連結、ヘテロ原子とアルキル又はシクロアルキルとの混合ヌクレオシド間連結、あるいは1又は複数の短鎖ヘテロ原子又はヘテロサイクルヌクレオシド間連結により形成される主鎖を含むものが含まれる。これらの修飾された主鎖には、モルホリノ連結（ヌクレオシドの糖成分から部分的に形成される）；シロキサン主鎖；スルフィド、スルホキシド及びスルホン主鎖；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル主鎖；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル主鎖；リボアセチル主鎖；アルケン含有主鎖；スルファメート主鎖；メチレンイミノ及びメチレンヒドロジノ主鎖；スルホネート及びスルホンアミド主鎖；アミド主鎖；並びに混合N、O、S及びCH<sub>2</sub>成分部分を有するもの、を含むオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0111】

リン原子を含まない主鎖を含むオリゴヌクレオチドの製造方法は当業界で知られており、そして米国特許第5,034,506号、第5,166,315号、第5,185,444号、第5,214,134号、第5,216,141号、第5,235,033号、第5,264,562号、第5,264,564号、第5,405,938号、第5,434,257号、第5,466,677号、第5,470,967号、第5,489,677号、第5,541,307号、第5,561,225号、第5,596,086号、第5,602,240号、第5,608,046号、第5,610,289号、第5,618,704号、第5,623,070号、第5,646,269号、第5,663,312号、第5,633,360号、第5,677,437号、第5,677,439号、第5,792,608号に記載されている方法及び組成物を含むが、これらに限定されない。これらの開示のそれぞれを、引用により本明細書に組み入れる。

40

【0112】

幾つかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、3' - メチレンスルホネート、メチレン（メチルイミノ）（MMIとしても知られる）、モルホリノ、ロックされた核酸、及びペプチド核酸連結から選択される1又は複数の修飾された主鎖連結を含む。修飾された主鎖連結は、均一でもよく、又はRNase H開裂が支持されない限り、他の連結、特にホスホジエステル又はホスホロチオエート連結と交互であってもよい。

【0113】

50

幾つかの態様において、HES複合体は核酸模倣物であるオリゴヌクレオチドを含む。用語「模倣物」は、オリゴヌクレオチドに適用される場合、糖、又は糖及びヌクレオチド間連結の両者がそれに代わる基により置き換えられているオリゴヌクレオチドを含むことが意図される。

【0114】

幾つかの態様において、本発明の複合体は、1又は複数のモルホリノ連結を有するオリゴヌクレオチドを含む。モルホリノのRNase及びヌクレアーゼ耐性特性により、それらが特に細胞での転写を制御するのに有用なものとなる。したがって、幾つかの態様において、モルホリノ単位を含む複合体は遺伝子発現を調節するために使用される。幾つかの態様において、モルホリノ単位はホスホロジアミテートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはホスホロジアミデートモルホリノに対応する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドの各モノマーユニットはホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。追加の態様において、モルホリノオリゴヌクレオチド(例えば、PMO)を含有する複合体は、対象におけるmRNAスプライシングを変更するために使用される。追加の態様において、1又は複数のモルホリヌクレオ塩基、例えばPMOを含む複合体は、アンチセンス剤として使用される。

10

【0115】

追加の態様において、本発明のオリゴヌクレオチド複合体は、ペプチド核酸(PNA)である。PNAは、オリゴヌクレオチドの糖ホスフェート主鎖がアミド含有主鎖により置き換えられている核酸模倣物である。特定の態様において、オリゴヌクレオチドのホスフェート主鎖は、アミノエチルグリシン主鎖により置き換えられており、そしてヌクレオ塩基は、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接に結合している。多くのPNA及びPNAの製造方法が当業界で知られている(例えば、Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-150、並びに米国特許第5,539,082号、第5,714,331号及び第5,719,262号を参照のこと)これらのそれを、引用によりこの明細書に繰り入れる。PNA含有オリゴヌクレオチドは、増加した安定性及び好ましいハイブリダイゼーション動態を提供し、そして非置換対応核酸に比べてDNAより高いRNAに対する親和性を有し、そしてRNase H介在分解を活性化しない。本発明の含まれるPNAは、PNA類似体、例えばオリゴヌクレオチドの1又は複数のモノマー単位のC2( )、例えばD-アミノ酸、又はC5( )、例えばL-アミノ酸(例えば、L-リジン)に正に荷電した基及び/又は1又は複数のキラル拘束立体中心を有する修飾された主鎖を有するPNAを含む。

20

【0116】

PNAオリゴヌクレオチドのRNase及びヌクレアーゼ耐性により、これらは、立体ブロックメカニズムを介しての細胞内でのRNA(例えば、mRNA及びmiRNA)の制御において特に有用なものとなる。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAオリゴヌクレオチドを含んで成る。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAオリゴヌクレオチドを含んで成り、そして染色体2本鎖DNAの鎖侵入により遺伝子発現を調節する。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAオリゴヌクレオチドを含み、そして対象においてmRNAスプライシングを変更する。追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAオリゴヌクレオチド、例えばPMOを含み、そしてアンチセンスとして働く。

30

【0117】

同様に、モルホリノ含有オリゴヌクレオチドのRNase及びヌクレアーゼ耐性により、これらのオリゴヌクレオチドは、立体ブロックメカニズムを介して細胞でのRNA(例えば、mRNA及びimRNA)を制御するのに有用となる。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノオリゴヌクレオチド例えばPMOを含んで成り、そして染色体2本鎖DNAの鎖侵入により遺伝子発現を調節する。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノオリゴヌクレオチド例えばPMOを含んで成り、そして対象においてmRNAスプライシングを変更する。追加の態様において、HE

40

50

S-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノオリゴヌクレオチド例えばPMOを含んで成り、そしてアンチセンスとして働く。

【0118】

更に、二環糖含有ヌクレオチドのRNase及びヌクレアーゼ耐性により、これらのオリゴヌクレオチドは、立体ブロックメカニズムを介して細胞でのRNA（例えば、mRNA及びmiRNA）を制御するのに有用となる。幾つかの態様において、本発明の複合体は少なくとも1つの二環糖含有ヌクレオチドを含む。幾つかの態様において、二環糖含有ヌクレオチドはロックされた核酸（LNA）である。更なる態様において、LNAは糖リングの3'又は4'炭素原子に結合した2'ヒドロキシル基を有する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのロックされた核酸（LNA）を含んで成り、当該ロックされた核酸においては、メチレン（-CH<sub>2</sub>-）<sub>n</sub>基が2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋し、ここでnは1又は2である。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、二環糖含有ヌクレオチド例えばLNAを含んで成り、そして染色体2本鎖DNAの鎖侵入により遺伝子発現を調節する。他の態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの二環糖オリゴヌクレオチド例えばLNAを含み、そして対象におけるmRNAスプライシングを調節する。追加の態様において、HES-オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの二環糖オリゴヌクレオチド、例えばLNA、を含んで成り、そしてアンチセンスとそて働く。

10

【0119】

修飾された糖成分

幾つかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、1又は複数の修飾された糖成分を有する1又は複数のヌクレオシドを含んで成り、当該修飾された糖成分は、天然の又は合成非修飾ヌクレオ塩基に対して、機能的に相互交換可能だとしても、構造的に区別できる。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシド（ユニット）において修飾された糖を含んで成る。

20

【0120】

本発明のオリゴヌクレオチドにおいて有用な糖修飾の例には、OH；F；O-、S-若しくはN-アルキル；又はO-アルキル-O-アルキル（式中、アルキル、アルケニル及びアルキニルは置換されているか又は置換されていないC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アルキル又はC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルケニル又はアルキニルである）から選択される糖置換基を含んで成る化合物が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0121】

代表的な修飾された糖には、炭素環式又は非環式糖、2'、3'又は4'位の1又は複数に置換基を有する糖、糖の1又は複数の水素原子の代わりに置換基を有する糖、及び糖内の他の2つの原子間に結合を有する糖が含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドにおいて有用な2'-糖置換基の例には、OH；F；O-、S-又はN-アルキル；O-、S-又はN-アルケニル；アリル、アミノ；アジド；チオ；O-アリル；O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>；O-、S-又はN-アルキニル；或いはO-アルキル-O-アルキル（アルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換された又は非置換のC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アルキル又はC<sub>2</sub>～C<sub>10</sub>アルケニル及びアルキニルである）が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0122】

特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]mCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、及びO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>（ここで、n及びmは1～約10である）から選択される少なくとも1つの2'-糖置換基を含む。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、C1～C10低級アルキル、置換された低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリール又はO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、RNA開裂基、レポーター基、インターカレーター（intercalator）、薬理動態特性を改良するための基、又はオリゴヌクレオチド化合物の薬力学特性を改良するための基、及び類似の性質を有する他の置換基から選択される少なくとも1つの2'-糖置換

50

基を含む。

【0123】

特定の態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, aka 2'-MOE)置換基を有する少なくとも1つの2'-置換糖を含んで成る。

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、2-アリル(2-CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>)、2'-0-アリル(2'-O-CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、及び2'-アセトアミド(2'-O-CH<sub>2</sub>C(-O)NR<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (ここで、各R<sub>1</sub>は独立にH又はC1-C12アルキルである)から選択される少なくとも1つの2'-修飾ヌクレオシドを含んで成る。

【0124】

更なる態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、2-ジメチルアミノオキシエトキシ(2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基(2'-DMAOE)置換基としても知られる)；2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(2'-O-ジメチルアミノエトキシエチル又は2-DMAEOEとしても知られる)置換基；又は2'-0-メチル(2-O-CH<sub>3</sub>)置換基を有する少なくとも1つの2'-置換糖を含んで成る。更なる態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、2-フルオロ(2-F)置換基を有する少なくとも1つの2'-置換糖を含んで成る。

【0125】

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの二環糖を含む。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのロックされた核酸(LNA)を有し、当該ロックされた核酸(LNA)においては、2'-ヒドロキシリ基が糖環の3'又は4'炭素原子に結合している。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのロックされた核酸(LNA)を有し、当該ロックされた核酸(LNA)においては、メチレン(--CH<sub>2</sub>--)<sub>n</sub>基(nは1又は2)が2'酸素原子と4'炭素原子を架橋している。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、4'及び2'リボシル環原子間に架橋を有する少なくとも1つの二環の修飾されたヌクレオシドを含み、ここで、当該架橋は、4'-(CH<sub>2</sub>)-0-2'(LNA)；4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'；4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-0-2'(ENA)；4'-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-0-2'；4'-CH(CH<sub>3</sub>)-0-2'；4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-0-2'；4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2'；4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2'；4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-0-2'；4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2'及び4'-CH<sub>2</sub>-C(-CH<sub>2</sub>)-2'から選択され、ここで、Rは独立に、H、C1-C12アルキル、又は保護基である。

【0126】

本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドはまた、少なくとも1つの前記の糖構成及び追加のモチーフ、例えば-L-リボフラノース、-D-リボフラノース又は-L-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-0-2')を有することができる。更に、本発明のオリゴヌクレオチドにおいて有用なLNA及びその調製は当業界において知られている。例えば、米国特許第6,268,490号、第6,670,461号、第7,217,805号、第7,314,923号及び第7,399,845号；WO 98/39352及びWO 99/14226；並びにSingh et al, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456を参照のこと。これらの文献のそれぞれに内容を引用により本明細書に組み入れる。

【0127】

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、化学的に修飾されたフラノシリル(例えば、リボフラノース)環成分を含んで成る。化学的に修飾されたリボフラノース環の例には、置換基(5'及び2'置換基、そして特に二環核酸(BNA)を形成するための非-L-ゼミナル還原子を架橋する2'位置を含めて)の付加、S、N(R)、又はC(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(R-H、C1-C12アルキル又は保護基によるリボシル環原子の置き換え、及びこれ等の組み合わせを含むが、これらに限定されない。化学的に修飾された糖の例には、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド(例えば、WO 2008/101157は特に5',2-ビス置換ヌクレオシドを開示した)又はSによるリボシル環酸素原子の置換及び2'-位における更なる置換(例えば、US20050130923を参照のこと)、或いはBNAの5'-置換(WO 2007/134181、ここでLNAは例えば5-メチル又は5-ビニル基により置換される)が含まれる。

【0128】

10

20

30

40

50

3'末端ヌクレオシド上の糖の3'位又は2'-5'結合オリゴヌクレオチド及び5'-末端ヌクレオチドの5'位における上記の修飾に類似する修飾を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含んで成るオリゴヌクレオチドを含む複合体も本発明に含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる2'-修飾ヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許には、第5,118,800号、第5,319,080号、第5,359,044号、第5,393,878号、第5,446,137号、第5,466,786号、第5,514,785号、第5,519,134号、第5,567,811号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、第5,700,920号、及び第5,792,747号が含まれるが、これ等に限定されない。これらのそれぞれを、引用により本明細書に組み入れる。

## 【0129】

10

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの複素環二環核酸を有する。例えば、幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのENAモチーフを有する（例えば、WO 01/49687を参照のこと、この内容を引用により、本明細書に組み入れる）。

## 【0130】

追加の態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、6員環による5員フランノースの少なくとも1つの置換を有する。少なくとも1つの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのシクロヘキセン核酸（CeNA）を有する。これらは、相補的DNA又はRNAと安定な2本鎖を形成し、そしてオリゴヌクレオチドを核酸分解から保護する。

20

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの三環DNA（tcDNA）を有する。

## 【0131】

特定の態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート主鎖、及びヘテロ原子主鎖、例えば--CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--（メチレン（メチルイミノ）又はMMI主鎖としても知られる）、--CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--、--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--及び--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--並びにアミド主鎖を含む（例えば、米国特許第5,602,240号を参照のこと）。追加の態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、ホスホロジアミデート主鎖構造を有する。更なる態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、ホスホロジアミデートモルホリノ（すなわち、PMO）主鎖構造を有する（例えば、米国特許第5,034,506号を参照のこと、その内容を引用により本明細書に繰り入れる）。

30

## 【0132】

修飾されたヌクレオ塩基

本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドはまた、天然の又は合成された非修飾のヌクレオ塩基と比べて機能的に相互交換可能であるが、構造的に区別できる1又は複数のヌクレオ塩基修飾を含むことができる。

## 【0133】

用語「非修飾」又は「天然」ヌクレオチド塩基は、本明細書で使用される場合、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を含む。修飾されたヌクレオ塩基には、合成及び天然のヌクレオ塩基、例えば5-メチルシトシン（5-me-C）が含まれる。幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの5'メチルシトシン又はC-5プロピンを含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド中の各シトシンはメチルシトシンである。

40

## 【0134】

修飾されたヌクレオ塩基はまた、複素環塩基成分と称され、そして他の合成の又は天然のヌクレオ塩基、例えばキサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5

50

- ハロウラシル及びシトシン、5 - プロピニル(--CC--CH<sub>3</sub>)ウラシル及びシトシン、及びピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6 - アゾ - ウラシル、シトシン及びチミン、5 - ウラシル(シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシ及び他の8 - 置換アデニン及びグアニン、5 - ハロ特に5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチル及び他の5 - 置換ウラシル及びシトシン、7 - メチルグアニン及び7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニン及び8 - アザアデニン、3 - デアザグアニン及び3 - デアザアデニンが含まれる。

【0135】

本発明のオリゴヌクレオチドに含まれる複素環塩基成分はまた、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環により置き換えられているもの、例えば7 - デアザアデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び2 - ピリドンが含まれる。本発明のオリゴヌクレオチドの結合親和性を増強するために特に有用なヌクレオ塩基には、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン、並びにN-2, N-6及びO-6置換プリン、例えば2アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル及び5 - プロピニルシトシンが含まれる。

【0136】

本発明のオリゴヌクレオチドに任意に含まれる追加の修飾されたヌクレオ塩基には、三環ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン(phenoxyazine cytidine)(IH-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(phenothiazine cytidine)(IH-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、G - クランプス(G-clamps)、例えば置換されたフェノキサジンシチジン(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)、又はグアニジウムG - クランプス及び類似体が含まれるが、これらに限定されない。代表的なグアニジノ置換基は米国特許第6,593,466号に開示されており、その記載を引用により本明細書に組み入れる。代表的なアセタミド置換基は米国特許第6,147,200号に開示されており、その記載を引用により本明細書に組み入れる。

【0137】

本発明の複合体に含まれるオリゴヌクレオチドに包含される多くの修飾されたヌクレオ塩基及びそれらの合成方法は当業界において知られており、例えば、The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering, 858-859頁, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, 289-302頁; Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993; 並びに米国特許第3,687,808号、第4,845,205号、第5,130,302号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,434,257号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,121号、第5,596,091号、第5,614,617号、第5,645,985号、第5,646,269号、第5,681,941号、第5,750,692号、第5,830,653号、第5,763,588号、第6,005,096号、第6,028,183号、第6,007,992号、米国特許公開第20030158403号に開示されている修飾されたヌクレオ塩基が含まれ、これらの開示のそれぞれを引用により本明細書に繰り入れる。

【0138】

キメラオリゴヌクレオチド

本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド間結合、修飾された糖成分、及び/又は修飾されたヌクレオ塩基を含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはキメラオリゴヌクレオチド(例えば、キメラオリゴマー化合物)である。用語「キメラオリゴヌクレオチド」又は「キメラ」は、少なくとも2つの化学的に区別される領域(すなわち、オリゴヌクレオチドの長さに沿って配置された化学的に修飾されたサブユニットのモチーフのパターン及び方向)を含むオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドであり、当該領域のそれぞれは少なくとも1つのモノマーユニット、すなわち核酸をベースとするオリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチド又はヌクレオシドから作られている。キメラオリゴヌクレオチドはまた、例えばハイブリド（例えば、融合）及びギャップマー（gapmer）とも称されている。このようなキメラオリゴヌクレオチド構造の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第5,013,830号、第5,149,797号、第5,220,007号、第5,256,775号、第5,366,878号、第5,403,711号、第5,491,133号、第5,565,350号、第5,623,065号、第5,652,355号、第5,652,356号、及び第5,700,922号が含まれるが、これらに限定されない。これらのそれぞれを引用により本明細書に組み入れる。

## 【0139】

キメラアンチセンス化合物は典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性、増加した細胞取込み、標的核酸に対する増加した結合親和性、及び／又は増加した阻害活性を付与するために修飾された少なくとも1つの領域を含む。例えば、ギャップマー（gapmer）は、3つの領域、すなわち2つの外部領域（ウイング）に挟まれた中央領域（ギャップ）、に分けられるヌクレオシドの連続配列を含んで成るキメラオリゴマーである。ギャップマーデザインは、典型的には、RNase Hのための基質として機能する約5～10の連続する2'-デオキシヌクレオチドの中央領域を含み、典型的には、2'修飾オリゴヌクレオチドの1又は2つの領域と接して（挟まれて）おり、当該2'修飾オリゴヌクレオチドの領域は、増強された標的RNA結合親和性を提供するが、標的RNA分子のRNase H開裂を支持しない。

## 【0140】

したがって、キメラが使用される場合、例えば、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシリボヌクレオチドに比べて、基質領域を有するより短いオリゴヌクレオチドを用いて匹敵する結果を得ることがしばしば可能である。他のキメラオリゴヌクレオチドは、他の領域に比べて増加した又は低下した親和性の何れかを示す修飾されたヌクレオシドの領域を含む標的についてのオリゴヌクレオチドの長さにわたる変更された結合親和性を提供する領域に頼る。いわゆる、MOE-ギャップマーは、ウイング中に2'-MOE修飾を有し、しばしば完全なPS主鎖を含み、そしてしばしばすべてのシトシン上に5'MeC修飾を含む。

## 【0141】

或いは、RNAプロセシングの調節におけるように、RNase H活性が好ましくない状況について、均一に修飾されたオリゴヌクレオチド、例えば各ヌクレオチド又はヌクレオシド位置におけるRNase H活性を支持しない修飾されたオリゴヌクレオチドを用いるデザイン、を用いるのが好ましいであろう。本発明において用いる場合、「十分に修飾されたモチーフ」は、本質的に各ヌクレオシドが同じ修飾された糖成分を有するように修飾されている糖修飾ヌクレオシドの連続する配列を含むことを意味する。本発明の十分に修飾されたオリゴヌクレオチドについて好ましい糖修飾ヌクレオシドには、2'-フルオロ(2F)、2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (2'-MOE)、2'-OCH<sub>3</sub> (2'-O-メチル)、及び二環糖修飾ヌクレオシドが含まれるがこれらに限定されない。1つの観点において、3'及び5' - 末端ヌクレオシドは修飾されないで残される。好ましい態様において、修飾されたヌクレオシドは、2-MOE、2'-F、2'-O-Me又は二環糖修飾ヌクレオシドである。

## 【0142】

本発明の組成物において使用されるオリゴヌクレオチドは、1又は複数の安定化基を有するように修飾され得る。幾つかの態様において、安定化基は、ヌクレアーゼ安定性のような性質を増強するためにオリゴヌクレオチドの1端又は両端に取付けられる。幾つかの態様において、安定化基はキャップ構造である。「キャップ構造又は末端キャップ成分」は、オリゴヌクレオチドの何れかの末端に導入されている化学的修飾を意味する（例えば、WO 97/26270を参照のこと、この記載を引用により、本明細書に組み入れる）。これらの末端修飾は、末端核酸分子を有するオリゴヌクレオチドをエキソヌクレアーゼ分解から保護し、そして／又は細胞におけるオリゴヌクレオチドの送達及び／又は局在化を助けるであろう。オリゴヌクレオチドは、5' - 末端 (5' - キャップ)、3' - 末端 (3' - キャ

10

20

30

40

50

ップ)、又は5'-末端及び3'-末端の両方にキャップを含むことができる。2本鎖オリゴヌクレオチドの場合、キャップは、いずれかの鎖のいずれかの末端又は両端に存在することができる。キャップ構造は当業界において知られており、そして例えば、反転デオキシ塩基脱落キップ (*inverted deoxy abasic cap*) を含む。更に、ヌクレアーゼ安定性を付与するためにオリゴヌクレオチド(例えば、アンチセンス)化合物の一端又は両端をキャップするために使用することができる3'及び5'-安定化基には、WO 03/004602に開示されているものが含まれ、その記載を、引用により本明細書に組み入れる。

#### 【0143】

幾つかの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの5'-キャップには、反転塩基脱落残基 (*inverted abasic residue*) (成分) である構造、4',5'-メチレンヌクレオチド；I-( -D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4-チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド；1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド； -ヌクレオチド；修飾された塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート結合；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環式3',4'-セコヌクレオチド；非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；非環式3,5-ジヒドロキシベンチルヌクレオチド；3-3'-反転ヌクレオチド成分；3'-3'-反転塩基脱落成分；3'-2'-反転ヌクレオチド成分；3-2'-反転塩基脱落成分；1,4-ブタンジオールホスフェート；3'-ホスホラミデート；ヘキシルホスフェート；アミノヘキシルホスフェート；3'-ホスフェート；3'-ホスホロチオエート；ホスホロジチオエート；又は架橋若しくは非架橋メチルホスホネート成分(例えば、WO 97/26270を参照のこと、その記載を引用により本明細書に組み入れる)が含まれる。

10

20

30

#### 【0144】

幾つかの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体に含まれるオリゴヌクレオチドの5'-キャップには、例えば、4',5'-メチレンヌクレオチド；I-( -D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド；4'-チオヌクレオチド、炭素環ヌクレオチド；5'-アミノ-アルキルホスフェート；I,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート；6-アミノヘキシルホスフェート；1,2-アミノドデシルホスフェート；ヒドロキシプロピルホスフェート；1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド；L-ヌクレオチド； -ヌクレオチド；修飾された塩基ヌクレオチド；ホスホロジチオエート；スレオ-ペントフラノシルヌクレオチド；非環式3',4'-セコヌクレオチド；3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド；3,5-ジヒドロキシベンチルヌクレオチド、5'-5'-反転ヌクレオチド成分；5'-5'-反転塩基脱落成分；5'-ホスホロアミデート；5'-ホスホロチオエート；1,4-ブタンジオールホスフェート；5'-アミノ；架橋及び/又は非架橋5'-ホスホラミデート、ホスホロチオエート及び/又はホスホロジチオエート、架橋又は非架橋メチルホスホネート及び5'-メルカプト成分(更に、Beaucage et al, 1993, *Tetrahedron* 49: 1925により開示されている安定化基を参照のこと、この記載を引用により、本明細書にくみ入れる)が含まれる。

#### 【0145】

幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、1又は複数のカチオンテイル (cationic tail) を含んで成る。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4又はそれより多くの正に荷電したアミノ酸、例えばリジン又はアルギニンと接合している。特定の態様において、オリゴヌクレオチドはPNAであり、そして1又は複数のリジン又はアルギニンが当該分子のC-末端に接合している。更なる態様において、オリゴヌクレオチドはPNAであり、そして1~4のリジン及び/又はアルギニンがPNA連結に接合している。

40

#### 【0146】

1つの態様において、そのような修飾されたオリゴヌクレオチドは、従来的に、接合基を官能基、例えばヒドロキシル又はアミノ基に取付けることにより調製される。通常の接合基には、インターラーカー、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、及びオリゴヌクレオチドの薬理動態特性又は薬力学特性を

50

増強する基が含まれるが、これらに限定されない。典型的な接合基には、コレステロール、炭水化物、ビオイン、フェナジン、フォレート、フェナンスリジン及びアンスラキノンが含まれる。代表的な接合基は、WO/1993/007883及び米国特許第6,287,860号に開示されており、これらを引用により本明細書に組み入れる。

【0147】

接合基は、オリゴヌクレオチドの種々の位置に、直接に又は任意の連結基を介して結合させることができる。用語「連結基」は、オリゴマー化合物への接合基の取付けを許容するすべての基を含むことが意図される。連結基は、化学的官能基、接合基、レポーター基及びその他のを、親化合物、例えばオリゴマー化合物の選択的部位に取付けるために有用な2価基である。一般に、2官能連結成分は、2個の官能基を有するヒドロカルビル成分を含んで成る。官能基の一方は、親分子又は注目の化合物に結合するために選択され、そして他方は本質的に任意に選択された基、例えば化学的官能基又は接合基に結合するために選択される。幾つかの態様において、リンカーは、鎖構造、又は反復基、例えばエチレングリコール又はアミノ酸ユニットのオリゴマーを含んで成る。2官能連結成分において日常的に使用される官能基の例には、求核性基と反応するための求電子剤、及び求電子性基と反応するための求核剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0148】

幾つかの態様において、2官能連結成分は、アミノ、ヒドロキシ、カルボン酸、チオール、不飽和(例えば、二重結合又は三重結合)、などを含む。2官能連結成分の若干の非限定的な例には、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、サクシンイミジル4-(N-稀イミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)及び6-アミノヘキサン酸(AH EX又はAHA)が含まれる。他の連結基には、置換されたC<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>アルキル、置換された又は非置換のC<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルケニル、又は置換された又は非置換のC<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>アルキニルが含まれるがこれらに限定されず、ここで、好ましい置換基の非限定的なリストには、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルが含まれるが、これらに限定されない。更なる代表的な連結基は、例えば、WO 94/01550及びWO 94/01550に開示されている。

【0149】

上記のようなオリゴヌクレオチド接合体の調製を教示する代表的な米国特許には、米国特許第4,828,979号、第4,948,882号、第5,109,124号、第5,118,802号、第5,218,105号、第5,414,077号、第5,486,603号、第5,525,465号、第5,541,313号、第5,545,730号、第5,552,538号、第5,578,717号、第5,580,731号、第5,580,731号、第5,591,584号、第5,512,439号、第5,578,718号、第4,587,044号、第4,605,735号、第4,667,025号、第4,762,779号、第4,789,737号、第4,824,941号、第4,835,263号、第4,876,335号、第4,904,582号、第4,958,013号、第5,082,830号、第5,112,963号、第5,214,136号、第5,245,022号、第5,254,469号、第5,258,506号、第5,262,536号、第5,272,250号、第5,292,873号、第5,317,098号、第5,371,241号、第5,391,723号、第5,416,203号、第5,451,463号、第5,510,475号、第5,512,667号、第5,514,785号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,595,726号、第5,597,696号、第5,599,923号、第5,599,928号、第5,688,941号及び第6,1 14,513号、並びに米国出願公開第2012/0095075号、第2012/01 01 148号及び第2012/0128760号が含まれるがこれらに限定されない。これらのそれぞれの全内容を、引用により、本明細書に組み入れる。

【0150】

追加の関連する態様において、本発明は、HES-オリゴヌクレオチド複合体及び/又はHES-オリゴヌクレオチド複合体を含みそして更に1又は複数の活性剤又は療法剤を含む医薬組成物を含む。1つの態様において、活性剤又は療法剤は核酸である。種々の態様において、核酸は、プラスミド、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー(dicer)基質、デコイ(decoy)、アプタマー(aptamer)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はリボザイム(ribozyme)である。

10

20

30

40

50

## 【0151】

オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチド及びホスホラミデートは、当業界においてよく確立されている方法により、合成及び／又は修飾することができる。修飾された及び非修飾のヌクレオシドのオリゴマー化は、適当であれば合成について、DNA - 様化合物 (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) 及び／又はRNA - 様化合物 (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al, Tetrahedron 57:5707-5713 (2001),) について、文献の方法により行うことができる。 (更に、Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage, S. L. et al (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., USA, を参照のこと、それらの記載を引用により本明細書に組み入れる。)

10

## 【0152】

オリゴヌクレオチドは好ましくは、適切に保護された試薬及び商業的に入手可能なオリゴヌクレオチド合成機を用いて化学的に合成される。本発明のオリゴヌクレオチドの製造において有用なオリゴヌクレオチド合成試薬の提供者には、Proligo (ハンブルグ、ドイツ)、Dharmacon Research (Lafayette, CO, 米国)、Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, IL, 米国)、Glen Research (Sterling, VA, 米国)、ChemGenes (Ashland, MA, 米国)、及びCruachem (Glasgow, 英国) が含まれるが、これらに限定されない。或いは、オリゴマーは種々のオリゴマーヌクレオチド合成会社、例えばDharmacon Research Inc., (Lafayette, Colo.)、Qiagen (Germantown, MD)、Proligo 及びAmbion から購入することができる。

20

## 【0153】

或る態様において、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドの調製は、DNAについて文献 : Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Agrawal, Ed., Humana Press, 1993, RNA: Scaringe, Methods, 2001, 23, 206-217 ; Gait et al, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Smith, Ed., 1998, 1-36 ; Gallo et al, Tetrahedron, 2001, 57, 5707-5713、の方法に従って行われる。固相合成のための追加の方法は、米国特許第4,415,732号、第4,458,066号、第4,500,707号、第4,668,777号、第4,725,677号、第4,973,679号、及び第5,132,418号、並びに再発行特許第34,069号に見出されよう。

30

## 【0154】

使用される特定のプロトコールに拘わらず、本発明に従って使用されるオリゴヌクレオチドは、固相合成のよく知られた技法をとおして従来通りにそして日常的に作ることができる。このような合成の装置は、例えば、Gene Forge (Redwood City, Calif.) を含めて、幾つかの売り手により販売されている。自動合成技法を含めて、適当な固相技法が、Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, New York, 1991に記載されている。上記に方法に加えて又はそれに代えて(液相合成を含めて)上記のような合成のための他の手段が当業界において知られている。

40

## 【0155】

二環糖修飾モノマー、アデニン、シトシン、グアニン、5 - メチル - シトシン、チミン及びウラシルの合成及び調製、並びにそれらのオリゴマー化、及び核酸認識特性は記載されている (Koshkin et al, Tetrahedron, 54:3607-3630 (1998) ; WO 98/39352 及びWO 99/14226)、これのそれぞれの内容を引用により本明細書に繰り入れる)。他の二環糖修飾ヌクレオシド類似体、例えば4'-CH<sub>2</sub>--S-2'類似体もまた調製されている (Kumar et al, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼの基質としてのオリゴデオキシリボヌクレオチド2本鎖を含む他の二環糖類似体の調製も記載されており (WO 98-DK393 19980914) これらのそれぞれの内容を引用により本明細書に組み入れる。

## 【0156】

50

フルオロフォアをオリゴヌクレオチドに連結する技法、例えば本発明の方法に従って使用される技法は当業界においてよく知られており、そして本発明のHES - オリゴヌクレオチドを調製するために使用することができ、又は日常的に改変することができる。例えば、Connolly et al, Nucleic Acids Res. 13:4485-4502 (1985) ; Dreyer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9752-9756 (1989) ; Nelson et al, Nucleic Acids Res. 17:7187-7194 (1989) ; Sproat et al, Nucleic Acids Res. 15, 6181-6196 (1987) 及びZuckerman et al, Nucleic Acids Res. 15:5305-5321 (1987) を参照のこと。これらのそれぞれの内容を引用により、本明細書に組み入れる。多くのフルオロフォアは通常、適当な反応性部位を有する。或いは、フルオロフォアを誘導体化して他の分子への連結のための反応性部位を提供することができる。第2の分子にカップリングするための官能基により誘導体化されたフルオロフォアは、種々の製造者から商業的に入手することができる。誘導体化は、フルオロフォア自体上の基の単純な置換によつてもよく、又はリンカーとの接合によつてもよい。

10

#### 【0157】

フルオロフォアは、所望により、リンカーを介して、オリゴヌクレオチドの5'及び/又は3'末端主鎖ホスフェート及び/又は他の塩基に結合される。種々の適当なリンカーが当業界において知られており、そして/又は下に検討する。幾つかの態様において、リンカーは、柔軟な脂肪族リンカーである。追加の態様において、リンカーは、C1~C30の線状又は分枝状の飽和又は不飽和の炭化水素鎖である。幾つかの態様において、リンカーは、C1~C6の線状又は分枝状の飽和又は不飽和の炭化水素鎖である。追加の態様において、炭化水素鎖リンカーは、1又は複数のヘテロ原子、アリール、又は低級アルキル、ヒドロキシアルキル又はアルコキシにより置換される。

20

#### 【0158】

幾つかの態様において、1又は複数の、フルオロフォアで修飾されたヌクレオシド、フルオロフォア及び糖/塩基/及び/又は連結で修飾されたヌクレオシド及び/又はデオキシヌクレオシドホスホラミデートを用いて、自動合成の間に、1又は複数のフルオロフォアがオリゴヌクレオチドに導入される。

30

#### 【0159】

幾つかの態様においては、合成後標識化反応において、1又は複数のフルオロフォアがオリゴヌクレオチドに導入される。適切な合成後標識化反応は当業界において知られており、そして本発明のHES - オリゴヌクレオチドを合成するために日常的に使用し、又は改変することができる。幾つかの態様においては、合成後標識化反応において、1又は複数のフルオロフォアがオリゴヌクレオチドに導入され、この場合、合成されたオリゴヌクレオチド中のアミノ-又はチオール修飾されたヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドが、アミン-又はチオール-反応性フルオロフォア、例えばサクシンイミジルエステルフルオロフォアと反応する。

30

#### 【0160】

更なる態様においては、1又は複数の同一のフルオロフォアが单一反応においてオリゴヌクレオチドに一体化され、当該单一反応は、色素の反応性形を、フルオロフォアと反応することができる所望の数の反応性基を含むオリゴヌクレオチドと、適当な緩衝液中で、オリゴヌクレオチドへのフルオロフォアの一体化を完成するのに十分な条件下で且つ時間にわたって、接触させることを含む。反応性基は、当業界で知られている標準的技法及び試薬を用いる合成の間に、日常的に、オリゴヌクレオチドに導入することができる。

40

#### 【0161】

##### 製剤

HES - オリゴヌクレオチドは、所望により、医薬組成物の調製のために適当な、医薬として許容される希釈剤又は担体、医薬として許容される活性な又は不活性な物質と混合される。したがって、本発明はまた、HES - オリゴヌクレオチド複合体を含む医薬組成物を包含する。医薬組成物の製剤化のための組成物及び方法は、投与の経路、疾患の程度、又は投与量を含むがこれらに限定されない基準の数に依存する。このような考慮は、当業界

50

においてよく理解される。

【0162】

粘膜又は局所送達のためのHES - オリゴヌクレオチドの投与量は、典型的には、投与当たり約0.1 μg ~ 50mgの範囲にわたり(例えば、AVI-4658(モルホリノ)の如きエキソキッピング薬の場合、試験投与量は30 mg/kg及び50 mg/kg wk IVの薬物の投与を含む)、用途に依存して、毎日、毎週、又は毎月、及び任意の他の時間間隔である。しかしながら、投与は実質的により高い又はより低い範囲であることができる。適切な投与ハ範囲及び頻度の決定は、当業者の能力の範囲内である。所与の量の投与は、個々の投与量の形態で又は数回のより少ない投与単位の両方で行なうことができる。

【0163】

HES - オリゴヌクレオチド複合体を含んで成る医薬組成物は、任意の医薬として許容される塩、エステル、又はそのようなエステルの塩、あるいは任意の他のオリゴヌクレオチドであって、対象、例えばマウス、ラット、ラビット又はヒトに投与後に生物学的に活性な代謝物又はその残物を(直接的に又は間接的に)提供することができるものを含む。したがって、例えば、開示はまた、HES - オリゴヌクレオチド複合体の生理的に及び医薬として許容される塩(すなわち、親化合物の所望の生物活性を維持し、そしてそれに対して不所望の毒性効果を付与しない塩)、プロドラッグ、当該プロドラッグの生理的に及び医薬として許容される塩、及び他の生物同等物にも向けられる。

【0164】

適切な医薬として許容される塩には、

(a) カチオン類、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ポリアミン類、例えばスペルミン及びスペルミジン、等と共に形成される塩類；

(b) 無機酸、例えば塩酸、臭素水素酸、硫酸、リン酸、硝酸、等と共に形成される酸付加塩類；

(c) 有機酸、例えば酢酸、亜酸、酒石酸、琥珀酸、マレイン酸、フマル酸、グルタル酸、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、ポリガラクチュロン酸、等と共に形成される塩類；並びに

(d) 元素性アニオン、例えば塩素、臭素及び沃素から形成される塩類；

が含まれるが、それらに限定されない。

プロドラッグには、例えば、オリゴヌクレオチドの一端又は両端に追加のヌクレオシドを導入したものであって、体内の内因性ヌクレアーゼにより開裂されて活性なオリゴヌクレオチドを形成するもの、が含まれる。

【0165】

幾つかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグバージョンは、WO 93/24510及びWO 94/26764に開示されている方法にしたがって、SATE [(S-アセチル-2-チオエチル)ホスフェート]誘導体として調製される。

本発明の文脈において、医薬として許容される希釈剤には、リン酸緩衝塩溶液(PBS)が含まれる。PBSは、組成物中の使用に適する希釈剤である。

本発明の医薬組成物には、溶液及び製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、前形成された液体を含むがそれに限定されない種々の化合物から生成され得る。

【0166】

医薬組成物は、従来どおり単位投与形として提供することができ、そして医薬工業においてよく知られている従来法に従って調製することができる。このような技法は、活性成分を医薬希釈剤又は担体と一緒にすることを含む。一般に、製剤は、活性成分を、液体担体若しくは最終的に分けられた固体担体又はその両方に均一に且つ直接に一緒にし、そして次に必要であれば製品を成型することにより調製される。

【0167】

10

20

30

40

50

医薬組成物は、錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、座薬、及び浣腸剤を含むがこれ等に限定されない多くの可能な剤形の何れかに製剤化することができる。組成物はまた、液体又は混合媒体中懸濁液として製剤化することができる。水性懸濁液は更に、懸濁液の粘度を増強する物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール及び/又はデキストランを含有することができる。懸濁液は更に1又は複数の安定剤を含むことができる。

#### 【0168】

本明細書において使用される場合、用語「投与量」は、单一投与において提供される薬物剤の特定の量を意味する。或る態様において、投与量は、1又は複数のボーラス、錠剤又は注射として投与される。例えば、皮下投与が好ましくそして所望の投与量が单一注射によっては容易に得られない体積を必要とする或る態様において所望の投与量を達成するために、2回又はそれより多くの注射が使用される。或る態様においては、或る態様において、個体の注射部位の反応を最小にするために、投与量は、1又は複数の注射において投与される。

10

#### 【0169】

##### 投与

本発明はまた、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体を含む医薬組成物又は製剤を包含する。本発明の方法は、医学的に許容される投与の任意の態様を用いて実施することができ、こので任意の態様とは、臨床的に許容できない不都合の効果（すなわち、HES-オリゴヌクレオチド複合体の投与を禁ずる程度の不所望の効果）を惹起することなく療法的効果をもたらす態様である。本発明の医薬組成物は、局所処理又は全身処理の何れが望ましいか、及び処理されるべき面積に依存して、多くの方法で投与される。したがって、療法における使用のため、有効量のHES-オリゴヌクレオチドは、当該核酸を所望の表面、例えば粘膜又は全身に送達する任意の態様により、対象に投与されうる。適切な投与経路には、局所、経口、肺、非経口、鼻内、気管、吸入、眼、膣及び直腸が含まれるが、これらに限定されない。このような剤形及び調製は当業界においてよく知られており、任意的投与経路についての考慮のとおりである。

20

#### 【0170】

投与は、局所投与（膣内及び直腸送達を含めての眼及び粘膜投与を含む）、例えば、ネプライザーによる場合を含めて粉末又はエアロゾルの吸入又は通気（insufflation）により肺投与、気管支内投与、鼻内投与、表皮投与及び経皮投与、経口投与、又は非経腸投与であろう。非経口投与には、静脈内投与、動脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内注射又は吸入；或いは頭蓋内投与又は髄腔内投与であろう。少なくとも1つの2'-0-メトキシエチル修飾を有するHES-オリゴヌクレオチド、例えばキメラ分子、又はいずれかのヌクレオチド糖の2'-0-メトキシエチル修飾を有する分子は、経口投与のために特に有用であると信じられる。局所投与のための医薬組成物及び製剤には、経皮パッチ、ドロップ、座薬、スプレー、液体及び粉末が含まれよう。従来の医薬担体、液体、粉末などが必要か又は望ましいであろう。

30

#### 【0171】

経口投与のための組成物及び製剤には、粉末又は顆粒、水中懸濁液又は溶液、カプセル、サケット（sachet）又は錠剤が含まれよう。

40

非経口、髄腔内又は脳室内投与のための組成物及び製剤には、無菌水溶液が含まれてもよく、当該水溶液は更に、当業界で知られている緩衝剤、希釈剤及び他の適当な添加剤及び医薬として許容される担体又は賦形剤を含むであろう。

#### 【0172】

或る態様において、非経口投与は、注入（infusion）による。注入は慢性的若しくは連続的又は短時間若しくは断続的である。或る態様において、注入される医薬剤はカヌーレ又はカテーテルにより送達される。或る態様において、注入される医薬剤はポンプにより送達される。或る態様において、本明細書に記載される化合物及び組成物は非経口的に投与される。追加の態様において、非経口投与は注射による。注射はシリンジ又はポンプに

50

より送達され得る。或る態様において、注射はボーラス注射である。或る態様において、注射は組織又は器官に直接投与される。追加の態様において、非経口投与は皮下又は静脈内投与を含む。

#### 【0173】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、経口経路の投与を介して対象に投与され得る。対象は、哺乳類、例えばマウス、ラット、イヌ、モルモット、又は非ヒト霊長類であろう。幾つかの態様において、対象はヒト対象である。或る態様において、本明細書において更に詳細に検討するように、対象は、1又は複数のpri-miRNAのレベル又は発現の調節を必要とするものである。幾つかの態様において、対象への投与のための組成物。

10

#### 【0174】

本発明の文脈において、HES - オリゴヌクレオチドの送達のために好ましい手段は注入ポンプ、例えばMedtronic SyncroMed(R) IIポンプを採用する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、診断、療法、予防のため、及び研究用試薬及びキットとして使用され得る。療法のため、細胞の挙動を調節することにより治療され得る疾患又は障害を有することが疑われる対象、例えばマウス、ラット又は霊長類、好ましくはヒトが、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体を投与することにより処理され得る。

#### 【0175】

幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド送達系は、細胞へのHES - オリゴヌクレオチド複合体の送達及び/又はオリゴヌクレオチドの標的化された送達を促進するため、1又は複数の追加のオリゴヌクレオチド送達系と組み合わされる。HES - オリゴヌクレオチド送達系と組み合わせることができる巨大分子送達系には、デンドリマー(dendrimer)、生物分解性ポリマーの使用が含まれるが、これに限定されない。更に、HES - オリゴヌクレオチド送達系と組み合わせることができる追加の送達系には、アミノ酸、糖、又は標的核酸モチーフとの接合体が含まれるが、それに限定されない。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、複合体の半減期を調節し又は複合体の取り込みを促進する或る種の受容体又は血清蛋白質と特異的にハイブリダイズするアプタマー(aptamer)、ペプチド、又は抗体(若しくは抗体断片)と接合される。

20

#### 【0176】

HES - オリゴヌクレオチド送達系はまた、コレステロール分子に共有結合させることができる。

30

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、他の分子、分子構造又は化合物の混合物、例えば受容体標的化分子、経口、直腸、局所又は他の製剤と、混合し、接合し又は関連づけることができる。

#### 【0177】

##### 例示的な作用様式

###### アンチセンス

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は単に「アンチセンス」は、標的とされる対象の細胞中の同起源のmRNAに結合し、そして例えば標的RNAの蛋白質翻訳の位置への移行、標的RNAから蛋白質の翻訳を変更し、標的RNAのスプライシングを変更し(例えば、エキソンスキッピングを促進し)、そして標的RNAに関連する又はそれにより促進される触媒活性を変更し、そして内因性RNase Hによる分解についてmRNAを標的化することにより、RNAの機能を調節する核酸(例えば、DNA、RNA、及び核酸模倣物、例えばPNAモルホリノ(例えば、PMO)の1本鎖に対応するオリゴヌクレオチドを含むことを意味する。

40

#### 【0178】

幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、染色体DNAと特異的にハイブリダイズすることにより細胞活性を変更する。用語「アンチセンスオリゴヌクレオチ

50

ド」はまた、所望の標的遺伝子に対して正確に相補的ではないアンチセンスオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、本発明は、非 - 標的特異的活性がアンチセンスに関して見出される場合、あるいは標的配列との間の 1 又は複数のミスマッチを含むアンチセンス配列が特定の用途のために好ましい場合に、使用され得る。標的核酸の機能に対するこのような妨害の全体的効果は、注目の標的蛋白質の調節である。

【 0 1 7 9 】

本発明の文脈において、「調節」は、遺伝子又は蛋白質の発現の量、又は小さい非 - コードRNA、核酸標的、小さい非 - コードRNAに関連するRNA又は蛋白質、又は小さい非 - コードRNA（例えば、小さい非 - コードRNAにより制御される蛋白質コード核酸を代表するmRNA）の下流標的における増加（刺激）又は減少（阻害）の何れかを意味する。阻害は調節の適切な形体であり、そして小さい非 - コードRNAは適切な核酸標的である。そのレベルが調節され得る小さい非 - コードRNAには、miRNA及びmiRNA前駆体が含まれる。本発明の文脈において、「機能の調節」は、小さい非 - コードRNAの機能又は活性の変更、或いは任意の細胞成分の機能の変更であってそれと共に小さい非 - コードRNAが関連又は下流効果を有するものを意味する 1 つの態様において、機能の変更は小さい非 - コードRNAの活性の阻害である。

10

【 0 1 8 0 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは長さにして約 8 ~ 約 80 の連続して連結されたオリゴヌクレオシドである。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約 10 ~ 約 50 のヌクレオシド又は約 13 ~ 約 30 のヌクレオチドである。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドには、リボザイム（ribozyme）、抗miRNA、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド（オリゴザイム；oligozymes）、及び他の短い触媒性RNA又は触媒性オリゴヌクレオチドであって、標的核酸に特異にハイブリダイズしそしてその発現を調節するものが含まれる。

20

【 0 1 8 1 】

本発明に従うアンチセンスオリゴヌクレオチドは、約 15 ~ 約 30 のヌクレオシド長さ（すなわち、15 ~ 30 の連結されたヌクレオシド）、又は約 17 ~ 約 25 のヌクレオシド長さを含んで成る。特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30 のヌクレオシド長さである。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは約 10 ~ 約 50 ヌクレオチド、更に好ましくは約 15 ~ 約 30 ヌクレオチドである。

30

【 0 1 8 2 】

追加の態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、注目の標的RNAの転写を妨害する。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、鎖置換（strand displacement）により、注目のmRNA又はmiRNAの転写を妨害する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、ストランド侵入（strand invasion）又はトリプレット形成（トリプレット形成オリゴヌクレオチド（THOs）、例えばLNAを含むもの、例えば、米国特許出願公開第2012/0122104号を参照のこと、引用により本明細書に組み入れる）により、標的遺伝子の部分と安定な複合体を形成することによって、mRNAの転写を妨害する。追加の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチドは、細胞の転写装置を妨害することにより、標的RNA（例えば、mRNA又はmiRNA）の転写を妨害する。

40

【 0 1 8 3 】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、mRNAの 5' 末端中の領域又はAUG開始コドン（例えば、AUG開始コドンの30ヌクレオチド内）に特異的にハイブリダイズしそして翻訳を減少させるように設計される。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNAのイントロン / エキソン連結部に特異的にハイブリダイズするように設計される。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）中の 3' 非翻訳標的配列に特異的にハイブリダイズするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAのヌクレオチド 1 - 10 に特異的にハイブリダイズするように設計される。追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、前駆体 - miR

50

NA (pre-miRNA) 又は一次 - miRNA (pri-miRNA) であってオリゴヌクレオチドにより結合されたときmiRNAのプロセシングをブロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするように設計される。

【0184】

他の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、臨界的RNA二次構造の部位を標的にし又は翻訳されたポリペプチドのトランケーションを惹起する立体的ブロッカーとして作用する。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド（例えば、PNA及びPMO）は、例えば標的とされるmRNAのスプライス連結部又はその近傍に結合することにより、イントロンの切り取りを妨害するように設計される。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、イントロンの切り取りを妨害するように、又は他のスプライスバリエントの発現を増加させるように設計される。

10

【0185】

RNase Hは、RNA:DNA 2本鎖のRNA成分を特異的に開裂させる内因性酵素である。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸に結合した場合、RNase活性を惹起する。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DNA又は核酸模倣物である。RNase H活性を引き出すHES - オリゴヌクレオチドは、例えば、標的とされるRNAを低下させるために内因性リボヌクレアーゼを利用することにおいて特別の利点を有する。

【0186】

RNase H活性を引き出すための1つのアンチセンス設計は、ギャップマー（gapmer）モチーフ設計であり、当該設計においては、ホスホロチオエート修飾を伴う又は伴わないDNAから構成される中央ブロック、及びヌクレアーゼ耐性5'及び3'フランкиングブロックを有するキメラオリゴヌクレオチドであり、通常は2'-メチルRNAであるが、広範囲な2' - 修飾が使用されている（Crooke, 2004を参照のこと）。他のギャップマー設計は本明細書に記載されるか又は当業界において知られている。

20

【0187】

追加の態様において、本発明の複合体中のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞中のRNase Hの活性化を回避するように設計される。RNase H活性を引き出さないオリゴヌクレオチドは、例えば、転写機構のブロック（立体的ブロックメカニズムを介しての）及び標的RNAのスプライシングの変更において特別な利点を有する。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば、標的とされるmRNAのスプライス連結部又はその近傍に結合することによりイントロンの切り取りを妨害しそして/又はイントロンの切り取りを変更するように設計される。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、メッセージの他のスプライスバリエントを増加させるように設計される。本発明の好ましい態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、モルホリノ（例えば、PMO）である。他の好ましい態様において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはPNAである。

30

【0188】

特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNAのイントロン/エキソン連結部の上流50ヌクレオ塩基までの領域の少なくとも部分に標的化される。さらに好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNAのイントロン/エキソン連結部の上流の領域20 - 24又は30 - 50ヌクレオ塩基の少なくとも部分に標的化され、そして好ましくは結合の際にmRNA標的のRNase H開裂を支持しない。好ましくは、アンチセンス化合物は、RNA標的（例えば、mRNA及びmiRNA）に対する結合親和性を増加させ、そしてアンチセンス化合物のヌクレアーゼ耐性を増加させる少なくとも1つの修飾を含む。

40

【0189】

1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、糖成分の2'修飾を有する少なくとも1つのヌクレオシドを含んで成る。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、糖成分の2'修飾を有する少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、又は20ヌクレオシドを含んで成る。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの何れのヌクレオシドも、その糖成分の2'修飾を有する。好ましくは、2'修飾は、2' - フルオロ、2' - OME、2' - メトキシエチル(2'-MOE)又はロックされた核酸（

50

LNA)である。幾つかの態様において、修飾されたヌクレオシドモチーフは、メチレン(-CH<sub>2</sub>-)n基が2'酸素原子と4'炭素原子とを架橋している(nは1又は2である)LNA又はLNAである。

【0190】

更なる態様において、LNA又はLNAは、5'位にメチル基を含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'修飾及び少なくとも1つのヌクレオシド間結合を含む。特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。1つの態様において、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル及びホスホロチオエート主鎖結合間を交替にする。他の態様において、オリゴヌクレオチドの何れのヌクレオシド間結合もホスホロチオエート結合である。

10

【0191】

追加の好ましい態様において、本発明の複合体中のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの3'-メチレンホスホネート連結、LNA、ペプチド核酸(PNA)連結、又はホスホロジアミデートモルホリノ連結を含んで成る。更なる態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾されたヌクレオ塩基を含む。好ましくは、修飾されたヌクレオ塩基はC-5プロピン又は5-メチルCである。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物は、当業界において知られている技法を用いて、日常的に合成することができる。

20

【0192】

RNAi - 転写後遺伝子サイレンシング

短い2本鎖RNA分子及び短いヘアピンRNA(shRNAs)、すなわちsiRNAをもたらす折り返しシステム - ループ構造は、RNA妨害(RNAi)を誘導することができる。幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドはRNAiを誘導する。本発明の複合体中のRNAiオリゴヌクレオチドには、siRNA、hRNA及びdsRNA DROSHA及び/又はダイサー(Dicer)基質が含まれるが、これらに限定されない。siRNA、shRNA、及びdsRNAの一方の鎖又は両方の鎖は、好ましくは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド間結合、修飾された糖成分及び/又は修飾されたヌクレオ塩基であって、本明細書に記載されるもの又は当業界において知られているものを含む。これらのRNAiオリゴヌクレオチドは、対象における注目の遺伝子又はポリヌクレオチドの発現の中止を含むがこれに限定されない用途を有する。

30

【0193】

したがって、幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の発現を特異的に阻害するために使用される。幾つかの態様において、遺伝子及び/又は核酸の発現の、2本鎖RNAで仲介される抑制は、dsRNA DROSHA基質、dsRNAダイサー(Dicer)基質、siRNA又はshRNAを含んで成る本発明の複合体を対象及び/又は細胞に投与することにより達成される。遺伝子及び核酸の発現の2本鎖RNAにより介在される抑制は、dsRNA、siRNA又はshRNAの対象への投与により本発明に従って達成されるであろう。siRNAは、2本鎖RNA、又はRNAとDNAの両方、例えば1つのRNA鎖及び1つのDNA鎖を含んで成るハイブリド分子により達成されるであろう。

40

【0194】

本発明のsiRNAは、RNA:RNAハイブリド、DNAセンス:RNAアンチセンスハイブリド、RNAセンス:DNAアンチセンスハイブリド、及びDNA:DNAハイブリド2本鎖であって、通常21~30ヌクレオチドの長さを有し、RNAi - 誘導サイレンシング複合体(RISC)として知られる細胞質 - 多タンパク質複合体と関連することができる。siRNAにより負荷されたRISCは、相同的mRNA転写物の分解を仲介する。本発明は、これらの異なるタイプの2本鎖分子の何れかを含むRNAi分子の使用を包含する。更に、RNAi分子は、種々の形態で使用されそして細胞に導入されると理解される。

【0195】

したがって、ここで使用される場合、RNAi分子には、細胞中でRNAi応答を誘導すること

50

ができる任意の又はすべての分子が含まれ、2本の別個の鎖、すなわちセンス鎖及びアンチセンス鎖を含んで成る2本鎖ポリヌクレオチド、例えば小型の妨害RNA(siRNA)；2本鎖領域を形成する相補的鎖のヘアピンループを含んで成るポリヌクレオチド、例えばshRNA分子、並びに単独で又は他のポリヌクレオチドと組み合わされて2本鎖ポリヌクレオチドを形成することができる1又は複数のポリヌクレオチドを発現するベクター、が含まれるがこれらに限定されない。

【0196】

幾つかの態様において、本発明の複合体に含まれるdsRNAオリゴヌクレオチドは、2本鎖であり、そして16～30又は18～25ヌクレオチドの長さを有する。特定の態様において、dsRNAは21ヌクレオチドの長さを有する。或る態様において、dsRNAは0～7ヌクレオチドの3'オーバーハング、又は0～4ヌクレオチドの5'オーバーハングを有する。特定の態様において、dsRNAは、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。更なる態様において、dsRNAは、2ヌクレオチドの3'オーバーハングを伴う21ヌクレオチドの長さを有する2本の相補的RNA鎖を含む（すなわち、センス鎖及びアンチセンス鎖間に19ヌクレオチドの相補性領域を含む）。或る態様において、オーバーハングは、UU又はdTdT 3'オーバーハングである。

10

【0197】

幾つかの態様において、本発明の複合体中のsiRNAオリゴヌクレオチドは、標的RNAの対応する逆相補鎖に対して完全に相補的である。他の態様において、siRNAは、標的RNAの対応する逆相補鎖に比べて、1又は2個の置換、欠失又は挿入を含む。

20

【0198】

追加の態様において、本発明の複合体は、短いヘアピンRNAであるRNAiオリゴヌクレオチドを含んで成る。shRNAは、siRNAをもたらす折り返しシステム-ループ構造を含むヘアピンRNAの形態であり、そしてそれ故に、同様に標的遺伝子の発現を配列特異的に低下させることが可能である。短いヘアピンRNAは一般に、siRNAに比べて細胞環境において一層安定でありそして分解に対して感受性でない。shRNAのシステム-ループ構造は、システムの長さにおいて、典型的には19～29ヌクレオチドの長さで異なることができる。或る態様において、本発明の複合体は、19～21又は27～29ヌクレオチドの長さのシステムを有するshRNAを含んで成る。追加の態様において、shRNAは、4～30ヌクレオチドの長さのループサイズを有する。標的mRNA（アンチセンス鎖）及びmRNAに特異的にハイブリダイズするシステムの部分間の完全な相補性が好ましいが、shRNAは任意にはshRNAヘアピンシステムの2本の鎖間にミスマッチを含むことができる。例えば、幾つかの態様において、shRNAは、細菌における増加の間にヘアピンを安定化するためにヘアピンシステム中に1個又は数個のG-U対合を含む。

30

【0199】

1つの態様において、本発明の複合体に含まれるRNAiヌクレオチドの核酸標的は、AAジヌクレオチド配列の存在について標的RNA（例えば、mRNA又はmiRNA）をスキヤニングすることにより選択される。各AAジヌクレオチド配列は、3'に隣接する約19ヌクレオチドとの組合せにおいて、それに基づいてRNAiオリゴヌクレオチドを日常的に設計することができる潜在的siRNA標的部位である。幾つかの態様において、RNAiオリゴヌクレオチド標的部位は、5'及び3'非翻訳領域(UTR)内、或いは標的RNAの調節領域に結合する蛋白質によるsiRNPエンドヌクレアーゼ複合体の結合の潜在的妨害を回避するために、標的RNAの開始コドンの近傍の領域内（例えば、開始コドンの約75塩基内）に位置する。

40

【0200】

RNAiオリゴヌクレオチド標的化特異的ポリヌクレオチドは、当業界において知られている試薬及び手順を使用し又は日常的に改変することにより、容易に調製することができる。効果的なsiRNA分子の構造的特徴は同定されている。Elshabir et al. (2001) *Nature* 411:494-498、及びElshabir et al. (2001), *EMBO* 20:6877-6888。したがって、当業者は、特定の遺伝子又は転写物を標的にするために種々の異なるsiRNA分子を使用することができると理解できよう。

50

## 【0201】

酵素的核酸

幾つかの態様において、本発明の複合体は、酵素的オリゴヌクレオチドを含んで成る。本発明に従って使用される酵素的オリゴヌクレオチドの2つの好ましい特徴は、それらが、標的遺伝子DNA又はRNAの領域の1又は複数に対して相補的である特異的基質結合部位を有すること、及び、それらが、オリゴヌクレオチドに対するRNA開裂活性を付与する基質結合部位内又はその周辺にヌクレオチド配列を有することである。幾つかの態様において、酵素的オリゴヌクレオチドはリボザイム(ribozyme)である。リボザイムは、エンドヌクレアーゼ活性を有する特異的触媒ドメインを有するRNA-蛋白質複合体である。本発明の例示的リボザイムHES-オリゴヌクレオチドは、ハンマーへッド(hammerhead)、ヘアピン、肝炎ウイルス、グループエイントロン、又はRNaseP RNA(RNAガイド配列に関連して)又はニューロスポラ(Neurospora)VS RNAモチーフ中に形成される。

10

## 【0202】

本発明の複合体中の酵素的オリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されているか又は当業界で知られている修飾されたヌクレオチドを含むが、重要なことは、そのような修飾が当該酵素的オリゴヌクレオチドの触媒活性を無くすコンホーメーション変化を導かないことである。リボザイムの如き酵素的オリゴヌクレオチドを設計し、製造し、試験しそして最適化する方法は当業界で知られており、そして本発明の範囲内である。(例えば、WO 91/03162; WO 92/07065; WO 93/15187; WO 93/23569; WO 94/02595; WO 94/13688; EP 921 0298; 及び米国特許第5,334,711号を参照のこと。これらのそれぞれを、引用により本明細書に組み入れる。)

20

## 【0203】

アプタマー(Aptamer)及びデコイ(Decoy)

幾つかの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチドはアプタマー(aptamer)及び/又はデコイ(decoy)を含む。本明細書で使用する場合、アプタマーは、特定の配列依存的形態を有しそして高い親和性及び特異性をもって標的蛋白質に特異的にハイブリダイズする1本鎖核酸分子(例えば、DNA又はRNA)を意味する。本発明の組成物におけるアプタマーは、その長さが、一般に100ヌクレオチドより短く、75ヌクレオチドより短く、又は50ヌクレオチドより短い。

30

## 【0204】

用語「アプタマー」は、本明細書で使用される場合、D-オリゴヌクレオチドに比べて酵素的分解に対する抵抗性を提供する鏡像アプタマー(高親和性L-エナンチオマー核酸、例えばL-リボース又はL-2'-デオキシリボースユニット)を含む。アプタマーを製造しそして同定する方法は当業界において知られており、そして望ましい診断的及び/又は療法的性質を有するアプタマーを同定し、そしてそれらのアプタマーを本発明のHES-オリゴヌクレオチドに導入するためには改変することができる。例えば、Wlotzka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 99(13):8898-8902, 2002を参照のこと。その記載を引用により本明細書に組み入れる。

30

## 【0205】

本明細書において使用される場合、用語「デコイ」(decoy)は、蛋白質の如き因子が結合する核酸上の部位を模倣する短い2本鎖核酸(それ自体上で折り返すように設計された1本鎖核酸を含む)を意味する。このようなデコイは、因子の活性及び/又は機能を競争的に阻害し、そしてそれにより低下させる。デコイを製造しそして同定する方法は当業界において知られており、そして望ましい診断的及び/又は療法的性質を有するデコイを同定し、そしてそれらのデコイを本発明のHES-オリゴヌクレオチドに導入するためには改変することができる。例えば、Edwardsらの米国特許第5,716,780号を参照のこと。そこ記載を引用により本明細書に組み入れる。

40

## 【0206】

小さい非-コードRNA及びアンタゴニスト(例えば、miRNA及び抗-miRNA)

小さい非-コードRNAにより介在されるメカニズムを介して遺伝子発現を制御する剤の

50

必要性が存在する。本発明は、この必要性及び他の必要性に合致する。

本明細書において、用語「小さい非 - コードRNA」は、限定的ではないが、17~29ヌクレオチドの長さにわたるポリヌクレオチド分子を含めて使用される。1つの態様において、小さい非 - コードRNAは、miRNA (miRNA、Mirs、miRs、mirs、及び成熟miRNAとしても知られる) である。

#### 【0207】

”成熟” miRNAとしても知られるミクロRNA (miRNA) は、小さい (約21~24ヌクレオチドの長さ) 非 - コードRNA分子であって、発生、細胞増殖、アポトーシス及び分化の鍵となる制御因子として同定されているものである。miRNAが関与する特定の発生過程の例には、幹細胞分化、神経発生、血管新生、造血及びエキソサイトーシスが含まれる (Alvarez-Garcia and Miska, Development, 2005, 132, 4653-4662により総説されている)。miRNAは、疾患状態において異常に発現されることが見出されており、すなわち特定のmiRNAが、健康な細胞又は組織に較べて、疾患を有する細胞又は組織に高い又は低いレベルで存在する。

#### 【0208】

miRNAは、しばしば数百ヌクレオチドの長さを有する長い内因性一次miRNA転写物 (pri-miRNA、pri-mirs、pri-miR又はpri-pre-miRNAとしても知られる) から生ずると信じられる (Lee, et al, EMBO J., 2002, 21(17), 4663-4670)。miRNAが遺伝子発現を制御する1つのメカニズムは、特定のmRNAの3' - 非翻訳領域 (3' - UTR)への結合を通してである。RNAにより誘導されるサイレンス複合体 (RISC) に導入されることとなるmiRNAヌクレオチド (nt) RNA分子は、翻訳阻害、転写物の開裂、又はこれらの両方を通して遺伝子発現の下方制御 (down-regulation) を仲介する。RISCはまた、広範囲の真核生物の核における転写サイレンシングに係わる。

#### 【0209】

本発明は特に、疾患状態に関連するmiRNA活性を含めて小さい非 - コードRNAの活性を調節するための組成物及び方法を提供する。本発明の或る種の組成物は、その改良された送達性、高い活性及び/又は改良された治療指標のためにイン - ビボ方法での使用に特に適する。

#### 【0210】

本発明は、miRNAを含めて、小さい非 - コードRNAを調節するための組成物及び方法を提供する。特定の態様において、本発明は、1又は複数の小さい非 - コードRNA、例えばmiRNAのレベル、発現、プロセシング又は機能を調節するための組成物及び方法を提供する。したがって、幾つかの態様において、本発明は、小さい非コードRNA、例えばmiRNAと特異的にハイブリダイズできる少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを有するHES - オリゴヌクレオチド複合体を含んで成る医薬組成物のような組成物を包含する。

#### 【0211】

幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、1又は複数の小さい非 - コードRNA、例えばmiRNAを含んで成るか又はコードする核酸分子と特異的にハイブリダイズするか又は立体的に妨害する。特定の特定の態様において、本発明は、アンチセンスメカニズムに頼るもの及びアンチセンスメカニズムに依存しないものを含めて、miRNAのレベル、活性又は機能を調節するために有用なEES - オリゴヌクレチド複合体及び方法を提供する。

#### 【0212】

本明細書で使用される場合、用語「標的核酸」、「標的RNA」、「標的RNA転写物」又は「核酸標的」は、限定的ではないがRNAを含めて標的化されうる任意の核酸を含めて使用される。1つの態様において、標的核酸は、miRNA及びmiRNA前駆体を含むがこれらに限定されない非 - コード配列である。好ましい態様において、標的核酸は、miRNAとも称されるmiRNAである。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがmiRNAに対して100%を含めて実質的に相補的な配列を含んでなる場合、「miRNAに標的化される」。

#### 【0213】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される場合、オリゴヌクレオチドが生理的条件下で小さい非 - コードRNAに対して特異的にハイブリダイズする場合、オリゴヌクレオチドは、例えばRNA、例えば小さい非 - コードRNAに対して「実質的に相補的」である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドがmiRNAの少なくとも8個の連続するヌクレオチドに対して100%を含めて実質的に相補的な配列を含んで成る場合、オリゴヌクレオチドは、「miRNAに標的化」される。幾つかの態様において、本発明の複合体中のオリゴヌクレオチドは、miRNAに特異的にハイブリダイズし、そして約8～約21ヌクレオチド、約8～約18ヌクレオチド、又は約8～約14ヌクレオチドの長さにわたる。

【0214】

追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、miRNAに特異的にハイブリダイズし、そして約12～約21ヌクレオチド、約12～約18ヌクレオチド、又は約12～約14ヌクレオチドの長さにわたる。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は21モノマーサブユニット(ヌクレオシド)の長さである。或る態様において、オリゴヌクレオチドは、14、15、16、17又は18モノマーサブユニット(ヌクレオチド)の長さである。

10

【0215】

特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、miRNAに対して全長相補性を有する。他の態様において、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の長さ相補性及びオリゴヌクレオチドと標的miRNAとの間の3個までの「ミスマッチ」において、オリゴヌクレオチドはなお、標的miRNAとハイブリダイズすることができ、そしてオリゴヌクレオチドの機能は実質的に損なわれない。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的miRNAの長さに対して、オリゴヌクレオチドの3'又は5'末端、或いは3'及び5'の両末端における6個までのヌクレオチドの切除又は延長を含む。或る態様において、オリゴヌクレオチドは、標的miRNAの長さに比べて1又は2個のヌクレオチドが切除されている。非限定的な例として、標的miRNAが22ヌクレオチドの長さであれば、実質的に全長相補性を有するオリゴヌクレオチドは、20又は21ヌクレオチドの長さであろう。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、miRNAに比べて3'又は5'末端で1ヌクレオチド切除されている。

20

【0216】

幾つかの態様において、本発明は、細胞をHES - オリゴヌクレオチド複合体に接触させることを含んで成る、小さい非 - コードRNAを調節する方法を提供し、ここでHES - オリゴヌクレオチド複合体のオリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNA、小さい非 - コードRNA前駆体(例えば、miRNA前駆体)又は小さい非 - コードRNAをコードする核酸に対して実質的に相補的である配列を含んで成る。本明細書において使用される場合、用語「小さい非 - コードRNA前駆体、miRNA前駆体」は、小さい(成熟)非 - コードRNAが由来する、より長い任意の核酸配列を含めて使用され、そして一次RNA転写物、pri-小さい非 - コードRNA、及びプレ小さい - 非 - コードRNAを含むが、これに限定されない。例えば、miRNA前駆体は、miRNAが由来する、より長い核酸配列を包含し、そして一次RNA転写物、pri-miRNA、及びpre-miRNAを含むが、これらに限定されない。

30

【0217】

本発明は、特に、小さい非 - コードRNAを含んで成る又はそれをコードする核酸に標的化されそして当該小さい非 - コードRNAのレベルを調節するか又はその機能を調節するオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を含んで成る組成物、例えば医薬組成物を提供する。更なる態様において、本発明は、miRNAに標的化され、そしてmiRNAのレベルを調節し又はそのプロセッシング若しくは機能を妨害するオリゴヌクレオチドを含んで成るHES - オリゴヌクレオチド複合体を含む組成物、例えば医薬組成物を提供する。

40

【0218】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1 - 10(すなわち、シード領域)に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、当該オリゴヌクレオチドに結合された場合

50

にmiRNAのプロセシングをブロックする前駆体 - miRNA (pre-miRNA) 又は一次 - miRNA (pri-miRNA) 中の配列に特異的にハイブリダイズする。

【0219】

幾つかの態様において、組成物は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を含み、当該複合体は、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に標的化されそして当該Y小さい非 - コードRNAのレベルを低下させるように働き、そして / 又は細胞におけるその機能を妨害するオリゴヌクレオチドを含む。

【0220】

他の態様において、組成物は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を含み、当該複合体は、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、或いは小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ（例えば、非 - コードRNAをコードする遺伝子中の制御配列に結合することによる）、そして小さい非 - コードRNAのレベルを増加させ、そして / 又は細胞でのその核酸を増加させるように働くオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0221】

本発明のHES - オリゴヌクレオチドに含まれるオリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNA核酸標的を含んで成るか又はそれをコードする核酸にハイブリダイズして正常な機能の変更をもたらすことにより、小さい非 - コードRNAのレベル、発現又は機能を調節することができる。例えば、小さい非 - コードRNAの活性（レベル、発現又は機能を含む）を低下させるであろう非限定的なメカニズムには、開裂、隔離、立体的閉塞を通して、及び小さい非 - コードRNAへのハイブリダイゼーション及び正常な細胞性標的へのハイブリダイゼーションの回避とその活性の調節により、小さい非 - コードRNAの破壊を促進することを含む。

20

【0222】

追加の態様において、本発明は、小さい非 - コードRNAの活性を阻害する方法を提供し、当該方法は、細胞をHES - オリゴヌクレオチド複合体と接触させることを含んで成り、当該複合体は、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、そして当該小さい非 - コードRNAのレベルを低下させそして / 又は細胞中のその機能を妨害するオリゴヌクレオチドを含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に対して実質的に相補的である配列を含んで成る。特定の態様において、小さい非 - コードRNAはmiRNAである。

30

【0223】

他の態様において、本発明は、小さい非 - コードRNAの活性を阻害する方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含んで成るHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はコードされる核酸に標的化され、そして当該小さい非 - コードRNAのレベルを低下させそして / 又は対象におけるその機能を妨害するものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に対して実質的に相補的な配列を含んで成る。特定の態様において、小さい非 - コードRNAはmiRNAである。

40

【0224】

追加の態様において、本発明は、小さい非 - コードRNAの活性を増加させる方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体に細胞を接触させることを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、当該小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、或いは当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ（例えば、当該非 - コードRNAをコードする遺伝子中の制御配列に結合することによる）、そして細胞中で、当該小さい非 - コードRNAのレベルを増加させ、そして / 又はその機能を増加させるものである。

【0225】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、非 - コードRNAを含んで成るか又はそ

50

れをコードする核酸と実質的に同じ配列を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNA配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり100%の同一性を共有する。特定の態様において、小さい非 - コードRNAはmiRNAである。

【 0 2 2 6 】

他の態様において、本発明は、小さい非 - コードRNAの活性を増加させる方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、当該小さい非 - コードRNAを含んで成り又はそれをコードし、或いは当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ、そして対象において、当該小さい非 - コードRNAのレベルを増加させ、そして / 又はその機能を増加させるものである。

10

【 0 2 2 7 】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸と実質的に同じ配列を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNA配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり100%の同一性を共有する。特定の態様において、小さい非 - コードRNAはmiRNAである。

【 0 2 2 8 】

追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸と実質的に同じ配列を含んで成る。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドはmiRNA模倣物である。幾つかの態様において、miRNA模倣物は2本鎖である。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、2本鎖であり、そして18 ~ 23ユニットの長さのオリゴヌクレオチドを含み、そして平滑末端を有するか又は1、2若しくは3ヌクレオチドの1又は複数の3'オーバーハングを含んで成るmiRNA模倣物である。

20

【 0 2 2 9 】

追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、18 ~ 23ユニットの長さである1本鎖miRNA模倣物を含む。これらのmiRNA模倣物を発現する発現ベクターを含むHES - オリゴヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNA配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり100%の同一性を共有する。特定の態様において、小さい非 - コードRNAはmiRNAである。

30

【 0 2 3 0 】

本発明はまた、対象における小さい非 - コードRNAの過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、前記小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に標的化されており、そして対象において、当該小さい非 - コードRNAのレベルを低下させ、そして / 又はその機能を妨害するように働くものである。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは抗 - miRNA (anti-miR) である。追加の態様において、抗 - miRNAは2本鎖である。

40

【 0 2 3 1 】

更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、2本鎖であり、そして18 ~ 23ユニットの長さのオリゴヌクレオチドを含み、そして平滑末端を有するか又は1、2若しくは3ヌクレオチドの1又は複数の3'オーバーハングを含んで成る抗 - miRNAである。追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、8 ~ 25ユニットの長さである1本鎖抗 - miRNAを含む。これらの抗 - miRNAを発現する発現ベクターを含むHES - オリゴヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、過剰発現される小さい非 - コードRNAに対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

【 0 2 3 2 】

50

更なる態様において、本発明は、対象におけるmiRNAの過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理する方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、miRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に標的化され、そして対象において、miRNAのレベルを低下させ及び／又はその機能を妨害するように働くものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、過剰発現されるmiRNAに対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

【 0 2 3 3 】

miRNAのファミリーは、miRNAの位置2～8、すなわちシード配列として知られる領域、におけるヌクレオチドの同一性により特徴づけられる。miRNAファミリーのメンバーを、ここで「関連miRNA」と称する。miRNAファミリーの各メンバーは、miRNA標的化及び機能において本質的な役割を演ずる同じシード配列を共有する。本明細書において使用される場合、用語「シード配列」又は「シード領域」は、成熟miRNA配列の5' - 末端から2～9のヌクレオチドを意味する。miRNAファミリーの例は当業界において知られており、そしてlet-7ファミリー(9 miRNAを有する)、miR-15ファミリー(miR-15a、miR-15b、miR-15-16、miR-16-1及びmiR-195を含む)、及びmiR-181ファミリー(miR-181a、miR-181b、及びmiR-181cを含む)を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 2 3 4 】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAのシード領域に特異的にハイブリダイズし、そしてmiRNAのプロセシング又は機能を妨害する。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAのシード領域に特異的にハイブリダイズし、そして多miRNAのプロセシング又は機能を妨害する。更なる態様において、少なくとも2の複数miRNAが関連するシード配列を有し、又はmiRNAスーパーファミリーのメンバーである。

20

【 0 2 3 5 】

疾患、例えば癌、線維症、代謝障害及び炎症性障害を伴うmiRNA機能障害と、一般的な細胞過程に含まれる遺伝子の完全なネットワークに影響を及ぼすmiRNAの能力との関連付けが、特に魅力的な調節療法である抗-miRNA及びmiRNA模倣物の使用におけるmiRNAの選択的調節を行なう。本発明はまた、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、前記蛋白質の増加した生産に影響を与える小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に標的化され、ここで、当該オリゴヌクレオチドは、対象において、前記小さい非 - コードRNAのレベルを低下させそして／又はその機能を妨害するように働く。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記小さい非 - コードRNAに対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

30

【 0 2 3 6 】

本発明はまた、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、前記蛋白質の増加した生産に影響を与えるmiRNAを含んで成るか又はそれをコードする核酸に標的化され、ここで、当該オリゴヌクレオチドは、対象において、前記miRANのレベルを低下させそして／又はその機能を妨害するように働く。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記miRNAに対して実質的に相補的な(特異的にハイブリダイズすることができる)配列を含んで成る。

40

【 0 2 3 7 】

本発明はまた、対象における小さい非 - コードRNAの低い発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、又は当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ、そして対象において、前記小さ

50

い非 - コードRNAのレベルを増加させそして / 又はその機能を増加させるように働くものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記過剰発現される小さい非 - コードRNAに対して実質的に相補的な（特異的にハイブリダイズできる）配列を含んで成る。

【 0 2 3 8 】

更なる態様において、本発明はまた、対象におけるmiRNAの過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、又は当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ、そして対象において、前記小さい非 - コードRNAのレベルを低下させそして / 又はその機能を増加するように働く。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、過剰発現されるmiRNAに対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

10

【 0 2 3 9 】

本発明はまた、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、又は当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ、そして、対象において、前記小さい非 - コードRNAのレベルを低下させそして / 又はその機能を増加するように働く。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記小さい非 - コードRNAに対して実質的に相補的な配列を含んで成る。

20

【 0 2 4 0 】

本発明はまた、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理するための方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、小さい非 - コードRNAを含んで成るか又はそれをコードし、又は当該小さい非 - コードRNAの内因性発現、プロセシング又は機能を増加させ、そして、対象において、前記小さい非 - コードRNAのレベルを増加させそして / 又はその機能を増加させるように働く。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、miRNAに対して実質的に相補的な（特異にハイブリダイズできる）配列を含んで成る。

30

【 0 2 4 1 】

他の態様において、本発明は、miRNAの活性を阻害する方法を提供し、当該方法は、抗 - miRNA活性を有するHES - オリゴヌクレオチド複合体、例えば本明細書に記載されるものを対象に投与することを含んで成る。

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、siRNA、miRNA、ダイサー（dicer）基質（例えば、dsRNA）、リボザイム、デコイ、アプタマー、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びsiRNA、miRNA、又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させることができるプラスミドから選択されるオリゴヌクレオチドを含む。

40

【 0 2 4 2 】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、又はすべての2'-F修飾されたオリゴヌクレオチドを含む中央領域、及び少なくとも 1 つの安定性増強修飾を含んで成る外部領域を含んで成るキメラオリゴヌクレチドである。1 つの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、第 1 の 2' - 修飾されたヌクレオチドを有する内部領域、及びそれぞれが第 2 の 2' - 修飾されたヌクレオチドを含んで成る外部領域を含んで成る。更なる態様において、ギャップ領域は 1 又は複数の 2' - フルオロ修飾を含んで成り、そしてウイング領域は、1 又は複数の 2' - メトキシエチル修飾を含んで成る。1 つの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、ISIS 393206 又はISIS 327985 である。

50

## 【0243】

療法剤診断剤、薬物の発見及び療法剤

本発明のオリゴヌクレオチド、複合体及び他の組成物は、研究、薬物の発見、キット及診断剤並びに療法剤を含むが、これらに限定されない用途を有する。本発明の複合体は、従来の送達技法を超える改良されたオリゴヌクレオチド送達のため、イン・ビボ法での使用に特に適する。

## 【0244】

本発明は、イン・ビボ又はイン・ビトロで核酸配列を検出するための組成物及び方法を提供する。したがって、幾つかの態様において、本発明は、生理的条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を含んで成る組成物を提供する。

10

## 【0245】

幾つかの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド送達ベヒクルは、宿主生物中の感染体、例えば哺乳類細胞中のウイルス、又は哺乳類組織中の細菌の同定のために使用される。この態様において、HESから構成されるHES-オリゴヌクレオチドは、相補的配列への結合のイン・ビボマーカーとして役立つ。この同定は、相補的外来（例えば、感染体）核酸配列へのHES-オリゴヌクレオチドの結合はHESの破壊又は有意な喪失をもたらし、そして蛍光消光の喪失をもたらす場合に、蛍光の変化の検出によって達成される。したがって、本発明は、宿主生物（対象）中の外来核酸の存在の決定、及び／又はレベルの定量のための方法を含む。幾つかの態様において、この方法はイン・ビトロで行なわれる。他の態様において、この方法はイン・ビボで行なわれる。

20

## 【0246】

幾つかの態様において、本発明は、対象中の感染物の存在をイン・ビトロ又はイン・ビボで検出する方法を提供し、当該方法は、感染物の核酸と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチドと細胞、組織又は対象とを接触させ、細胞、組織又は対象組織中の蛍光のレベルを決定し、そして当該蛍光のレベルを、HES-オリゴヌクレオチドと接触させた、感染物を含まない対照細胞、組織又は対象について得られた蛍光のレベルと比較することを含んで成り、ここで対照と比べて増加した蛍光により、細胞、組織又は対象が感染物を有することが示される。

30

## 【0247】

追加の態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチドは、疾患又は障害のバイオマーカーである核酸の変化したレベルを同定するために使用される。幾つかの態様において、本発明は、疾患又は障害についての核酸バイオマーカーの変化したレベルの存在をイン・ビトロで検出するための方法を提供し、当該方法は、核酸バイオマーカーと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチドと細胞又は組織とを接触させ、細胞又は組織中の蛍光のレベルを決定し、そして当該蛍光のレベルと、HES-オリゴヌクレオチドと接触させた対照細胞又は組織について得られた蛍光のレベルとを比較することを含んで成り、ここで対照と比べて変化した蛍光により、細胞又は組織が核酸バイオマーカーの変化したレベルを有することが示される。

40

## 【0248】

更なる態様において、本発明は、疾患又は障害についての核酸バイオマーカーの変化したレベルをイン・ビボで検出するための方法を提供し、当該方法は、核酸バイオマーカーと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチドを対象に投与し、対象における蛍光のレベルを決定し、そして当該蛍光のレベルと、HES-オリゴヌクレオチドが投与された対照対象について得られた蛍光のレベルとを比較することを含んで成り、ここで対照と比べて変化した蛍光により、対象が核酸バイオマーカーの変化したレベルを有することが示される。

## 【0249】

イン・ビトロ及びイン・ビボ蛍光は、当業界において知られている技法を用いてモニタ

50

ーすることができる。例えば、幾つかの態様において、蛍光は、蛍光内視鏡検査を通してモニターされる。蛍光内視鏡検査は、オリンパスEVIS ExERA-II CLV-80システム（オリンパス株敷く会社、東京、日本）の如き装置を用い、投与されたフルオロフォアのための適当な蛍光フィルター及び励起波長を用いて実施することができる。蛍光強度は、当業界において知られている技法及びソフトウェア、例えばImage-Jソフトウェア（NIH, Bethesda, MD）を用いて決定することができる。

#### 【0250】

幾つかの態様において、疾患又は障害は、癌、線維症、増殖性疾患又は障害、神経性疾患又は障害、及び炎症性疾患又は障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、或いは皮膚又は眼の疾患又は障害である。追加の態様において、疾患又は障害は、腎臓、肝臓、リンパ腺、脾臓又は脂肪組織の疾患又は障害である。特定の態様において、疾患又は障害は、腎臓、肝臓、リンパ腺、脾臓又は脂肪組織の疾患又は障害でない。

10

#### 【0251】

更なる態様において、疾患又は障害は、増殖性障害、例えば癌である。例えば、種々のmiRNA、例えばmIR-10b、mIR17-92、mIR-21、mIR125b、mIR-155、mIR193a、mIR-205a及びmIR-210の過剰発現が、種々の形態の癌と関連づけられている。幾つかの態様において、バイオマーカーは、mIR-10b、mIR17-92、mIR-21、mIR125b、mIR-155、mIR193a、mIR-205a、及びmIR-210から選択されるmiRNAであり、そして対照に対する細胞、組織、又は対象の増加した蛍光により、対象が、癌を有するか、又は癌の素因を有することが示される。

20

#### 【0252】

追加の態様において、本発明の方法は、異なる疾患又は障害を同定し及び／又は区別するために使用される。本発明の方法は同様に、特に、変化した核酸（例えば、DNA及びRNA）プロファイルであって、正常な及び疾患を有する（例えば、癌性の）組織又は細胞を区別するもの、疾患を有する細胞の異なるサブタイプの間（例えば、異なる癌の間及び特定の癌のサブタイプの間）を区別するもの、異なる疾患状態を生じさせる又は異なる疾患状態に関連する変異（例えば、発癌性変異）の間を区別するもの、及び組織の由来（例えば、転移した癌における）を同定するもの、を決定するために使用することができる。

20

#### 【0253】

更に、幾つかの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドは、療法的オリゴヌクレオチドであり、そして療法的HES - オリゴヌクレオチドが標的核酸と特異的にハイブリダイズする場合に増加した蛍光をもたらすHESの破壊又は有意な喪失により、療法的オリゴヌクレオチドが標的核酸に送達されたこと、及びそれにハイブリダイズしたことが示される。したがって、幾つかの態様において、本発明は、標的核酸への療法的オリゴヌクレオチドのイン - ビボ送達をモニターし、そして／又は定量するための方法を提供し、当該方法は、標的核酸に特異的にハイブリダイズする療法的オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチドを対象に投与し、そして対象の細胞又は組織における蛍光のレベルを決定することを含んで成り、ここで対照細胞又は組織と比べての細胞又は組織中の増加した蛍光により、療法的オリゴヌクレオチドが標的核酸に送達され、そしてそれとハイブリダイズしたことが示される。

30

#### 【0254】

本発明の送達ベヒクルは、部分的に、オリゴヌクレオチドの1又は複数の鎖への1又は複数のHESの結合が、生きた生物の細胞又は組織内でのHES - オリゴヌクレオチドのイン - ビボ送達を有意に増強するという驚くべき発見に基づいている。したがって、本発明のHES - オリゴヌクレオチドベヒクルは、広範囲の療法的用途のための療法的送達ベヒクルとして、並びに、例えば特定の遺伝子又はRNAのイン - ビボでの活性及び／又はコピー数を評価するための測定及び療法との組合せにおいて、用途を有する。

40

#### 【0255】

研究及び薬物の発見のため、本発明のHES - オリゴヌクレオチドは、例えば、標的とされる核酸分子の正常な機能を妨害するために使用することができる。本発明の1又は複数

50

のHES - オリゴヌクレオチドにより処理される細胞、組織又は対象内の発現パターンは、次に、当該化合物で処理されない対照細胞、組織又は対象と比較され、そして次の、精製したパターンが、核酸及び/又は蛋白質発現の異なるレベルについて分析され、そしてそれらは、例えば、試験される遺伝子の疾患関連、シグナル伝達経路、細胞配置、発現レベル、サイズ、構造又は機能に関連するようである。これ等の分析は、刺激された又は刺激されない細胞上で、及び発現パターンに影響する他の化合物の存在下又は非存在下で行なうことができる。

#### 【0256】

本発明はまた、核酸、及び調節される核酸によりコードされる又は制御される蛋白質を調節するための組成物及び方法を提供する。特定の態様において、本発明は、mRNA、小さい非 - コードRNA ( 例えば、miRNA ) 、遺伝子又は蛋白質のレベル、発現、プロセシング又は機能を調節するための組成物及び方法を提供する。

10

#### 【0257】

幾つかの態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することによりイン - ビボでオリゴヌクレオチドを細胞に送達する方法を提供する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは療法的オリゴヌクレオチドである。

#### 【0258】

したがって、幾つかの態様において、本発明は、生理的条件下で標的核酸配列にハイブリダイズできる少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを有するHES - オリゴヌクレオチド複合体を含んで成る組成物、例えば医薬組成物を提供する。

20

#### 【0259】

幾つかの態様において、本発明は、対象にオリゴヌクレオチドを送達する方法を提供する。特定の態様において、本発明は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成る、対象に療法的オリゴヌクレオチドを送達する方法を提供し、ここで、当該複合体は、標的RNA ( 例えば、mRNA及びmiRNA ) 及び標的遺伝子を調節するのに十分な、療法的有効量のオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0260】

1つの態様に従えば、本発明は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成る、対象において標的核酸を調節する方法を提供し、ここで、当該複合体のオリゴヌクレオチドは、標的核酸に対して実質的に相補的な、当該核酸に特異的にハイブリダイズしそしてそのレベルを調節し又はそのプロセシング若しくは機能を妨害する配列を含んで成る。幾つかの態様において、標的核酸はRNAであり、更なる態様において、RNAはmRNA又はmiRNAである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、対象の1又は複数の細胞又は組織において、標的RNAのレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%、低下させる。幾つかの態様において、標的核酸はDNAである。

30

#### 【0261】

1つの態様に従えば、本発明は、HES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成る、対象において蛋白質を調節する方法を提供し、ここで、当該複合体のオリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードしそして当該蛋白質の転写、翻訳、生産、プロセシング又は機能に影響を与える核酸に対して実質的に相補的な配列を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはRNAに特異的にハイブリダイズする。更なる態様において、RNAはmRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、対象の1又は複数の細胞又は組織において、蛋白質又はRNAのレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%又は少なくとも50%、低下させる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DNAに特異的にハイブリダイズする。

40

#### 【0262】

特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗 - miRNA、ダイサー基質 ( 例えば、dsRNA ) 、アプタマー、デコイ、

50

アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びsiRNA、miRNA又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、RNA、又はRNAをコードする配列に特異的にハイブリダイズする。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、RNAをコードするDNA配列又はその制御配列に特異的にハイブリダイズする。

#### 【0263】

追加の態様において、核酸又は蛋白質の発現は、対象において、当該対象を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体と接觸させることにより調節される。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNAに結合する場合、RNase Hの基質である。幾つかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマー(gapmer)である。本明細書で使用される場合、「ギャップマー」は、2つ外部隣接領域(「ウイング」又は「ウイングセグメント」とも称される)の間に位置する中央領域(「ギャップ」又は「ギャップセグメント」とも称される)を有するアンチセンス化合物である。

10

#### 【0264】

これらの領域は、各異なる領域を構成する糖成分のタイプにより区別される。ギャップマーの領域を区別するために用いられる糖成分のタイプには、幾つかの態様において、-D-リボヌクレオシド、-D-デオキシヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド(例えば、特に、2'-修飾ヌクレオシドには2'-MOE、2'-フルオロ及び2-O-CH<sub>3</sub>が含まれよう)及び二環糖修飾ヌクレオシド(特に、このような二環糖修飾ヌクレオシドにはLNA(TM)又はENA(TM)が含まれよう)が含まれる。

20

#### 【0265】

幾つかの態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドの各ウイングは、同じ数のサブユニットを含んで成る。他の態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドの一方のウイングは、当該ギャップマーの他方のウイングとは異なる数のサブユニットを含んで成る。1つの態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドのウイングは、独立に、1~5ヌクレオシドを有し、その1, 2, 3, 4又は5のウイングヌクレオシドは糖修飾ヌクレオシドである。1つの態様において、中央又はギャップ領域は、8~25の-D-リボヌクレシド又は-D-デオキシリボヌクレオシドを含む(すなわち、8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24又は25ヌクレオシドの長さである)。更なる態様において、中央又はギャップ領域は、17~24のヌクレオチドを含む(すなわち、17, 18, 19, 20, 21, 22, 23又は24ヌクレオシドの長さである)。

30

#### 【0266】

幾つかの態様において、ギャップマー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、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、又はホスホジエステルヌクレオチド間結合とホスホロチオエートヌクレオチド間結合との組合せを含んで成る。特定の態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドの中央領域は、少なくとも2, 3, 4, 5又は10の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。特定の態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドの中央領域は、少なくとも10の-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシリヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの中央領域中の各ヌクレオシドは、-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシリヌクレオシドである。

40

#### 【0267】

1つの態様において、ギャップマーオリゴヌクレオチドは、標的RNAに対して長さ相補性にわたって十分に相補的である。1つの態様において、ギャップマーの一方又は両方のウイングは、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオシドを含む。1つの態様において、ギャップマーの一方又は両方のウイングは、1, 2又は3個の2'-MOE修飾ヌクレオシドを含む。1つの態様において、ギャップマーの一方又は両方のウイングは、1, 2又は3個の2'-OCH<sub>3</sub>修飾ヌクレオシドを含む。他の態様において、ギャップマーの一方又は両方のウイングは、1, 2又は3個のLNA又はLNAヌクレオシドを含む。

50

## 【0268】

幾つかの態様において、ギャップマーのウイング中のLNA又はLNAは、LNAの6' (2',4'-拘束された-2'-O-エチルBNA, S-cEt) 又は5' - 位 (-5'-Me-LNA又は-5'-Me-LNA) に (R) 又は (S) 配置で1又は複数のメチル基を含むか、或いはLNA又はLNA中の2' - 酸素原子の代わりに置換された炭素原子を含む。更なる態様において、ギャップマー中のLN A又はLNAは、5'位に立体的バルク成分(例えば、メチル基)を含む。更なる態様において、ギャップは、少なくとも1つの2'フルオロ修飾ヌクレオシドを含んで成る。追加の態様において、ウイングはそれぞれ、2又は3ヌクレオシドの長さであり、そしてギャップ領域は19ヌクレオシドの長さである。追加の態様において、ギャップマーは少なくとも1つの5' - メチルシトシンを有する。

10

## 【0269】

他の態様において、中央領域(ギャップ)のヌクレオシドは、外部ウイング領域の一方又は両方の糖成分とは異なる均一な糖成分を含む。1つの非限定的な例において、ギャップは、第一の2' - 修飾ヌクレオシドから均一に構成され、そしてウイングのそれぞれは、第二の2' - 修飾オリゴヌクレオシドから均一に構成される。例えば、1つの態様において、中央領域は、2つの2' - MOE修飾ヌクレオチドをそれぞれが有する外部領域に、各末端において接する2' - F修飾ヌクレオチド(2'-MOE/2'-F/2'-MOE)を含む。特定の態様において、ギャップマーはISIS 393206である。他の態様において、中央領域は、2つの2' - MOE修飾ヌクレオチドをそれぞれが有する外部領域に、各末端において接する2' - F修飾ヌクレオチド(2'-MOE/2'-F/2'-MOE)を含む。

20

## 【0270】

特定の態様において、外部領域のそれぞれは、ギャップマーのウイングにおいて、2つのLNA又はLNAを有する。更なる態様において、LNA又はLNA修飾ヌクレオシドは、LNAの6' (2',4'-拘束された-2'-O-エチルBNA, S-cEt) 又は5' - 位 (-5'-Me-LNA又は-5'-Me-LNA) に (R) 又は (S) 配置で1又は複数のメチル基を含むか、或いはLNA又はLNA中の2' - 酸素原子の代わりに置換された炭素原子を含む。

30

## 【0271】

他の態様において、本発明は、miRNA又はmiRNAファミリーと関連する1又は複数の状態の処理のための組成物の製造における、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体の使用を提供する。

30

## 【0272】

1つの態様において、当該方法は、標的遺伝子又はRNA(例えば、mRNA及びmiRNA)の発現を調節しそして疾患又は障害に関連する1又は複数の状態又は症状を処理するのに十分な量に本発明のHES - オリゴヌクレオチドを対象に投与し又は接触させる段階を含んで成る。本発明の例示的化合物は、遺伝子、mRNA又は小さい非 - コードRNA標的の発現、活性又は機能を効果的に調節する。好ましい態様において、小さい非 - コードRNA標的は、miRNA、プレ - miRNA、又はポリシストロン性若しくはモノシストロン性pri-miRNAである。追加の態様において、小さい非 - コードRNA標的は、miRNAファミリーの1メンバーである。更なる態様において、miRNAファミリーの2又はそれより多くのメンバーが調節のために選択される。

40

## 【0273】

追加の態様において、本発明は、対象において標的核酸の活性を阻害する方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含んで成るHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んで成り、当該オリゴヌクレオチドは、当該核酸を含んで成るか又はコードする核酸に標的化され、そして細胞において当該核酸のレベルを低下させそして/又はその機能を妨害するものである。特定の態様において、標的核酸は、小さい非 - コードRNA、例えばmiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸に実質的に相補的な配列を含んで成る。

## 【0274】

幾つかの態様において、本発明は、標的RNA発現を低下させる必要のある対象において

50

標的RNAの発現を低下させる方法を提供し、当該方法は、アンチセンスHES - オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与することを含んで成る。特定の態様において、当該複合体中のオリゴヌクレオチドは、前記標的mRNAに結合する場合、RNase Hの基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはギャックマーである。

【0275】

追加の態様において、本発明は、標的RNA発現を低下させる必要のある対象において標的RNAの発現を低下させる方法であり、当該方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与することを含んでなり、ここで、当該アンチセンス配列は、標的RNAに特異的にハイブリダイズするものである。特定の態様において、当該HES - オリゴヌクレオチド複合体中のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、前記標的mRNAに結合する場合、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは18~24ヌクレオチドの長さであり、11より多くの連続する2' - デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んで成り、当該第1及び第2ウイング領域のそれぞれは独立して1~8個の2'-O-2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。

10

【0276】

他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNA(例えば、mRNA及びmiRNA)に結合する場合、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2' - 位での修飾を含んで成る少なくとも1つの修飾された糖成分を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位における修飾を含んで成る修飾された糖成分を含んで成る。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含んで成る。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含んで成る。幾つかの態様において、モルホリノは、ホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはホスホロジアミデートモルホリノ(例えば、PMO)に対応する。

20

【0277】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド以内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブルダイズすることができる。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)中の3' - 非翻訳領域を標的にするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA(すなわち、mRNA中のmiRNA 3'UTR標的部位)を標的にするように設計される。このような例の1つは、「miR-Mask」又は「標的プロテクター」であり、これらは、標的mRNA上のmiRNA結合部位へのmiRNAの接近を覆う、特異的標的mRNAの3' - UTR中の予想されるmiRNA結合部位に対して十分に相補的である1本鎖2'-O-メチル-修飾(又は他の化学修飾)されたアンチセンスオリゴヌクレオチドである(例えば、Choi et al (2007) Science 318:271; Wang (2011) Methods Mol. Biol. 676:43、を参照のこと)。

30

40

【0278】

更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるmRNA中の3'非翻訳配列を模倣するように設計される。このような例の1つが、「miRNA sponge」、すなわち、対応するmiRNAと安定に相互作用し、そして内因性標的mRNAと標的miRNAとの会合を回避する、内因性miRNAのために、競争的miRNA阻害性トランスジーン発現多タンデム結合部位である。追加の態様において、核酸はmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン/エキソン連結部、標的RNAのイントロン/エキソン連結部及び5'の1~50ヌクレオ塩基領域、から成る群から選択されるRNAの標的領域に特異的にハ

50

イブリダイズ可能である。

【0279】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1～15ヌクレオ塩基領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20～24ヌクレオ塩基領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30～50ヌクレオ塩基領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1-10(すなわち、シード領域)に特異的にハイブリダイズする、又は前駆体miRNA(pre-miRNA)又は一次miRNA(pri-miRNA)であって、オリゴヌクレオチドにより結合された場合にmiRNAのプロセシングをブロックするものを含む。

【0280】

他の態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなる、蛋白質の生産を阻害する方法を提供し、当該オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードする核酸に標的化され、又は対象における当該蛋白質の内因性発現、プロセシング又は機能を低下させるものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードする核酸に対して実質的に相補性の配列を含んでなる。

【0281】

幾つかの態様において、本発明は、オリゴヌクレオチド配列を有するHES-オリゴヌクレオチド複合体に標的RNAを発現する細胞を接触させることにより、細胞における標的細胞性RNA又は対応する蛋白質の量を減少させる方法を提供し、前記オリゴヌクレオチド配列は標的RNAに特異的にハイブリダイズするものであり、標的RNA又は対応する蛋白質の量が減少する。幾つかの態様において、RNAはmRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質(例えば、dsRNA)、デコイ、アプタマー、デコイ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びsiRNA、miRNA、抗-miRNA、リボザイム又はアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。

【0282】

特定の態様において、HES-オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNAに結合する場合、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18～24ヌクレオチドの長さであり、11個より多くの連続する2'-デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1～8個の2'-0-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12～30のリンクしたヌクレオシドを有する。

【0283】

他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的RNA(例えば、mRNA又はmiRNA)に結合する場合にRNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-位に修飾を含んでなる少なくとも1つの修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'位に修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAモチーフを含んでなる。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットはPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノモチーフを含んでなる。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロジアミデートモルホリノを含んでなる。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットはモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットはホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。

【0284】

10

20

30

40

50

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内いの配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAに結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的的のするように設計される。追加の態様において、標的RNAはmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン／エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン／エキソン連結部及びイントロン／エキソン連結部の5'の1～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択されるmRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

## 【0285】

10

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1～15ヌクレオ塩基の領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20～24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1～10（すなわち、シード領域）に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体 - miRNA（pre-miRNA）又は一次 - miRNA（pri-miRNA）であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをブロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0286】

20

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害（interference）（RNAi）を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー（Dicer）基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18～35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19～29ヌクレオチドの長さのステム及び4～30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれが18～25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

30

## 【0287】

追加の態様において、本発明は、標的RNAの低下した発現を必要とする対象において標的RNAの発現を低下させる方法を提供し、当該方法は、標的RNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド配列を有するHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなり、ここで、対象の細胞又は組織中で標的RNAの発現が低下する。幾つかの態様において、RNAはmRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アプタマー、デコイ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。

40

## 【0288】

特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNA（例えば、mRNA又はmiRNA）に結合する場合、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18～24ヌクレオチドの長さであり、11個より多くの連続する2' - デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1～8個の2' - O-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチ

50

ドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12～30のリンクしたヌクレオシドを有する。

【0289】

他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNA（例えば、mRNA又はmRNA）に結合する場合にRNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2' - 位に修飾を含んでなる少なくとも1つの修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位に修飾を含んでなる少なくとも1つの修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのPNAモチーフを含んでなる。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノモチーフを含んでなる。幾つかの態様において、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）に対応する。

10

【0290】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド以内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブルダイズすることができる。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）中の3' - 非翻訳配列を標的にするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNAの3'非翻訳配列を標的にするように設計される。追加の態様において、標的RNAはmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン／エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン／エキソン連結部及びイントロン／エキソン連結部の5'の1～50ヌクレオチドの領域、から成る群から選択される標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

20

【0291】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1～15ヌクレオ塩基の領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20～24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1～10（すなわち、シード領域）に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体 - miRNA（pre-miRNA）又は一次 - miRNA（pri-miRNA）であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをブロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

30

【0292】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害（interference）（RNAi）を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー（Dicer）基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18～35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19～29ヌクレオチドの長さのステム及び4～30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれそれが18～25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

40

【0293】

50

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、標的核酸（例えば、遺伝子、mRNA又はmiRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを送達するために対象に投与され、これは腫瘍細胞についての増殖の利点を提供し、又は微生物の複製を増強する。他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、アンチセンス、siRNA、shRNA、ダイサー基質又はmiRNAであって疾患において関連した蛋白質（例えば蛋白質バリアント）をコードするものを送達するために投与される。したがって、幾つかの態様において、本発明は、例えば、異常な遺伝子発現のために疾患状態に悩む生物において遺伝子を沈黙させるために、特定の核酸配列を生きた細胞に輸送するシステムのイン - ビボ送達系を提供する。

## 【0294】

10

幾つかの態様において、本発明は、細胞中の注目のポリペプチドの量を減少させる方法を提供し、当該方法は、当該ポリペプチドをコードする核酸又はその相補体を発現する細胞を、オリゴヌクレオチド配列を有するHES - オリゴヌクレオチド複合体と接触させることを含んでなり、当該オリゴヌクレオチド配列は、当該ポリペプチドをコードするDNA又はmRNAに特異的にハイブリダイズするものであり、こうして当該注目のポリペプチドの発現が低下する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、そしてここで当該オリゴヌクレオチドは前記ポリペプチドをコードする核酸又はその相補体と特異的にハイブリダイズし、ポリペプチドの発現が低下する。

20

## 【0295】

特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12 ~ 30の連結されたヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、複合体は2本鎖RNA (dsRNA) を含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾されたオリゴヌクレオチドを含んでなる。更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、2'修飾（例えば、2' - フルオロ、2 - OME及び2 - メトキシエチル (2-MOE) ）、ロックされた核酸（LNA及びLNA）、PNAモチーフ及びモルホリノモチーフ、から選択される少なくとも1つの修飾されたオリゴヌクレオチドモチーフを含んでなる。

## 【0296】

30

特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、アンチセンス配列であり、そして標的RNAに結合するときRNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、ギャップマーは、キメラオリゴヌクレオチドであるアンチセンスオリゴヌクレオチドである。幾つかの態様において、キメラオリゴヌクレオチドは、5'及び3'ウイングセグメントの間に配置される2' - デオキシヌクレオチド中央ギャップ領域を含んでなる。ウイングセグメントは、少なくとも1つの2' - 修飾された糖を含んでなるヌクレオシドを含む。ウイングセグメントは、2' - 0 - メトキシエチル糖成分又は二環核酸糖成分から選択される少なくとも1つの2'糖成分を含むヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、ギャップセグメントは、10個の2' - デオキシリボヌクレオチドの長さであり、そしてウイングセグメントのそれぞれは、5個の2' - 0 - メトキシエチルヌクレオチドの長さである。キメラオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合から均一に構成される。さらに、キメラオリゴヌクレオチドの各シトシンは5' - メチルシトシンであることができる。

40

## 【0297】

他の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはRNAにハイブリダイズするとき、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位に修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットはPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様におい

50

て、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーウニットはモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーウニットはホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）に対応する。

【0298】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン／エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン／エキソン連結部及びイントロン／エキソン連結部の5'の1～50ヌクレオチドの領域、から成る群から選択される標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

10

【0299】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1～15ヌクレオ塩基の領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20～24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1～10（すなわち、シード領域）に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体-miRNA（pre-miRNA）又は一次-miRNA（pri-miRNA）であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

20

【0300】

更なる態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害（interference）（RNAi）を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー（Dicer）基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18～35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19～29ヌクレオチドの長さのステム及び4～30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

30

【0301】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれそれが18～25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

30

【0302】

追加の態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなる、対象において核酸の活性を増加させる方法を提供し、当該オリゴヌクレオチドは、当該核酸を含んでなるか又はそれをコードし、或いは当該核酸の内因性発現、プロセシング又は機能を上昇させ（例えば、当該核酸をコードする遺伝子中の制御配列と結合することによる）、そして細胞における当該核酸のレベルを上昇させ、そして/又はその機能を上昇させるものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該核酸を含んでなるか又はそれをコードする核酸と実質的に同じ配列を含んでなる。

40

【0303】

他の態様において、本発明は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複

50

合体を対象に投与することを含んでなる、蛋白質の生産を増加させる方法を提供し、当該オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードし又は対象において当該蛋白質の内因性発現、プロセシング又は機能を増加させるものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードする核酸と実質的に同じ配列を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードする内因性核酸配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたるヌクレオチドと、100%の同一性を共有する。

#### 【0304】

本発明はまた、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなる、対象における核酸の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理する方法を含み、当該オリゴヌクレオチドは、核酸を含んでなるか又はそれをコードする核酸に標的化され、そして対象において、核酸のレベルを低下させ、そして/又はその機能を妨害するものである。幾つかの態様において、前記核酸はDNA、mRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。

10

#### 【0305】

特定の態様において、核酸はRNAであり、そしてHES - オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズするときRNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~24ヌクレオチドの長さを有し、11個より多くの連続する2' - デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1~8個の2'-0-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12~30の連結されたオリゴヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記核酸に実質的に相補的な配列を含んでなる。

20

#### 【0306】

他の態様において、オリゴヌクレオチドは、核酸に結合したとき、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位での修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様において、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。

30

#### 【0307】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、核酸はmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン/エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン/エキソン連結部及びイントロン/エキソン連結部の5'の1~50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

40

50

## 【0308】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1~15ヌクレオ塩基の領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20~24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30~50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1~10(すなわち、シード領域)に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体-miRNA(pre-miRNA)又は一次-miRNA(pri-miRNA)であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをブロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0309】

10

更なる態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害(interference)(RNAi)を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー(Dicer)基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19~29ヌクレオチドの長さのスレム及び4~30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

## 【0310】

20

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれが18~25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

## 【0311】

30

更なる態様において、本発明は、対象における蛋白質の過剰発現により特徴付けられる疾患又は障害の処理方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなり、当該オリゴヌクレオチドは、前記蛋白質をコードする核酸に標的化されており、又は対象における当該蛋白質の内因性発現、プロセシング又は機能を低下させるものである。幾つかの態様において、核酸はDNA、mRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アプタマー、デコイ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、蛋白質をコードする内因性核酸配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり、100%の同一性を共有する。

## 【0312】

40

特定の態様において、標的化される核酸はRNAであり、そしてHES-オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズするとき、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~24ヌクレオチドの長さを有し、11個より多くの連続する2'-デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1~8個の2'-O-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12~30の連結されたヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記核酸に実質的に相補的な配列を含んでなる。

## 【0313】

50

他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的RNA(例えば、mRNA及びmiRNA)に結合

したとき、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2' - 位での修飾を含んでなる少なくとも1つの修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは2' - 位での修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットがPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様において、モルホリノはホスホジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットがモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアニットがホスホジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。

10

#### 【0314】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列(例えば、AUG開始コドンの30ヌクレオチド以内)に特異的にハイブリダイズし、そして翻訳を低下させる。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、核酸はmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン/エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン/エキソン連結部及びイントロン/エキソン連結部の5'の1~50ヌクレオチドの領域、から成る群から選択される、蛋白質をコードする標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

20

#### 【0315】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン/エキソン連結部の5'の1~15ヌクレオ塩基の領域、イントロン/エキソン連結部の5'の20~24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン/エキソン連結部の5'の30~50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1~10(すなわち、シード領域)に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体-miRNA(pre-miRNA)又は一次-miRNA(pri-miRNA)であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをブロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

30

#### 【0316】

更なる態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害(interference)(RNAi)を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー(Dicer)基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19~29ヌクレオチドの長さのステム及び4~30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

40

#### 【0317】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれそれが18~25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

#### 【0318】

本発明はまた、対象における蛋白質の異常な発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理する(例えば、軽減する)方法を含み、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を対象に投与することを含んでなり、当該オリゴヌクレオチ

50

ドは、当該蛋白質をコードするmRNAに特異的にハイブリダイズし、そして標的RNAのスプライシングを変更する（例えば、エキソンスキッピングを促進する）ものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2' - 位における修飾を含んでなる少なくとも1つの修飾された糖成分を含んでなる。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは2'OME又は2'アリルである。追加の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドはLNA、LNA（例えば、5'位に立体的バルク成分（例えば、メチル基）を含むLNA又はLNA）である。

## 【0319】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様において、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがホスホロジアミデートモルホリノ（PMO）に対応する。

## 【0320】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA（例えば、mRNA）中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン／エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン／エキソン連結部及びイントロン／エキソン連結部の5'の1～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、標的領域は、イントロン／エキソン連結部の5'の1～15ヌクレオ塩基の領域、イントロン／エキソン連結部の5'の20～24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン／エキソン連結部の5'の30～50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。

## 【0321】

特定の態様において、疾患又は障害はジュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne Muscular Dystrophy；DMD）である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ジストロフィン（dystrophin）遺伝子のエキソン44、45、50、51、52、53又は55を「スッキプオーバー」するメッセージスプライシングを促進する、mRNA配列に特異的にハイブリダイズする。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、ジストロフィン（dystrophin）遺伝子のエキソン51を「スッキプオーバー」するメッセージスプライシングを促進する、mRNA配列に特異的にハイブリダイズする。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドはAVI-4658（AVI Biopharma）である。他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、mRNAがジストロフィンAVI-4658と結合するとの競争する。

## 【0322】

本発明の更なる態様は、疾患又は障害の診断を受けた対象を選択し、当該対象にオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体の療法的有効量を投与することを含んでなる方法を提供し、当該オリゴヌクレオチドは、疾患若しくは障害又はそれに関連する状態と関連するか又はそれに関連する蛋白質をコードすると信じられる核酸配列に特異的にハイブリダイズするものである。

## 【0323】

幾つかの態様において、核酸はDNA、mRNA又はmiRNAである。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アプタマー、デコイ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセン

10

20

30

40

50

スオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、核酸配列の少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり、100%の同一性を共有する。

【0324】

特定の態様において、核酸はRNAであり、そしてHES - オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズするとき、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~24ヌクレオチドの長さを有し、11個より多くの連続する2' - デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1~8個の2'-0-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12~30の連結されたオリゴヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記核酸に実質的に相補的な配列を含んでなる。

10

【0325】

他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的RNA(例えば、mRNA及びmiRNA)に結合したとき、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2' - 位での修飾を含んでなる修飾された少なくとも1つの糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオシドは2' - 位での修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアユニットがPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様において、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアユニットがモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーアユニットがホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。

20

【0326】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的RNAのイントロン/エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン/エキソン連結部及びイントロン/エキソン連結部の5'の1~50ヌクレオチドの領域、から成る群から選択されるmRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。

30

【0327】

幾つかの態様において、標的領域は、イントロン/エキソン連結部の5'の1~15ヌクレオ塩基の領域、イントロン/エキソン連結部の5'の20~24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン/エキソン連結部の5'の30~50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、miRNAのヌクレオチド1~10(すなわち、シード領域)に特異的にハイブリダイズするか、或いは前駆体-miRNA(pre-miRNA)又は一次-miRNA(pri-miRNA)であってオリゴヌクレオチドにより結合される場合にmiRNAプロセシングをロックするもの中の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

40

【0328】

更なる態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害(interference)(RNAi)を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー(Dicer)基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~35ヌ

50

クレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19~29ヌクレオチドの長さのステム及び4~30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

## 【0329】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれぞれが18~25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

10

## 【0330】

他の態様において、本発明は、蛋白質の過剰発現と関連する疾患又は障害に罹患している対象において疾患の進行を遅くする方法を提供し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与することを含んでなり、当該オリゴヌクレオチドは、当該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに特異的にハイブリダイズして、当該ポリペプチドの発現を低下せしめるものである。追加の態様において、追加の態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA、miRNA、抗-miRNA、ダイサー基質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、並びにsiRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択される。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、蛋白質をコードするDNA又はmRNAの少なくとも15の連続するヌクレオチド、少なくとも20の連続するヌクレオチド、又は全長にわたり、100%の同一性を共有する。

20

## 【0331】

特定の態様において、核酸はmRNAであり、そしてHES-オリゴヌクレオチド中のオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。1つの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAにハイブリダイズするとき、RNase Hの基質である。追加の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはギャップマーである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~24ヌクレオチドの長さを有し、11個より多くの連続する2'-デオキシリボヌクレオチドを有するギャップ領域、並びに当該ギャップ領域を挟む第1ウイング領域及び第2ウイング領域を含んでなり、ここで、前記第1及び第2ウイング領域のそれぞれは、独立に、1~8個の2'-O-(2-メトキシエチル)リボヌクレオチドを有する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、12~30の連結されたオリゴヌクレオシドを含む。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、前記核酸に実質的に相補的な配列を含んでなる。

30

## 【0332】

他の態様において、オリゴヌクレオチドは、標的RNA(例えば、mRNA及びmiRNA)に結合したとき、RNase Hの基質ではない。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-位での修飾を含んでなる修飾された少なくとも1つの糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは2'-位での修飾を含んでなる修飾された糖成分を含んでなる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのPNAモチーフを含む。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがPNAに対応する。他の態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのモルホリノモチーフを含む。幾つかの態様において、モルホリノはホスホロジアミデートモルホリノである。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがモルホリノに対応する。更なる態様において、オリゴヌクレオチドの全てのモノマーユニットがホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)に対応する。

40

## 【0333】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのAUG開始コドンの30ヌクレオチド内の配列に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、オリゴヌクレオ

50

チド配列は、標的RNAの5'非翻訳領域中の配列に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、RNA(例えば、mRNA)中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。更なる態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、miRNAにより結合されるRNA中の3'非翻訳配列を標的とするように設計される。追加の態様において、核酸はmRNAであり、そしてオリゴヌクレオチド配列は、標的RNAのイントロン/エキソン連結部、並びに標的RNAのイントロン/エキソン連結部及びイントロン/エキソン連結部の5'の1~50ヌクレオチドの領域、から成る群から選択される標的mRNAの標的領域に特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、標的領域は、イントロン/エキソン連結部の5'の1~15ヌクレオ塩基の領域、イントロン/エキソン連結部の5'の20~24ヌクレオ塩基の領域、及びイントロン/エキソン連結部の5'の30~50ヌクレオ塩基の領域、から成る群から選択される。

10

#### 【0334】

更なる態様において、オリゴヌクレオチドはRNA妨害(interference)(RNAi)を誘導することができる。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、siRNA、shRNA又はダイサー(Dicer)基質である。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、18~35ヌクレオチドの長さのsiRNAである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、19~29ヌクレオチドの長さのステム及び4~30ヌクレオチド間のループサイズを有するshRNAである。更なる態様において、siRNA又はshRNAオリゴヌクレオチドは、1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

20

#### 【0335】

幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドはダイサー基質であり、そしてそれぞれが18~25ヌクレオチドの長さの2本の核酸鎖を含み、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。特定の態様において、ダイサー基質は、21ヌクレオチドの長さを有し、そして2ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む2本鎖核酸である。更なる態様において、ダイサー基質の一方又は両方の鎖は1又は複数の修飾されたヌクレオシド、修飾されたヌクレオシド間結合、又はこれらの組み合わせを含む。

20

#### 【0336】

##### miRNA-関連病状に対する療法的適用

miRNA又はmiRNAのファミリーにより制御されることが知られており、本願発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体を用いて制御され得る病的状態の若干の個別のグループが、現在、存在する。

30

#### 【0337】

1つの態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、感染性疾患と関連する1又は複数のmiRNAの阻害剤又は模倣物である。1つの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドはmiR-122を阻害する。ミラビルセン(Miravirsen)(SPC3649)、Santaris Pharma A/Sにより開発されたmiR-122の阻害剤、Mir-122は、肝炎Cウイルスが必須の内因性宿主因子として複製のために必要とする肝臓特異的miRNAである。4週間のミラビルセン単一療法についての臨床試験データは、強力な投与量依存性抗ウイルス活性を示している。Regulus Therapeutics and G IaxoSmithKline(GSK)は同様に、前臨床試験において、miR-122がHCVの複製において必須であることを示しており、そしてHCV感染の治療のための臨床試験に進むことを計画している。

40

#### 【0338】

他の態様において、HES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、線維症と関連するmiRNAの阻害剤又は模倣物である。1つの態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-21を阻害する。Regulus Pharmaceutical and Sanofi Aventisによる前臨床研究は、ヒトの線維組織において上方制御されるmiR-21の阻害が、心臓及び腎臓を含めての線維症の多くのモデルにおいて器官の機能を改良することができることを示している。他の態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-29に対応し又はそれを模倣する。Mirna

50

TherapeuticsによるMGN-4220、模倣物又はmiRNA置換療法は、心筋線維症に関連するmiR-29を標的とする。

【0339】

他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、発作、心臓疾患、アテローム性硬動脈化症、再狭窄、血栓症、貧血、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、果粒球減少症、汎血球減少症、特発性血小板減少性紫斑病を含むがこれらに限定されない心臓血管系疾患に関連するmiRNAの阻害剤又は模倣物である。1つの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-33を阻害する。Regulus Pharmaceutical and AstraZenecaは、前臨床研究において、miR-33の阻害が、動脈プラークサイズ (arterial plaque size) を減少させ、そしてHDLのレベルを上昇させることを示している。10

【0340】

他の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-92、miR-378、miR-206及び/又はmiR-143/145ファミリーを阻害する。Miragen Therapeuticsにより開発されたMGN-6114、MGN-5804、MGN-2677、MGN-8107は、それぞれ、抹消動脈疾患に関連するmiR-92、心臓代謝性疾患に関連するmiR-378、心臓疾患に関連するmiR-143/145ファミリー、及び筋萎縮性側索硬化症に関連するmiR-206を標的とする。

【0341】

更なる態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-208/209ファミリー及び/又はmiR-15/195ファミリーを阻害する。Miragen TherapeuticsのMGN-9103及びMGN-1374は、miRNA阻害剤であって、それぞれ、慢性心不全についてのmiR-208/209ファミリー及び心筋梗塞後のリモデリングに関連するmiR-15/195を標的にする。他の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-126及び/又はmiR-92aを阻害する。miR-126及びmiR-92aは、アテローム性斑の発達において中心的役割を演ずる。20

【0342】

他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、神経性疾患又は障害に関連するmiRNAの阻害剤である。1つの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-206を阻害する。miR-206は、ALS及び神経筋シナップス再生 (neuromuscular synapse regeneration) において必須の役割を演ずる。30

【0343】

他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、癌状態に関連するmiRNAの阻害剤又は模倣物である。1つの態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-21を阻害する。miR-21が、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、前立腺癌、肺癌及び脳腫瘍を含めての癌の阻害及び進行において重要な役割を演することが、多くの科学刊行物により示唆されている。肝細胞癌 (HCC) マウスモデルにおける抗 - miR-21が、遅れた腫瘍の進行を示すことが、Regulus Pharmaceutical及びSanofi Aventisの前臨床研究において示されている。

【0344】

他の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-10bを阻害する。Regulus Pharmaceuticalによる抗 - miR-10bの前臨床動物実験もまた、GBMモデルにおける療法効果を示した。追加の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-34に対応し又はそれを模倣する。殆どの固体及び肝性悪性腫瘍において失われ又は低下したレベルで発現されるmiR-34の、Mirna Therapeuticsによる模倣又はmiRNA置換療法は、MRX34の前臨床研究において種々のタイプの癌について増殖の阻害を示した。40

【0345】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7a、miR-9、miR-10b、miR-15a、miR-16-1、miR-16、miR-21、miR-24、miR-26a、miR-3

10

20

30

40

50

4a、miR-103-107、miR-122、miR-133、miR-181、miR-192、miR-194、miR-200から選択されるmiRNAの阻害剤である。これらのミクロRNAは特に、癌と関連することが報告されているものである。

#### 【0346】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7、let-7a、let-7f、miR-1、Mir-10b、miR-15a、miR-16-1、Mir-17-5p、Mir-17-92、miR-21、Mir-23-27、miR-25、miR-27b、miR-29、miR-30a、Mir-31、miR-34a、miR-92-1、miR-106a、miR-125、Mir-126、Mir-130a、Mir-132、miR-133b、Mir-155、miR-206、Mir-210、Mir-221/222、miR-223、Mir-296、miR-335、Mir-373、Mir-378、miR-380-5p、Mir-424、miR-451、miR-486-5p、及びMir-520cから選択されるmiRNAを阻害する。これらのミクロRNAは特に、癌の新生血管形成、転移及び／又は開始を促進することが報告されている。  
10

#### 【0347】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-15ファミリー、miR-21、miR-23、miR-24、miR-27、miR-29、miR-33、miR-92a、miR-145、miR-155、miR-199b、miR-208a/bファミリー、miR-320、miR-328、miR-499から選択されたmiRNAを阻害する。これらのミクロRNAは特に、心臓血管機能において種々の役割を有する。

#### 【0348】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7b、miR-9、miR106b-25クラスター、miR-124、miR-132、miR-137、miR-184から選択されるmiRNAを阻害する。これらのミクロRNAを特に、神経幹細胞（NSC）における成人神経発生の種々の役割を有することが報告されている。  
20

#### 【0349】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7a、miR-21、mir-26、miR-125b、mir-145、miR-155、miR-191、miR-193a、miR-200ファミリー、miR-205、miR-221、及びmiR-222から選択されるmiRNAの阻害剤又は模倣物である。これらのミクロRNAは特に、癌の種々のタイプについての、診断的又は予後のバイオマーカーとして機能することが報告されている。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-21、mir-26、miR-125b、miR-155、miR-193a、miR-200ファンミリー、miR-221、及びmiR-222から選択されるmiRNAの阻害剤である。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7a、mir-145、miR-191、及びmiR-205から選択されるmiNAの配列を含み又はそれを模倣する。  
30

#### 【0350】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-138、mir-182、miR-21、mir-103/107、miR-29cから選択されるmiRNAの阻害剤である。これらのミクロRNAは特に、それぞれ、関節炎、狼瘡、アテローム性動脈硬化症、インスリン感受性、及び蛋白尿において役割を有することが報告されている。

#### 【0351】

幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7、let-7-a3、lin-28、miR-1、miR-9-1、miR-15a、miR-16-1、miR-17-92クラスター、miR-21、miR-29ファミリー、miR-34ファミリー、miR-124、miR-127、及びmiR-290から選択されるmiRNAの阻害剤又は模倣物である。これらのミクロRNAは特に、miRNAの発現を担当する遺伝的又は後成的制御における異常性による癌の種々のタイプにおいて調節されないことが報告されている。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7-a3、lin-28、miR-17-92クラスター、及びmiR-21から選択されるmiRNAの阻害剤である。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、let-7、miR-1、miR-9-1、miR-15a、miR-16-1、miR-21、miR-29ファミリー、miR-34ファミリー、miR-124、miR-127、及びmiR-290から選択されるmiRNAの配列を含むか又はそれを模倣する。  
40  
50

## 【0352】

更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、Mir-20a、Mir-34、Mir-92a、Mir-200c、Mir-217及びMir-503から選択されるmiRNAの配列を含むか又はそれを模倣する。これらのmiRNAは特に、血管新生阻害性であることが報告されている。

## 【0353】

追加の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-1、miR-2、miR-6、miR-7又はlet-7の配列を含むか、又はそれを模倣する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、miR-Rx07、miR-Rx06、miR-Rxlet-7、miR-Rx01、miR-Rx02又はmiR-Rx03である。追加の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、miR-451に対応するか、又はそれを模倣する。miR-451は、イン - ビボで赤血球新生を制御することが示されており (Patrick et al., Genes & Dev., 2010)、そしてそれ故に、新生多血症、一般に赤血球障害 (red cell dyscrasias)、又は他の造血性悪性腫瘍、の如き疾患に関連する。特定の態様において、オリゴヌクレオチドはMGN-4893である。

10

## 【0354】

追加の態様において、注目の核酸を標的とするアンチセンス化合物を含んで成る医薬組成物は、当該核酸と関連する疾患又は障害に罹患しているか又は感受性の患者を処理するための組成物の製造のために使用される。

20

## 【0355】

核初期化及びiPSCの生成のためのmiRNAのエクス - ビボ送達

追加の態様において、本発明は、細胞核初期化 (cell nuclear reprogramming) のための方法を提供する。幾つかの態様において、1又は複数のmiRNAの模倣物及び/又は阻害剤を含むHES - オリゴヌクレオチドは、人工多能性幹細胞 (iPSC) 又は胚性幹 (EB) - 様多能性細胞の1又は複数の性質を持つように細胞をプログラムするために、細胞、例えばヒト及びマウスの体細胞にエクス - ビボで投与される (例えば、誘導されたiPSC及び胚様体 (EB) のコロニー形態、中胚葉、内胚葉及び外胚葉を形成する多能性を示すiPSCに由来する奇形腫のqRT-PCR、ヘマトキシリソニン及びエオシン染色により示される初期化された幹細胞株における幹細胞マーカー遺伝子の発現、胚葉特異的分化マーカーの発現を示すiPSC由来奇形腫、SCIDマウスへの移植後の奇形腫形成の免疫組織化学的分析)。本発明の非 - 毒性で且つ高度に効果的なHES - オリゴヌクレオチド送達系は、従来のオリゴヌクレオチド送達方法に比べて細胞を初期化するための送達方法の非常に上昇した効率を提供する (例えば、米国特許公開第2010/0075421号、第2009/0246875号、第2009/0203141号、及び第2008/0293143号を参照のこと)。

30

## 【0356】

本発明の方法に従って体細胞に投与することができ、そしてそれによりiPSCの1又は複数の性質を示すように体細胞を初期化するmiRNA又はmiRNAの模倣物の例には、lin-28、miR-17-92クラスター、miR-93、miR-106b、miR-106b-25クラスター、miR-106a-363クラスター、miR-181a、miR-199b、miR-200c、miR-214、miR-302、miR-367、miR-302-367クラスター、miR-369、miR-371、miR-372、miR-373、及びmiR-520、並びにこれらのmiRNAのファミリーメンバー及び変異体から選択されるmiRNA又はmiRNAの模倣物が含まれる (例えば、Anokye-Danso et al. (2011) Cell Stem Cell 8, 376 ; Miyoshi et al. (2011) Cell Stem Cell 8, 1 ; Subramanyam et al. (2011) Nature Biotechnology, 29:5 ; Li et al. (2011) The EMBO Journal 30:5 ; Lin et al. (2011) Nucleic Acids Research 39:3 ; Lakshmi et al. (2010) Regenerative Medicine 5:4 ; Xu et al. (2009) Cell 137:647 ; Goff et al. (2009) PLoS One 4:9 ; Wilson et al. (2009) Stem Cells Dev. 18:5 ; Chin et al. (2009) Cell Stem Cell 5:1 ; Ren et al. (2009) Journal of Translational Medicine 7:20 ; Lin et al. (2008) RNA 14:21 15、を参照のこと。これらのそれぞれの内容を引用により本明細書に組み入れる)。

40

## 【0357】

50

本発明の方法に従って体細胞に投与することができ、そしてそれによりiPSCの1又は複数の性質を示すように体細胞を初期化するmiRNA又はmiRNAの模倣物の例には、let-7、miR-145、並びにこれらのmiRNAのファミリーメンバー及び変異体から選択されるmiRNAの阻害剤が含まれる（例えば、Lakshmipathy et al (2010) *Regenerative Medicine* 5:4 ; Xu et al. (2009) *Cell* 137:647、を参照のこと。これらのそれぞれの内容を引用により本明細書に組み入れる）。

#### 【0358】

更なる態様において、本発明は、体細胞の初期化を誘導する方法を含み、当該方法は、当該細胞に、上記のmiRNAの1, 2, 3, 4, 5又はそれより多くのmiRNA、miRNA模倣物又はmiRNA阻害剤を含むHES-オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。上記のmiRNAの1, 2, 3, 4, 5又はそれより多くのmiRNA、miRNA模倣物又はmiRNA阻害剤をコードする発現構成物を含むHES-オリゴヌクレオチドの投与を含む、体細胞の初期化を誘導する方法も、本発明に含まれる。10

#### 【0359】

上記のmiRNAの1, 2, 3, 4, 5又はそれより多くのmiRNA、miRNA模倣物又はmiRNA阻害剤をコードする発現構成物を含むHES-オリゴヌクレオチドの投与を含む、体細胞の初期化を誘導する方法も、本発明に含まれる。「発現構成物」は、注目のRNAを転写するように設計された任意の2本鎖DNA又は2本鎖RNAを意味し、例えば、下流遺伝子、コード領域、又は注目のポリヌクレオチド配列に作用可能に連結されている又はされるであろう少なくとも1つのプロモーターを含む構成物（例えば、ポリペプチド又は蛋白質をコードするcDNA又はゲノムDNAフラグメント、又はRNAエフェクター分子、例えばアンチセンスRNA、3本鎖形成RNA、リボザイム、人工的に選択された高親和性RNAリガンド（アプタマー）、2本鎖RNA、例えば、ステム-ループ又はヘアピンdsRNAを含んでなるRNA分子、又は2フィンガー若しくは3フィンガーdsRNA又はミクロRNA、或いは注目の任意のRNA）である。20

#### 【0360】

「発現構成物」は、1又は複数のプロモーターを含んでなる2本鎖DNA又はRNAを包含し、ここで、当該1又は複数のプロモーターは、転写されるべきポリヌクレオチド配列に實際には作用可能に連結されておらず、むしろ、プロモーターにより転写されるべき作用可能に連結されるポリヌクレオチド配列の効果的な挿入のために設計される。受容細胞への発現構成物のトランスフェクション及びトランسفォーメーションは、細胞が、発現構成物によりコードされたRNAエフェクター分子、ポリペプチド又は蛋白質を発現することを可能にする。発現構成物は、遺伝子操作されたプラスミド、ウイルス、組換えウイルス、又は例えば、バクテリオリオファージ、アデノウイルス、アデノ-関連ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスクスウイルス若しくはヘルペスウイルス等に由来する人造染色体、であることができる。発現構成物は生細胞において複製され、又はそれは合成されるであろう。30

#### 【0361】

特定の態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、miRNA、miRNA模倣物及び/又はmiRNA阻害剤のタンデムコピーを含むか又はコードする。例えば、幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、1又は複数のmiRNAs、miRNA模倣物及び/又はmiRNA阻害剤の1又は複数のタンデムコピーをコードし、ここで、コードされた配列は、単一転写ユニットから又は多ポリシストロン性転写ユニットからシス又はトランスで発現され、多数の（例えば、2、3、4、又はそれより多くの）同一の又は異なるmiRNAs、miRNA模倣物及び/又はmiRNA阻害剤を細胞内で生成する（例えば、Chung et al. (2006) *Nucleic Acids Research* 34:7；米国特許第6,471,957号、及び米国特許公開第2006/0228800号及び第2011/0105593号を参照のこと、これらのそれぞれの内容を引用により本明細書に組み入れる）。

#### 【0362】

本発明の方法に従って初期化され得る体細胞は、当業界において知られている技法を用

10

20

30

40

50

いて、初期化された細胞が場合によっては戻し投与される対象を含めて、任意の由来から得ることができる。本発明の方法に従って使用され得る体細胞のヒト及びマウスの由来の例には、ヒト包皮纖維芽細胞、ヒト皮膚纖維芽細胞（HDF）、ヒト脂肪間質細胞（hASC）、種々のヒト癌細胞系、マウス胚纖維芽細胞（MEF）、及びマウス脂肪間質細胞（mASC）が含まれるが、これらに限定されない。

【0363】

幾つかの態様において、本発明の方法は、例えば造血細胞、心筋細胞、肝細胞又はニューロンへの細胞系譜決定を駆動するmiRNA、miRNA模倣物又はmiRNA阻害剤を含むか又はコードする1又は複数のHES-オリゴヌクレオチドを細胞に投与することにより、初期化される体細胞が前駆細胞又は末端細胞系譜に分化するように誘導する段階を含む。

10

【0364】

細胞核初期化オリゴヌクレオチド、例えば或る種のmiRNAを体細胞集団に安全に且つ効果的に送達する本発明のHES-オリゴヌクレオチドの能力は更に、本発明に方法を、従来の核酸送達系により示された低い初期化効率及び細胞毒性の懸念により今日まで妨げられていた、療法的用途のための大きな患者集団からの患者特異的iPSC-様細胞の大規模な高い処理能力に対して、従順なものとする。

【0365】

HES-オリゴヌクレオチドの例示的療法用途

当業者にとって即座に明らかなように、少なくとも部分的に、細胞へのオリゴヌクレオチドの驚くべき高効率でのイン-ビボ送達のため、本発明にHES-オリゴヌクレオチド複合体は、標的核酸並びに蛋白質のレベル及び活性の調節において制限されない用途を有す、そして療法的適用において特に有用である。

20

【0366】

本発明のHES-オリゴヌクレオチドにより処理され得る疾患及び障害の非限定的な例には、増殖性障害（例えば、癌、例えば血液癌（例えば、AML、CML、CLL及び多発性骨髄腫）及び固体腫瘍（例えば、黒色腫、腎臓癌、肺臓癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、NSCLC）、免疫性疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、IBD、乾癬、喘息、自己免疫疾患、例えば関節リュウマチ、多発性硬化症、及びSLE）及び炎症性疾患、神経疾患（例えば、糖尿病性網膜症、デュセンヌ型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、ハンチントン病及び脊髄性筋萎縮病、及び他の神経性疾患）、代謝性疾患（例えば、II型糖尿病、肥満）、心臓血管系疾患（例えば、凝固障害、血栓症、冠動脈疾患、再狭窄、アミロイドーシス、壊血病、貧血、異常ヘモグロビン症、アテローム性動脈硬化、高コレステロール、高グリセリン症）、内分泌関連疾患及び障害（例えば、NASH、糖尿病、尿崩症、アジソン病、ターナー症候群、クッシング症候群、骨粗鬆症）、及び感染性疾患が含まれる。

30

【0367】

したがって、1つの態様において、本発明は、疾患若しくは障害またはその症状に関連する核酸に特異的にハイブリダイズする療法的オリゴヌクレオチドを含む療法的有効量のHES-オリゴヌクレオチドを、疾患を有すると診断された対象に投与することを含んでなる、対象における疾患の処理方法を提供する。

追加の態様において、本発明のHES-オリゴヌクレオチドにより処理される疾患又は障害は、腎臓、肝臓、リンパ腺、脾臓、又は脂肪組織の疾患又は障害である。

40

【0368】

本発明はまた、対象における細胞又は組織への療法的オリゴヌクレオチドの送達をモニターする方法を提供し、当該方法は、療法的オリゴヌクレオチドを含むHES-オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与し、そして当該対象における細胞又は組織の蛍光をモニターすることを含んでなり、ここで対象の細胞又は組織における増加した蛍光により、療法的オリゴヌクレオチドが対象の細胞又は組織に送達されたことが示される。

【0369】

特定の態様において、本発明は、対象における細胞又は組織への療法的オリゴヌクレオチドの送達をモニターする方法を提供し、当該方法は、療法的オリゴヌクレオチドを含む

50

HES - オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与し、そして当該対象における細胞又は組織の蛍光をモニターすることを含んでなり、ここで対象の細胞又は組織における所定の値に増加した蛍光により、療法的有効量の療法的オリゴヌクレオチドが対象の細胞又は組織に送達されたことが示される。特定の態様において、前記所定の値は、細胞への療法的有効量の療法的HES - オリゴヌクレオチドのイン - ビトロでの送達に関連する蛍光の対応する変化から、又は定量的蛍光モデル分析を通して決定される。

【 0 3 7 0 】

本発明はまた、対象における核酸の低発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理する方法を包含し、当該方法は、オリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与することを含んでなり、当該オリゴヌクレオチドは、前記核酸を含むか又はそれをコードし、又は当該核酸の内因性発現、プロセシング又は機能を上昇させ(例えば、当該核酸をコードする遺伝子における制御配列に結合することによる)、そして細胞における当該核酸のレベルを上昇させ、そして/又はその機能を上昇させるものである。幾つかの態様において、オリゴヌクレオチドは前記核酸を含むか又はそれをコードする核酸と実質的に同じ配列を含んでなる。

10

【 0 3 7 1 】

本願発明はまた、対象における蛋白質の低い発現により特徴付けられる疾患又は障害を処理する方法を包含し、当該方法は、当該蛋白質をコードするか、又は対象において当該蛋白質の内因性発現、プロセシング又は機能を増加させるオリゴヌクレオチドを含むHES - オリゴヌクレオチド複合体を前記対象に投与することを含んでなる。

20

【 0 3 7 2 】

他の態様において、本発明は、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチドを、その投与を必要とする対象に投与することにより、癌又は癌に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。「癌」、「腫瘍」又は「悪性腫瘍」は、本明細書において同義語として使用され、そして、細胞の制御されない異常な増殖、局所的に又は血流及びリンパ系を通して体の他の部分に広がる(転移する)侵された細胞の能力、並びに多くの既知の特徴的な構造的及び/又は分子的特徴の何れかにより特徴付けられる多くの疾患の何れかを意味する。「癌性腫瘍」又は「悪性細胞」は、特徴的な構造的性質、分化の欠落、及び侵入及び転移の可能性を有する細胞として理解される。

30

【 0 3 7 3 】

本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体を用いて処理できるであろう癌の例には、固体腫瘍及び血液癌が含まれる。本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体を用いて処理できる癌の追加の例には、乳癌、肺癌、脳癌、骨癌、肝臓癌、腎臓癌、直腸癌、頭癌及び首癌、卵巣癌、造血性癌(例えば、白血病)、及び前立腺癌が含まれる。本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体を用いて処理できる更なる癌の例には、癌腫、リンパ腫、骨髄腫、芽腫、肉腫及び白血病が含まれるが、これらに限定されない。このような癌の更に特定の例には、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非 - 小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸結腸癌、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、及び種々のタイプの頭及び首癌、が含まれるが、これらに限定されない。

40

【 0 3 7 4 】

追加の態様において、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチドは血液癌を処理するために投与される。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、リンパ腫、白血病、骨髄腫、リンパ系腫瘍、膵臓の癌、リンパ腺の癌から選択される癌を処理するために投与される。追加の態様において、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、バーキット(Burkitt)リンパ腫、びまんせい大細胞型リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ホジキン(Hodgkin)リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ組織B細胞リンパ腫、非 - ホジキン(non-Hodgkin)リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、及びT細胞リンパ腫から選択されるリンパ腫を処理するために投与される。

50

## 【0375】

追加の態様において、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、慢性リンパ性白血病、B細胞白血病(CD5+ Bリンパ球)、慢性骨髓性白血病、骨髓性白血病、急性リンパ芽球性白血病、脊髓形成異常、骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、及び二次性白血病から選択される白血病を処理するために投与される。追加の態様において、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチドは、多発性骨髓腫を処理するために投与される。HES - オリゴヌクレオチドを用いて処理され得る他のタイプの癌及び腫瘍は、本明細書に記載されており、又は当業界において知られている。

## 【0376】

特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、AVI-4557 (Cyp 3A4m; AVI Biopharma)、ISIS-2372 (Survivin; ISIS)、Gem-640 (XIAP; Hybridon)、Atu027 (PKN3; Silence Therapeutics)、CEQ508 (B catenin; Marina Biotech)、GEM 231 (PKA RI subunit; Idera)、Affinitak (Aprinocarsen, ISIS 3521/LY900003; PKC-; ISIS/Lilly)、Aezea (OL(I)p53/EL-625; p53; Eleos Pharma)、ISIS 2503 (H-ras; ISIS)、EZ-2968 (Hif-1; Enzon Pharmaceuticals)、G4460/LR 3001 (c-Myb; Inex/Genta)、LErafAON (c-Raf; NeoPharm)、ISIS 5132 (c-Raf; ISIS)、Genasense (Oblimersen/G3139; Bcl-2; Genta)、SPC2996 (Bcl-2; Santaris Pharma)、OGX-427 (Hsp27; ISIS/ OncoGene X)、LY2181308 (Surivin; Lilly)、LY2275796 (EIF4E; Lilly)、ISIS-STAT3 Rx (STAT3; ISIS)、OGX-011 (Custirsen; clusterin; Teva)、Veglin (VEGF; VasGene Therapeutics)、AP12009 (TGF-P2; Antisense Pharma)、GTI-2501 (リボヌクレオチドレダクターゼ RI; Lorus Therapeutics)、Gem-220 (VEGF; Hybridon)、Gem-240 (MEM2; Hybridon)、CALAA-19 (M2サブユニットリボヌクレオチドレダクターゼ; Arrowhead Research Corporation)、Trabedersen (AP 12009; TGFB2; アンチセンス)、GTI-2040 (リボヌクレオチドレダクターゼ R2 Lorus Therapeutics)、AEG 35156 (XIAP; Aegera Pharma)、及びMG 98 (DNAメチルトランスフェラーゼ; MethylGene/ MGI Pharma/ British Biotech)から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

## 【0377】

追加の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、アポトーシス、細胞の生存、血管新生、転移、異常な遺伝子制御、細胞サイクル、有糸分裂経路、及び/又は成長シグナル伝達を調節する核酸配列の特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。更なる態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、EGFR、HER-2/neu、ErbB3、cMet、p561ck、PDGFR、VEGF、VEGFR、FGF、FGFR、ANG1、ANG2、bFGF、TIE2、プロテインキナーゼ C- (PKC-)、p561ck PKA、TGF-、IGFIR、P12、MDM2、BRCA、IGF1、HGF、PDGF、IGFBP 2、IGF1R、HIF1、フェリチン、トランスフェリン受容体、TMPRSS2、IRE、HSP27、HSP70、HSP90、MITF、クルステリン (clusterin)、PARP1c-fos、C-myc、n-myc、C-raf、B-raf、AI、H-raf、Skp2、K-ras、N-ras、H-ras、ファレンシルトランスフェラーゼ (farensyl transferase)、c-Src、Jun、Fos、Bcr-Ab1、c-Kit、EphA2、PDGFB、ARF、NOX1、NF1STAT3、E6/E7、APC、WNT、カテキン、GSK3b、PI3k、mTOR、Akt、PDK-1、CDK、Mek1、ERK1、AP-1、p53、Rb、Syk、オステオポンチン (osteopontin)、CD44、MEK、MAPK、NF-、Eカドヘリン (cadherin)、サイクリンD、サイクリンE、Bcl-2、Bax、BXL-XL、BCL-W、MCL1、ER、MDR、テロメラーゼ、テロメラーゼ逆転写酵素、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ (例えば、HDAC1及びHDAC2)、インテグリン、IAP、アウロラキナーゼ (aurora kinase)、メタロプロテアーゼ (例えば、MMP2、MMP3及びMMP9)、プロテアゾーム、及びメタロチオネイン遺伝子から選択される蛋白質の発現を調節する核酸配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0378】

他の態様において、本発明は、癌又は癌に関連する状態の処理において、現在使用されており、使用されていた、又は有用であることが知られている1又は複数の療法との組合せにおいて、HES - オリゴヌクレオチドを投与することにより、癌又は癌に関連する1又

10

20

30

40

50

は複数の状態を処理する方法を提供する。

【0379】

幾つかの態様において、本発明は、免疫系の炎症性の又は他の疾患又は障害、或いは免疫系の炎症性の又は他の疾患又は障害に関連する1又は複数の状態の処理のための方法を提供し、この方法は、それを必要とする対象（すなわち、炎症性の又は他の免疫系の疾患又は障害を有するか又はその危険を有する）に、本発明の1又は複数のHES-オリゴヌクレオチドの療法的有効量を投与することを含んでなる。当業者にとって即座に明らかなとおり、免疫系又は炎症性疾患から生ずる又はそれと関連する免疫性のまたは炎症性の疾患又は状態の任意のタイプが、本発明の方法に従って処理され得る。特定の態様において、本発明は、免疫系及び/又は炎症性疾患又は障害、或いはこのような免疫系疾患又は障害に関連する1又は複数の状態を処理することに向けられる。

10

【0380】

用語「炎症性障害」は、本明細書において使用される場合、1又は複数の痛み（毒性物質の発生及び神経の刺激からの苦痛）、熱（血管拡張からの熱）、発赤（血管拡張及び血流の増加からの発赤）、膨潤（体液の過剰な流入又は抑制された流出からの腫瘍）、及び機能の喪失（部分的又は完全な、一時的又は永続的でありうる機能喪失）の兆候により特徴付けられる疾患又は状態を意味する。炎症は多くの形態を採り、急性、癒着性、委縮性、カタル性、慢性、硬変性、びまん性、敗血症性、滲出性、線維素性、線維化、病巣性、肉芽性、増殖性（hyperplastic）、肥大性、間質性（interstitial）、転移性、壊死性、閉塞性、間質性（parenchymatous）、増殖性（plastic）、増殖性（productive）、増殖性（proliferous）、急性偽膜性、化膿性（purulent）、硬化性、セロプラスティック、漿液性、単純性、特異性、皮下性、化膿性（suppurative）、毒性、トラウマ性、及び/又は潰瘍性の1又は複数の炎症を含むが、これらに限定されない。

20

【0381】

炎症性障害は更に、血管（多発性動脈塩、側頭動脈塩）、関節（関節炎：クリスタル関節炎、変形性関節炎、リウマチ様動脈炎、反応性関節炎、関節リウマチ、ライター（Reiter）関節炎）、胃腸管（疾患）、皮膚（皮膚炎）、又は多器官及び組織（全身性エリテマトーデス）に影響を与えるものを含むが、これらに限定されない。用語「線維症」又は「線維化障害」は、本明細書で使用される場合、急性又は慢性炎症に続きそして細胞及び/又はコラーゲンの異常蓄積に関連する状態を意味し、そして個体の器官又は組織の線維症、例えば心臓、腎臓、関節、肺、又は皮膚の線維症を含み、そして障害、例えば特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis）及び特発性間質性肺炎（cryptogenic fibrosing alveolitis）を含むが、これらに限定されない。特定の態様において、炎症性障害は、喘息、アレルギー障害、及び関節リウマチから成る群から選択される。

30

【0382】

更なる態様において、障害又は免疫系の障害は、自己免疫疾患である。本発明のHES-オリゴヌクレオチド複合体により処理することができる自己免疫疾患、障害又は状態には、自己免疫溶血性貧血、自己免疫性新生児血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性好中球減少症、自己免疫血球減少症、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、皮膚炎、グルテン過敏性腸疾患、アレルギー性脳脊髄炎、心筋症、再発性多発性軟骨症、リウマチ性心疾患、糸球体腎炎、（例えば、IgA腎炎）多発性硬化症、神経炎、ブドウ膜眼炎、多腺性内分泌障害、紫斑病（例えば、ヘンロッホ・ショーンライン（Henloch-Schoenlein）紫斑病）、ライター（Reiter）病、スチフ-マン（Stiff-Man）症候群、自己免疫肺炎症、心筋症、IgA糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、リウマチ性心疾患、ギャラン-バレー（Guillain-Barre）症候群、インスリン依存性糖尿病、及び自己免疫炎症眼（autoimmune inflammatory eye）、自己免疫甲状腺炎、甲状腺機能低下（例えば、ハシモト甲状腺炎、全身性エリテマトーサス、円板状紅斑性狼瘡、グードパスト（Goodpasture）症候群、天疱瘡、受容体自己免疫性炎症、例えば（a）グレーブス（Graves）病、（b）重症筋無力症及び（c）インスリン耐性、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血球減少性紫斑病、関節リウマチ、抗-コラーゲン抗体による強皮症、混合結合組織症、多発性筋炎/

40

50

皮膚筋炎、悪性貧血、特発性アジソン（Addison）病、不妊、糸球体腎炎、例えば、原発性糸球体腎炎及びIgA腎炎、水泡性類天疱瘡、シューグレン（Sjogren）症候群、糖尿病、及びアドレナリン作動性薬物耐性（喘息又は囊胞性線維症を伴うアドレナリン作動性薬物耐性を含む）、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、他の内分泌腺不全、尋常性白斑、脈管炎、ポスト-MI、心切開症候群、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、喘息、炎症性筋障害、及び他の炎症性、肉芽腫性、退行性、及び委縮性障害が含まれるが、これらに限定されない。

【0383】

特定の態様において、自己免疫疾患又は障害は、クロhn（Crohn）病、全身性エリテマトーデス（SLE）、炎症性腸疾患、乾蘇、糖尿病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、及び関節リウマチから選択される。

10

【0384】

幾つかの態様において、本発明は、療法的有効量のHES - オリゴヌクレオチドを対象に投与することを含んでなる、免疫性又は心臓血管系疾患を処理する方法に向けられる。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、Alcaforsen（ICAM-1；ISIS 2302）、QPI-1002（p53；Silence Thera/Novartis/Quark）、XEN701（Isis/Xenon Pharmaceuticals）、ISIS 104838（TNF- $\alpha$ ；ISIS/Orasense）、EPI-2010（RASON；Adenosine A1 receptor；Epigenesis/Genta）、Plazomicin（Isis/Achaogen）、ALN-PCS02（PCSK9；Alnylam）、ALN-AT3（SERPINC1；Alnylam）、ALN-HPN（TFR2；Alnylam）、ALN-HPN（TMPRSS6；Alnylam）、ASM8-003（CCR3；Topigen Pharmaceuticals）、ISIS CRP Rx（CRP；ISIS）、Kynamro<sup>TM</sup>（ISIS 301012、Apo-B100；ISIS/Genzyme）、ISIS-APOCIII Rx（ApoCIII；ISIS）、ISIS-APO(a)（Apo(a)；ISIS）、ISIS-FVII rx Factor VII；ISIS）、及びISIS-FXI（Factor XI；ISIS）から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

20

【0385】

幾つかの態様において、本発明は、感染、又はカテゴリーAの感染物若しくは状態を処理する方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象（すなわち、感染性疾患有するか又はその危険性を有する）に、療法的有効量の本願発明の1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。幾つかの態様において、感染性疾患は、ウイルス感染、細菌感染、菌類感染又は寄生感染である。

30

【0386】

幾つかの態様において、本発明は、感染性疾患、又は感染性疾患に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供し、当該方法は、必要とする対象（すなわち、感染性疾患有するか又はその危険性を有する）に、療法的有効量の本願発明の1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。特定の態様において、感染物は、バシルス・アンスラシス（Bacillus anthracis）、クロストリジウム・ボツリヌム・トキシン（Clostridium botulinum toxin）、イエルシナ・ペスト（Yersina pestis）、バリオラ・マジョール（Variola major）、フィロウイルス（例えば、Ebola及びMarburg）及びアレナウイルス（arenavirus）（例えば、Lassa及びMachupo）から選択される。特定の態様において、本発明の方法に従って処理される状態は、たんそ病、ボツリヌス症、疫病、天然痘、野兎病、及びウイルス性出血熱から選択される。

40

【0387】

幾つかの態様において、本発明は、感染物又はカテゴリーB感染物若しくは疾患に関連する状態を処理する方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象（すなわち、感染性疾患有するか又はその危険性を有する）に、療法的有効量の本願発明の1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。特定の態様において、感染物は、バイルス・スペーシス（Bacilla species）、クロストリジウム・パーフリンゲンス（Clostridium perfringens）、サルモネラ・スペーシス（Salmonella species）、大腸菌（E. coli）0157:H7、シゲラ（Shigella）、ブルクホルデリア・シュードマレイ（Burkholderia

50

eria pseudomallei)、チヤミディア・プシタシ (Chyamydia psittaci)、コクシアラ・ブツネチー (Coxiella burnetii)、リケッチャ・プロワゼッキー (Rickettsia prowazekii)、ウイルス性脳炎アルファウイルス (例えば、ベネズエラウマ脳炎、東洋ウマ脳炎、西洋ウマ脳炎)、ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae) 及びクロストリジウム・パルブム (Cryptosporidium parvum) から選択される。特定の態様において、本発明の方法に従って処理される状態は、ブルセラ病、クロストリジウム・パーフリンゲンスのエプシロン毒素、食品毒、馬疽、類鼻疽、オウム病、Q熱、リシントキシン毒、チフス熱、ウイルス性脳炎及び赤痢から選択される。

## 【0388】

幾つかの態様において、本発明は、ウイルス感染、又はウイルス感染に関連する1又は複数の状態を処理する方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象 (すなわち、ウイルス感染又はその危険性を有する) に、療法的有効量の本願発明の1又は複数のHES-オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。当業者にとって即座に明らかなるとおり、ウイルス感染、又はウイルス感染による若しくはそれに関連する状態 (例えば、呼吸状態) の任意のタイプを本発明に従って処理することができる。特定の態様において、ウイルス性疾患又は障害は、エボラ、マールブルグ (Marburg)、ジュニン (Junin)、デングウエストナイル (Denge West Nile)、ラッサSARS Co-V、日本脳炎、ベネズエラウマ脳炎、セントルイス脳炎、Manchupo、黄熱病、及びインフルエンザから選択される感染又はそれらに関連する状態である。

## 【0389】

本発明のHES-オリゴヌクレオチドにより処理することができるウイルス性感染又は状態を生じさせるウイルスの例には、レトロウイルス (例えば、ヒトT-細胞リンパ好性ウイルス (HTLV) タイプI及びII、及びヒト免疫不全ウイルス (HIV))、ヘルペスウイルス (例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) タイプI及びII、エプスタイン-バール (Epstein-Barr) ウィルス、HHV6-HHV8、及びサイトメガロウイルス)、アレナウイルス (例えば、ラッサ熱ウイルス)、パラミキソウイルス (例えば、モルビリウイルス (morbillovirus) ウィルス、ヒト呼吸系発疹ウイルス、流行性耳下腺炎、hMPV、及び肺炎ウイルス)、アデノウイルス、ブニアウイルス (bunyavirus) (例えば、ハンタウイルス (hantavirus) )、コルナウイルス (coronavirus)、フィロウイルス (filovirus) (例えば、エボラウイルス)、フラビビウイルス (flavivirus) (例えば、C型肝炎ウイルス (HCV)、黄熱病ウイルス、及び日本脳炎ウイルス)、ヘパドナウイルス (hepatadnavirus) (例えば、B型肝炎ウイルス (HBV))、オルトミオウイルス (orthomyovirus) (例えば、インフルエンザウイルスA、B及びC、及びPIV)、パポバウイルス (例えば、パピロマウイルス)、ピコルナウイルス (例えば、リノウイルス (rhinovirus)、エンテロウイルス、及びA型肝炎ウイルス)、ポックスウイルス、レオウイルス (reovirus) (例えば、ロタウイルス)、トガウイルス (例えば、風疹ウイルス)、及びラブドウイルス (例えば、狂犬病ウイルス) の感染又は関連する状態が含まれるが、それらに限定されない。

## 【0390】

追加の態様において、本発明は、感冒、ウイルス性咽頭炎、ウイルス性喉頭炎、ウイルス性クループ、ウイルス性気管支炎、インフルエンザ、パラインフルエンザウイルス性疾患 (PIV) (例えば、クループ、細気管支炎、気管支炎、肺炎)、呼吸系発疹ウイルス (RSV) 疾患、メタニューモウイルス、及びアデノウイルス疾患 (例えば、熱性呼吸器疾患、クループ、気管支炎及び肺炎) と関連するか又はこれらを生じさせるウイルス性呼吸系感染に関連する状態の処理又は軽減の方法を提供する。

## 【0391】

幾つかの態様において、HES-オリゴヌクレオチドは、AVI-4065 (HCV; AVI Biopharma)、VRX496 (HIV; VIRxSYS corporation)、Miravirsen (antimiR-122, Santaris)、GEM 91 (Trecorvirsen)/92; Gag HIV; Hybridon)、Vitravene (Fomivirsen; CMV; ISIS/Novartis)、ALN-RSV01 (RSV; Alnylam)、AVI-6002 (Ebola; AVI Biopharma)、AVI-6003 (Ebola; AVI Biopharma)、MBI-1 121 (human papillomavirus; Hybridon)、ARC-520 (HP

10

20

30

40

50

V hepatitis; Arrowhead Research Corporation) 及びAVI-6001 (Influenza/avian flu; AVI Biopharma) から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

#### 【0392】

追加の態様において、本発明は、本発明のHES - オリゴヌクレオチドの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の合わせを投与することによる、ウイルス感染、又はウイルス感染に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。幾つかの態様において、少なくとも2、少なくとも3、又は少なくとも4のHES - オリゴヌクレオチドが同一の標的核酸に特異的にハイブリダイズする。追加の態様において、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4又は少なくとも5のHES - オリゴヌクレオチドが異なる標的核酸に結合する。

10

#### 【0393】

1つの態様において、本発明は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9又は少なくとも10のフィロウイルス (filovirus) のRNA配列に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者に投与することによる、フィロウイルス (例えば、エボラ及びマープル) 感染、又は当該感染に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、VP35、VP24及び/又はRNAポリメラーゼLに結合する。更なる態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

20

#### 【0394】

1つの態様において、本発明は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9又は少なくとも10のエボラ (Ebola) RNA配列に結合するHES - オリゴヌクレオチドを、それを必要とする患者の投与することによる、エボラウイル感染、又は当該感染に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、VP24、VP35及び/又はRNAポリメラーゼLに結合する。追加の態様において、HESオリゴヌクレオチドは、VP24、VP30、VP35、VP40、NP、GP、及び/又はRNAポリメラーゼLに結合する。更なる態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

30

#### 【0395】

1つの態様において、本発明は、フラビビリダエ (Flaviviridae) 科のメンバーの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5のRNA配列に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者の投与することによる、フラビビリダエ (Flaviviridae) (例えば、ウエストナイル熱、黄熱病、日本脳炎、及びデングウイルス) ウイルス感染、又は当該感染に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチドは、ウイルスゲノムの5'又は3'領域中の高度に保存された非 - コード領域、又はエンベロープコード遺伝子 (E) に対応する配列に結合する。更なる態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の態様において、1又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

40

#### 【0396】

1つの態様において、本発明は、アレノビリダエ (Arenaviridae) の科のメンバーの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の配列に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者の投与することによる、アレノビリダエ (Arenaviridae) (例えば、ラッサ (Lassa)、ジュニン (Junin)、及びマチュポ (Machupo) ウイルス) 科のウイルス感染、又は

50

当該感染に関連する 1 若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、Z 蛋白質（亜鉛 - 結合蛋白質）、L 蛋白質（ウイルスポリメラーゼ）又はGPC（糖蛋白質前駆体）蛋白質をコードする 5' 又は 3' ウイルス mRNA 転写物中の高度に保存された非 - コード配列に結合する。更なる状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

## 【 0 3 9 7 】

1 つの状態において、本発明は、SARS Co-V科の核酸配列の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者の投与することによる、SARS - 関連コロナウイルス（SARS Co-V）感染、又は当該感染に関連する 1 若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、レプリカse遺伝子（orf 1a/1b）、orf 1bリボゾームフレームシフトポイント、転写制御配列（TRS）の 5' - 非翻訳領域（UTR）、TRS配列の 3'UTR、スパイク蛋白質コード領域及び / 又はNSP12領域に結合する。更なる状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

## 【 0 3 9 8 】

1 つの状態において、本発明は、レトロビリダエ（Retroviridae）科のメンバーの少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 のRNA配列に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者の投与することによる、レトロビリダエ（Retroviridae）（例えば、HIVウイルス）科のウイルス感染、又は当該感染に関連する 1 若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、gag、pol、int、及びVpu領域の高度に保存された領域に結合する。更なる状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

## 【 0 3 9 9 】

1 つの状態において、本発明は、インフルエンザRNA配列の少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 に特異的にハイブリダイズするHES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者に投与することによる、インフルエンザ A（例えば、H1N1、H3N2及びH5N1）感染、又は当該感染に関連する 1 若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、当該ウイルスのNP及びPA核酸配列に結合する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、当該ウイルスの、NP、M2、及び / 又はPB2（例えば、PA、PB 1、PB2及びNPのAUG開始コドンを標的とする）、又はNP末端領域、NS1 及び / 又はPA核酸配列に結合する。更なる状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

## 【 0 4 0 0 】

追加の状態において、本発明は、アルファウイルスRNA配列の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 に特異的にハイブリダイズするHE - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を、それを必要とする患者に投与することによる、アルファウイルス（ウマ脳炎ウイルス（VEEV））の感染、又は当該アルファウイルス感染に関連する 1 若しくは複数の状態を処理する方法を提供する。特定の状態において、HE - オリゴヌクレオチドは、当該ウイルスのNP及びPA核酸配列に結合する。特定の状態において、HES - オリゴヌクレオチドは、当該ウイルスの、ns1、ns4及び / 又はEI RNA配列に結合する。更なる状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、PMO又はPPMOである。追加の状態において、1 又は複数のHES - オリゴヌクレオチドは、アンチセンス、siRNA又はshRNAである。

10

20

30

40

50

## 【0401】

幾つかの態様において、本発明は、細菌感染、又は細菌感染に関連する1若しくは複数の状態を処理する方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象（すなわち、細菌感染を有するか又はその危険性を有する）に、本発明の1又は複数のHES-オリゴヌクレオチドの療法的有効量を投与することを含んでなる。任意のタイプの細菌感染、或いはそれから生ずる、又は細菌感染に関連する状態を、本発明の組成物又は方法を用いて処理することができる。

## 【0402】

特定の態様において、本発明の方法に従って処理される細菌感染又は状態は、次の細菌属のメンバーと関連する：サルモネラ（*Salmonella*）、シゲラ（*Shigella*）、クラミジア（*Chlamydia*）、ヘリコバクター（*Helicobacter*）、イエルシニア（*Yersinia*）、ボルダテラ（*Bordatella*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、ナイセリア（*Neisseria*）、シゲラ（*Shigella*）、クラミジア（*Clamydia*）、ヘリコバクター（*Helicobacter*）、イエシニア（*Yesinia*）、トレポネマ（*Treponema*）、コキシエラ（*Coxiella*）、エルリヒア（*Ehrlichia*）、ブルセラ（*Brucella*）、ストレプトバシルス（*Streptobacillus*）、フソスピロケタ（*Fusospirocheta*）、スピリルム（*Spirillum*）、ウレアプラズマ（*Ureaplasma*）、スピロカエタ（*Spirochaeta*）、マイコプラズマ（*Mycoplasma*）、アクチノミセテス（*Actinomycetes*）、ボレリア（*Borrelia*）、バクテロイデス（*Bacteroides*）、トリコモラス（*Trichomorpha*）、ブランハメラ（*Branhamella*）、パステウレラ（*Pasteurella*）、クロストリジウム（*Clostridium*）、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）、リステリア（*Listeria*）、バシルス（*Bacillus*）、エリシペロトリクス（*Erysipelothrix*）、ロドコッカス（*Rhodococcus*）、エシェリシア（*Escherichia*）、クレブシラ（*Klebsiella*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、エンテロバクター（*Enterobacter*）、セラチア（*Serratia*）、スタフィロコッカス（*Staphylococcus*）、ストレプトコッカス（*Streptococcus*）、レジオネラ（*Legionella*）、マイコバクエリウム（*Mycobacterium*）、プロテウス（*Proteus*）、カンピロバクター（*Campylobacter*）、エンテロコッカス（*Enterococcus*）、アシノトバクター（*Acinetobacter*）、モルガネラ（*Morganella*）、モラキセラ（*Moraxella*）、シトロバクター（*Citrobacter*）、リケットシア（*Rickettsia*）及びラクリメアエ（*Rohimeae*）。

## 【0403】

更なる態様において、本発明の方法に従って処理される細菌感染又は状態は、下記から選択される細菌属のメンバーと関連する：P. アエルギノサ（*P. aeruginosa*）、大腸菌（*E. coli*）、P. セパシア（*P. cepacia*）、S. エピデルミス（*S. epidermidis*）、E. フェカリス（*E. faecalis*）、S. ニューモニアス（*S. pneumoniae*）、S. オウレウス（*S. aureus*）、N. メニンギチディス（*N. meningitidis*）、S. ピオゲネス（*S. pyogenes*）、パステウレラ・ムルトシダ（*Pasteurella multocida*）、トレポネマ・パリズム（*Treponema pallidum*）、及びP. ミラビリス（*P. mirabilis*）。幾つかの態様において、細菌感染は細胞内細菌感染である。

## 【0404】

追加の態様において、本発明は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の細菌の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の核酸配列に特異的にハイブリダイズする療法的有効量のHES-オリゴヌクレオチドを、それを必要とする患者に投与することによる、細菌感染、又は細菌感染と関連する1若しくは複数の状態の処理方法を提供する。追加の態様において、本発明は、菌類感染、又は菌類感染と関連する1若しくは複数の状態の処理方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象（すなわち、菌類感染を有するか又はその可能性を有する）に、療法的有効量の1又は複数の本発明のHES-オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。任意のタイプの菌類感染、又は菌類感染から生ずる又はそれに関連する状態が、本発明の組成物又は方法を用いて処理することができる。

## 【0405】

10

20

30

40

50

特定の態様において、本発明の方法に従って処理される菌類感染又は状態は、次のものから選択される菌類に関するもの：クリプトコッカス・ネオホルマンス (*Cryptococcus neoformans*)、ブラストミセス・デルマチチディス (*Blastomyces dermatitidis*)、アイエロミセス・デルマチチディス (*Aiellomyces dermatitidis*)、ヒストプラズマ・カプラツム (*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス・イミチス (*Coccidioides immitis*)、カンジダ・スペーシス (*Candida species*)、例えば、*C. albicans* (*C. albicans*)、*C. tropicalis* (*C. tropicalis*)、*C. parapsilosis* (*C. parapsilosis*)、*C. guilliermondii* (*C. guilliermondii*) 及び *C. krusei* (*C. krusei*)、アスペルギルス・スペーシス (*Aspergillus species*)、例えば、*A. fumigatus* (*A. fumigatus*)、*A. flavus* (*A. flavus*) 及び *A. niger* (*A. niger*)、リゾpus・スペーシス (*Rhizopus species*)、リゾムコール・スペーシス (*Rhizomucor species*)、クニンガメラ・スペーシス (*Cunninghamella species*)、アポフィソミセス・スペーシス (*Apophysomyces species*)、例えば *A. saksenaea* (*A. saksenaea*)、*A. mucor* (*A. mucor*) 及び *A. absidia* (*A. absidia*)、スプロトトリクス・シェンキー (*Sporothrix schenckii*)、パラコクシディオイデス・ブラシディオイデス (*Paracoccidioides brasiliensis*)、シュードアレセヘリア・ボイディー (*Pseudallescheria boydii*)、トルロプシス・グラブラタ (*Torulopsis glabrata*)、トリコフィトム・スペーシス (*Trichophyton species*)、ミクロポルム・スペーシス (*Microsporum species*) 及び デルマトフィレス・スペーシス (*Dermatophytes species*)、又は病原性であることが知られており又は同定されている他の任意の菌類（例えば、酵母）。 10

#### 【0406】

追加の態様において、本発明は、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 の菌類の少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、又は少なくとも 5 の核酸配列に特異的にハイブリダイズする療法的有効量の HES - オリゴヌクレオチドを、それを必要とする患者に投与することによる、菌類感染、又は菌類感染と関連する状態の処理方法を提供する。 20

#### 【0407】

追加の態様において、本発明は、寄生体感染、又は寄生体感染と関連する 1 若しくは複数の状態の処理方法を提供し、当該方法は、それを必要とする対象（すなわち、寄生体感染を有するか又はその可能性を有する）に、療法的有効量の 1 又は複数の本発明の HES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。任意のタイプの寄生体感染、又は寄生体感染から生ずる又はそれに関連する状態が、本発明の組成物又は方法を用いて処理することができる。 30

#### 【0408】

特定の態様において、本発明の方法に従って処理される寄生体感染又は状態は、次のものから選択される寄生体に関するもの：アピコムプレキサ・フィルム (*Apicomplexa phylum*) のメンバー、例えば、バベシア (*Babesia*)、トキソプラズマ (*Toxoplasma*)、プラスモジウム (*Plasmodium*)、アイメリア (*Eimeria*)、イソスピラ (*Isospora*)、アトキソプラズマ (*Apicomplexa*)、シストイソスピラ (*Cystoisospora*)、ハンモンジア (*Hammondia*)、ベスニオチア (*Besniotia*)、サルコシスチス (*Sarcocystis*)、フレンケリア (*Frenkelia*)、ヘモプロテウス (*Haemoproteus*)、ロイコシトゾーン (*Leucocytozoon*)、ティレリア (*Theileria*)、ペルキンスス (*Perkinsus*) 又はグレガリナ (*Gregarina*) のスペーシス；ニューモシスチス・カリニー (*Pneumocystis carinii*)；ミクロスピラ・フィルム (*Microspora phylum*) のメンバー、例えばノセマ (*Nosema*)、エンテロシトゾーン (*Enterocytozoon*)、エンケファリトゾーン (*Encephalitozoon*)、セプタタ (*Septata*)、ムラゼキア (*Mrazekia*)、アムブリオスピラ (*Amblyospora*)、アルネソン (*Arneson*)、グルゲア (*Glugea*)、ブレイシトフォラ (*Pleistophora*) 及びミクロスボリジウム (*Microsporidium*) のスペーシス；並びにアスセトスピラ・フィルム (*Ascetospora phylum*)、例えば、ハプロスボリジウム・スペーシス (*Haplosporidium spp.*)。 40

#### 【0409】

10

20

30

40

50

更なる態様において、本発明の方法に従って処理される寄生体感染又は状態は、次のものから選択される寄生体のスペシスに関連する：プラスモジウム・ファルシパルム (*Plasmodium falciparum*)、*P. vivax*、*P. ovale*、*P. malaria* (*P. malaria*)；トキソプラズマ・ゴンジー (*Toxoplasma gondii*)；レイシュマニア・メキシカナ (*Leishmania mexicana*)、*L. tropica*、*L. major*、*L. aethiopica*、*L. donovani*、トリパノソマ・クルジ (*Trypanosoma cruzi*)、*T. brucei*、シストソマ・マンソニ (*Schistosoma mansoni*)、*S. haematobium*、*S. japonium*；トリチネラ・スピラリス (*Trichinella spiralis*)；ウチエレリア・バンクロフチ (*Wuchereria bancrofti*)；ブルギア・マライリ (*Brugia malayi*)；エンタモエバ・ヒストリチカ (*Entamoeba histolytica*)；エンテロビウス・ベリミクロアルス (*Enterobius vermicularis*)；タエニア・ソリウム (*Taenia solium*)、*T. saginata*、トリコモナス・バギナチス (*Trichomonas vaginalis*)、*T. hominis*、*T. tenax*；ギアルジア・ラムブリア (*Giardia lamblia*)；クリプトスピリジウム・パルブム (*Cryptosporidium parvum*)；ニューモシチス・カリニー (*Pneumocytis carinii*)、バベシア・ボビス (*Babesia bovis*)、*B. divergens*、*B. microti*、イソスピラ・ベリ (*Isospora belli*)、*L. hominis*；ジアンタモエバ・フラギリス (*Dientamoeba fragilis*)；オンコセリカ・ボルブルス (*Onchocerca volvulus*)；アスカリス・ルムブリコイデス (*Ascaris lumbricoides*)；ネカトル・アメリカニス (*Necator americanus*)；アンシロストマ・ゾオレナレ (*Ancylostoma duodenale*)；ストロンギロイデス・ステルコラリス (*Strongyloides stercoralis*)；カピラリア・フィリピニンシス (*Capillaria philippinensis*)；アンギオストロンギルス・カントネンシス (*Angiostrongylus cantonensis*)；ヒメノレピス・ナナ (*Hymenolepis nana*)；デフィロボスリウム・ラツム (*Diphyllobothrium latum*)；エキノコッカス・グラヌロスス (*Echinococcus granulosus*)、*E. multilocularis*；パラゴニムス・ウエスターーマニ (*Paragonimus westermani*)、*P. caliensis*；クロのルチス・シネンシス (*Chlonorchis sinensis*)；オピストルチス・フェリネアス (*Opisthorchis felineus*)、*G. Viverini*、ファッショラ・ヘパチカ (*Fasciola hepatica*)；サルコプテス・スカビエイ (*Sarcoptes scabiei*)、ペジクルス・スマヌス (*Pediculus humanus*)；フシルルス・ブビス (*Phthirus pubis*)；及びデルマトビア・ホミニス (*Dermobia hominis*)、並びに病原性であることが知られているか又は同定されている他の任意の寄生体。

#### 【0410】

追加の態様において、本発明は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の寄生体の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は少なくとも5の核酸配列に特異的にハイブリダイズする療法的有効量のHES-オリゴヌクレオチドを、必要とする患者に投与することによる、寄生体感染、又は寄生体感染と関連する1若しくは複数の状態の処理方法を提供する。

#### 【0411】

他の態様において、本発明は、現在使用されているか、使用されていたか、又はウイルス感染又はウイルス感染と関連する状態の処理のために有用であることが知られている1又は複数の療法、例えば限定的ではないが抗ウイルス剤、例えばアマンタジン (*amantadine*)、オセルタミビル (*oseltamivir*)、リバビラン (*ribavirin*) パリビツマブ (*palivizumab*)、及びアナミビル (*anamivir*)との組合せにおいて、本発明のHES-オリゴヌクレオチドを投与することによる、ウイルス感染、又はウイルス感染と関連する1又は複数の状態の処理の方法を提供する。或る態様において、療法的有効量の本発明の1又は複数のHES-オリゴヌクレオチドは、1又は複数の抗ウイルス剤、例えば限定的ではないが、アマンタジン (*amantadine*)、リマンタジン (*rimantadine*)、オセルタミビル (*oseltamivir*)、ツンアミビル (*znamivir*)、リバビラン (*ribavirin*)、RSV-IVIG (すなわち、静

10

20

30

40

50

脈内免疫グロブリン注入) (RESPIGAM<sup>(TM)</sup>)、及びパリビツマブ (palivizumab) と組み合わせて投与される。

【0412】

幾つかの態様において、本発明は、呼吸系疾患、又は呼吸系疾患と関連する 1 若しくは複数の状態の処理方法を提供し、当該方法は、必要とする対象 (すなわち、呼吸系疾患有するか又はその可能性を有する) に、療法的有効量の 1 又は複数の本発明の HES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。用語「呼吸系疾患」は、本明細書で使用される場合、呼吸に関する器官、例えば、鼻、喉、喉頭、気管、気管支、及び肺に影響を与える疾患を意味する。本発明の方法により処理することができる呼吸系疾患には、喘息、成人呼吸窮迫症候群及びアレルギー性 (外因性) 喘息、非 - アレルギー性 (内因性) 喘息、急性重症喘息、慢性喘息、臨床喘息、夜間喘息、アレルゲン誘発喘息、アスピリン感受性喘息、運動誘発喘息、等炭酸ガス性呼吸過多、小児気管支喘息、成人気管支喘息、咳喘息、職業喘息、ステロイド耐性喘息、季節性喘息、季節性アレルギー性鼻炎、通年性アレルギー性鼻炎、慢性閉塞性肺疾患、例えば慢性気管支炎又は肺気腫、肺高血圧、間質性肺線維症及び / 又は気道炎症、及び囊胞性線維症、及び低酸素症が含まれるが、これ等に限定されない。

10

【0413】

幾つかの態様において、本発明は、神経学的状態又は障害の処理方法を提供し、当該方法は、必要とする対象 (すなわち、神経学的状態又は障害を有するか又はその可能性を有する) に、療法的有効量の 1 又は複数の本発明の HES - オリゴヌクレオチドを投与することを含んでなる。用語「神経学的状態又は障害」は、本明細書において、神経変性状態、中枢又は末梢神経系の機能不全により、又は神経細胞又は組織の壊死及び / 又はアポトシスにより特徴付けられる神経細胞又は組織の障害、及び栄養因子欠損に関連する神経細胞又は組織の損傷を含む状態を意味して使用される。

20

【0414】

本発明の HES - オリゴヌクレオチドを用いて処理することができる神経変性性疾患の例には、家族性及び特発性筋萎縮性側索硬化症 (それぞれ、FALS 及び ALS) 家族性及び特発性パーキンソン病、ハンチントン病 (ハンチントン舞蹈病)、家族性及び特発性アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症 (SMA)、視神経症、例えば、網膜変性を含む緑内障又は関連疾患、糖尿病性神経症、又は黄斑変性、内耳知覚細胞又はニューロンの変性による難聴、てんかん、ベル麻痺 (Bell's palsy)、染色体 17 にリンクするパーキンソン病を伴う前頭側頭型認知症 (FTDP-17)、多発性硬化症、びまん性皮質性小脳委縮症、レビー小体型認知症、ピック病、トリプレット病 (trinucleotide repeat disease)、プリオン病、及びシャイ - ドレーガー (Shy-Drager) 症候群が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0415】

本発明の HES - オリゴヌクレオチドを用いて処理することができる神経細胞又は組織の障害の例には、鈍的又は外科手術による外傷の後に見られる急性の又は非 - 急性的障害 (術後認知機能障害及び脊髄及び脳幹の損傷を含む) 及び血流を制限する (一過性又は永続性) 虚血状態、例えば、全脳又は局所脳虚血 (発作) に関連するもの; 例えば脳組織又は脊髄への切開又は切断; 神経組織における病変又はブラック (plaque); 細胞の成長又は生存に必要な栄養因子の欠乏; 及び神経毒、例えば化学療法剤への曝露; 並びに偶発的ないし他の疾患状態、例えば慢性代謝性疾患、例えば糖尿病及び腎不全が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0416】

幾つかの態様において、本発明は、HES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を対象に投与することを含んでなる、神経学的状態又は障害を処理する方法に向けられる。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、AVI-4658 (Dystrophin (エキソンス キッピング AVI Biopharma)、ISIS-SMN Rx (SMN; ISIS/ Biogen Idee)、AVI-5126 (CABG; AVI Biopharma) 及び ATL1102 (VLA-4 (CD49d); ISIS/Antisense Therapeutics Ltd) から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明の HES - オリゴヌ

50

クレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

【0417】

幾つかの態様において、本発明は、HES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を対象に投与することを含んでなる、代謝障害を処理する方法に向けられる。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、ISIS-FGFR4 (FGFR4; ISIS)、ISIS-GCCR RX (GCC; ISIS)、ISIS-GCGR RX (GCG; ISIS)、ISIS- PTP1B (PTP1VB; ISIS)、iCo-007 (c-Raf; Isis/iCo Therapeutics Inc)、ISIS-DGATRX (DGAT; ISIS)、PF-04523655 (DME, Silence Thera/Pfizer/Quark)、ISIS-TTR Rx (TTR: ISIS/GSK)、ISIS-AAT Rx (AAT: ISIS/GSK)、ALN-TTRsc (Transerythrin; Alnylam)、ALN-TTR01 (Transerythrin; Alnylam)、及びALN-TTR02 (Transerythrin; Alnylam)から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

10

【0418】

幾つかの態様において、本発明は、HES - オリゴヌクレオチドの療法的有効量を対象に投与することを含んでなる、疾患を処理する方法に向けられる。特定の態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、ATL1103-GHr Rx (GHr; ISIS/Antisense Therapeutics Ltd)、EXC 001 (CTGF; ISIS/Excaliard)、及びAtul11 (PKN3; Silence Thera)から選択されるオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体中のオリゴヌクレオチドは、標的結合について、上記のオリゴヌクレオチドの1つと競争する。

20

【0419】

上記のことと加えて、本発明のHES - オリゴヌクレオチドは、限定的ではないが、代謝性疾患又は障害（例えば、糖尿病、肥満、高コレステロール、高トリグリセリド）の処理において、骨格系の疾患又は障害（例えば、骨粗鬆症及び骨関節炎）の処理において、心臓血管系の疾患及び障害（例えば、発作、心臓疾患、アテローム性動脈硬化、再狭窄、血栓、貧血、白血球減少症、好中球減少症、血小板減少症、顆粒球減少症、汎血球減少症、又は特発性血小板減少性紫斑病）の処理において、腎臓（例えば、腎障害）、臍臓（例えば、臍炎）、皮膚及び眼（例えば、結膜炎、網膜炎、強膜炎、ブドウ膜炎、アレルギー性結膜炎、春季結膜炎、乳頭性結膜炎、緑内障、網膜症、及び眼虚血状態、例えば前部乏血性視神経症、加齢黄斑変性（AMD）、虚血性視神経症（ION）、眼球乾燥症候群）の疾患及び障害の処理において、器官移植拒絶（例えば、肺、肝臓、心臓、臍臓、及び腎臓移植）の予防において用途を有し、そして再生医療（例えば、加齢の相殺において、創傷治癒の促進、及び骨、コラーゲン、組織及び器官の成長及び修復において）における用途を有する。

30

【0420】

種々の態様において、本発明は、対象においてイン - ビボで、又はエクス - ビボで、細胞中の標的核酸又は蛋白質の調節において使用するための組成物を提供する。本発明のHES - オリゴヌクレオチド組成物は、例えば、イン - ビボ又はエクス - ビボで、対象における核酸又は蛋白質の過剰発現、過小発現、及び / 又は異常発現により特徴付けられる疾患又は障害の処理において用途を有する。感染性疾患、癌、増殖性疾患又は障害、神経学的疾患又は障害、及び炎症性疾患又は障害、免疫系の疾患又は障害、心臓血管系の疾患又は障害、代謝性疾患又は障害、骨格系の疾患又は障害、及び皮膚又は眼の疾患又は障害の処理における本発明の組成物の使用もまた本発明に含まれる。

40

【0421】

当業者に即座に明らかなとおり、本発明のHES - オリゴヌクレオチドの例示的療法的、及びコンパニオン診断的用途は、本質的に無制限である。本明細書において、本発明のHES - オリゴヌクレオチドの組成物の例示的な診断的及び療法的用途が提供される。しかしながら、本明細書中の記載は限定的であることを意味せず、そしてHES - オリゴヌクレオチドは、細胞及び / 又は生物において、核酸配列を検出し、或いは1又は複数の核酸又は関

50

連する蛋白質のレベルを調節することが望まれるあらゆる状況において用途を有することは予想される。

【0422】

複数のHES - オリゴヌクレオチド

幾つかの態様において、本発明の医薬組成物は、異なるオリゴヌクレオチド配列を有する、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、又は少なくとも10の異なるHES - オリゴヌクレオチド複合体の組み合わせを含んでなる。幾つかの態様において、医薬組成物は、2～15、2～10、又は2～5の間の異なるHES - オリゴヌクレオチド複合体を含む。幾つかの態様において、複合体中の少なくとも2又は少なくとも3の異なるオリゴヌクレオチドは、同じポリペプチドに対応するDNA及び/又はmRNAに特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、複合体中の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、又は少なくとも10の異なるオリゴヌクレオチドは、異なるポリペプチドに対応するDNA及び/又はmRNAに特異的にハイブリダイズする。幾つかの態様において、医薬組成物は、異なるポリペプチドに特異的にハイブリダイズする2～15、2～10、又は2～5の間のオリゴヌクレオチドを含む。幾つかの態様において、1又は複数の異なるHES - オリゴヌクレオチドが同時に対象に投与される。他の態様において、1又は複数の異なるHES - オリゴヌクレオチドが別々に対象に投与される。

10

【0423】

或る態様において、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体は、1又は複数の追加の剤と同時に投与される。或る態様において、このような追加の剤は、HES - オリゴヌクレオチド複合体とは異なる疾患、障害又は状態を処理するために設計される。幾つかの態様において、追加の剤は、複合体の不所望の効果を処理するために、HES - オリゴヌクレオチド複合体と同時に投与される。追加の態様において、追加の剤は、組合せ効果を生成するために、HES - オリゴヌクレオチド複合体と同時に投与される。更なる態様において、追加の剤は、相乗効果を生成するために、HES - オリゴヌクレオチド複合体と同時に投与される。或る態様において、追加の剤は、本発明のHES - オリゴヌクレオチド複合体の不所望の効果を処理するために投与される。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド複合体は、追加の剤と一緒に投与される。幾つかの態様において、HES - オリゴヌクレオチド及び追加の剤は、単一の医薬製剤中に一緒に調製される。他の態様において、HES - オリゴヌクレオチド及び追加の剤は、別々に調製される。更なる態様において、追加の剤は、HES - オリゴヌクレオチド複合体とは異なる時間に投与される。

20

30

【0424】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、単数形の事項は、特に断らない限り、複数事項も含む。したがって、例えば、「方法」と称する場合、1又は複数の方法及び/又はそこに記載されているタイプの工程を含み、そして/又はこのことは、この開示を読んだ当業者にとって明かであろう。更に、用語「細胞」は、天然において不均一でも均一でもよい細胞集団として理解することができ、そしてまた細胞の集合体を意味することもできる。更に、本発明の限定のそれぞれは、発明の種々の態様を含むことができる。したがって、任意の1つの要素又は要素の組み合わせを含む本発明の限定のそれぞれは、本発明の各態様に含まれると理解される。

40

【0425】

上記の詳細な記載、及びこの後の実施例は、単に例示的なものであり、そして発明の範囲の限定として取られるべきではないと理解される。当業者にとって明かであろう開示される態様の変更又は修飾は、本発明の本質及び範囲を逸脱することなく行われるであろう。

【0426】

米国特許出願第61/630,446号の開示を引用により、本明細書に組み入れる。更に、引用されるすべての公表、特許、特許出願、インターネットサイト、及びアクセス番号/データベース配列（ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の両方を含む）は、あたかも個々の公表、特許、特許出願、インターネットサイト、及びアクセス番号/データベース配列

50

が具体的に且つ個別に引用されるのと同様に、引用により本明細書に組み入れる。これらの公表は、本出願の出願日前の開示についてのみ提供される。先行発明により、又は他の理由のために、発明者がこのような開示を採用する権利を有しない旨の自認と解してはならない。日付についての全ての宣言又はこれらの文献の内容についての表現は、出願人が入手可能な情報に基づいており、そしてこれらの文献の日付及び内容の正しさについての何らの自認を構成するものではない。

**【実施例】**

**【0427】**

次の実施例は、例示を提供するものであって、特許請求された発明を限定するものではなく、次のことを明確にしめす：（1）HESの存在が、生きた生物において毒性を伴わないので、生きた細胞の内部でのオリゴヌクレオチドの送達を可能にすること、（2）2本鎖RNA中のHESの形成、（3）エンドヌクレアーゼダイサー（Dicer）による2本鎖RNA（dsRNA）のプロセシングの、HESによる阻害の不存在、及び（4）H-型励起構造を含むdsRNAによる遺伝子のノックダウン。

10

**【0428】**

実施例1 H-型励起構造を含むオリゴヌクレオチドのイン-ビボ送達

オリゴヌクレオチドが、生きた生物において毒性を伴わないので、生きた細胞内で送達されうることを示すため、- アクチン（CCC GGC GAT ATC ATC ATC CAT AAC（配列番号：1）（Sokol et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11538-43 (1998)）に相補的な24核酸の配列を含むDNAの鎖を合成し、そして当該鎖の両端を、フルオロフオア（N-エチル-N'-[5-(N"-サクシンイミジルオキシカルボニル)ペンチル]-3,3',3',3'-テトラメチル-2,2'-インドジカルボシアニンクロリド）により、共有結合で標識した。標識されたオリゴヌクレオチドを、逆相高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製し、そして凍結乾燥した。オリゴヌクレオチド中の分子内HESの存在を、吸収スペクトル及び蛍光測定法により確認した。すべての測定は、標識されたオリゴヌクレオチドは容易に溶けるリン酸緩衝液（PBS）中で行なった。

20

**【0429】**

PBS中 5 μモルの濃度の標識されたオリゴヌクレオチド200 μLの体積を、6週齢のC57BL/6マウス（464 μg / kg）に尾静脈に注射した。18時間後、マウスを頸椎脱臼により殺し、即座に血液を心臓から採取し、そして脾臓を摘出した。血液をPBSにより希釈し、ハイパク-フィコル（Hypaque-Ficoll）上に付加し、そして1300rpmにて30分間遠心分離した。ハイパク-フィコルとPBSとの界面にある細胞を集め、PBSで洗浄し、# 0 ホウケイ酸ガラス表面上Mattekガラス底マイクロウエル皿（P35G-0-10-C）中の置き、沈澱させ（約10分間）、そして次にライカDMIRE2共焦点顕微鏡により画像化した。平行して、注射器の末端を切除した器官に当てるにより、脾臓からのシングルセル懸濁液を作り、そして次に懸濁液をすり潰した。次に、PBS中の脾細胞を、同体積のACK細胞溶解緩衝液に3分間暴露し、更にPBSで希釈し、そして遠心分離した。次に、ペレット中の細胞をPBSに再懸濁し、Mattekガラス底マイクロウエル皿（P35G-0-10-C）中の置き、沈澱させ（約10分間）、そして最後に共焦点顕微鏡により画像化した。

30

**【0430】**

血液及び脾細胞の画像化は、蛍光及び明視野（微分干渉顕微鏡（DIC））チャンネルの両方における1ミクロンセクションの一連のスタックを入手することにより行った。各チャンネルのセクションを重ねることにより凝縮スタックを生成し、次に蛍光及びDICチャンネルからの凝縮画像を重ねることにより画像を再構成した。

40

**【0431】**

画像が示すところによれば、DIC画像に重ねられた蛍光チャンネルは、すべての脾細胞及び血液細胞がHES - 含有オリゴヌクレオチドを取り上げたことを示した。生きた細胞内のオリゴヌクレオチドの存在は、各1ミクロンセクションの試験により確認された。特にDIC画像からも明らかにあり、血液及び脾臓の両方からの細胞は健常であった。これらの同じサンプルにおいて、細胞によるトリパンブルー及びヨウ化プロピジオムの取込みが

50

存在しないことにより更に確認された点である。

【0432】

実施例2. H-型励起構造を含むオリゴヌクレオチドのイン-ビボ送達の定量

生きた生物内で毒性を伴わないで、生きた細胞内でのオリゴヌクレオチドのイン-ビボ送達を定量するため、実施例3に記載するようにしてダイサー(Dicer)基質を調製した。対象マウス(標準的、トランスフェクトされていないBALB/C系)において相補的対合が起らないように、ダイサー(Dicer)基質の配列、すなわちeGFPについてのセンス鎖及びアンチセンス鎖(Kim et al. *Nature Biotech.* 22:321-5 (2004))を選択した。2重標識され、凍結乾燥されたdsRNAをリン酸緩衝液(PBS)中に溶解した。オリゴヌクレオチド中分子間HESの存在は、吸収スペクトル及び蛍光測定により確認した。

10

【0433】

PBS中5μモル又は10μモルの濃度の標識されたオリゴヌクレオチドの200μL体積を、それぞれ10~12週齢のBALB/Cマウス(0.75又は1.5μg/kg)の尾静脈に注射した。3時間後、各マウスの心臓から、ヘパリンの存在下で血液を採取した。血液をPBSにより希釈し、ハイパク-フィコル(Hyqaque-Ficoll)上に付加し、そして1300rpmにて30分間遠心分離した。ハイパク-フィコルとPBSとの界面にある細胞を集め、各細胞の蛍光を、サイテック(Cytek)改変ベクトンディイッキンソンカリバー(Becton-Dickinson Caliber)フローサイトメトリーにより測定した。

20

【0434】

図1は、200μLの緩衝液(PBS)又はダイサー基質を注射した後3時間にマウスから分離した血液細胞にヒストグラムを示す。図1aにおいて、PBS又はダイサー基質(1.5mg/kg)の1回のip注射の後に採取された細胞からの蛍光が、ヒストグラムの形で示される。PBSの注射を受けた動物の細胞からの蛍光に比べての、ダイサー基質に曝露された細胞における約2桁の蛍光強度の増加は、ダイサー基質の有意な取込みを示す。更に、両群の光散乱特性は高度に生存性の細胞を示す。

20

【0435】

図1bにおいて、ヒストグラムは、PBS、1.5mg/kgの濃度におけるダイサー基質、又は0.75mg/kgの濃度におけるダイサー基質のiv注射後に採取された細胞の蛍光を示す。ip経路の場合と同様に、何れの投与量においてもダイサー基質を投与された、iv-注射された動物からの細胞はまた、PBS動物からの細胞に比べて、細胞当たり、蛍光強度の約2桁の増加を示し、高い方の濃度は、細胞当たり、僅かに高い平均強度をもたらした。そしてやはり、毒性の兆候は観察されなかった。

30

【0436】

実施例3. リアルタイムでの、分子内HESの形成

HESの形成は蛍光の消光と関連し、具体的には、ダイマーの蛍光は個々の成分のそれよりも低下する。したがって、HESの形成の過程を示すため、RNAの2つの相補的鎖、すなわちセンス鎖及びアンチセンス鎖(Kim et al. *Nature Biotech.* 22:321-5 (2004))のそれを、N-エチル-N'-(5-(N"-サクシンイミジルオキシカルボニル)ペンチル)-3,3,3',3',-テトラメチル-2,2'-インドジカルボシアニンクロリドにより標識し、そして次に一緒に加え、次に後者の溶液の蛍光強度を成分、すなわち単鎖のみ、のそれと比較した。

40

【0437】

2つの単一標識された鎖の蛍光スペクトルを、図2の左側に上方の2つのパネルに示す。各鎖の逆相HPLCにより測定された純度を、図2の右側の対応するパネルに示す。

【0438】

1データ/秒のデータ取得速度。中央セクションは先ず、時間(0~約80秒)の関数としてのセンス溶液の蛍光強度、約7000カウント、を示す。アンチセンス溶液を添加するための80秒においてシャッターが閉じられた時、強度はゼロに落ちる。シャッターを再開した際、強度は約1100カウントで記録され、そしてセンス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される密接な複合体のため、このレベルに維持される。

【0439】

50

右側及び左側の最下パネルは、それぞれ、センス - アンチセンス複合体の放射スペクトル及びHPLCクロマトグラムを示す。

【0440】

実施例4. ダイサーによる、2本鎖センス - アンチセンスRNA複合体の認識

ダイサーは、2本鎖RNA (dsRNA) 及びpreMiRNA (MiRNA) を、小さい障害RNA (siRNA) と称される2本鎖RNA断片に開裂させるエンドヌクレアーゼである。本発明の態様に1つはRNAのサイレンシングのためのオリゴヌクレオチドの送達であるので、HES - 含有dsRNAがダイサーにより認識されそして開裂されることが必須である。したがって、2本鎖の末端にHESを含む実施例3に記載したdsRNAを、組換えダイサー (Recombinant Turbo Dicer Cat (# T520002) from Genlantis) に曝露した。試薬の提供者からの指示書における消化条件を使用して、dsRNA - 含有溶液の蛍光を、前記のエンドヌクレアーゼを添加した後に測定した。

10

【0441】

HESにより、2つのダイサー基質を合成した。一方は未修飾のリボヌクレオチドの2つの鎖 (25塩基及び27塩基) から構成され、第2は前記と同じ2本鎖で構成されたが、25ヌクレオチド鎖は末端で2つのO - メチル化されたヌクレオチドにより延長された。末端O - メチル化は、血漿中の存在するエキソヌクレアーゼからオリゴヌクレオチドを保護することが示されている。図3に示されるように、両方のdsRNAの溶液の蛍光は、ダイサーの添加後、時間の関数として増加したので、このエンドヌクレアーゼによるプロセシングについての、HESの阻害の不存在が確認された。更に、O - メチル化を有するdsRNAは、僅かに低い消化速度を示し、この修飾の保護効果と一致した。

20

【0442】

実施例5. H - 型励起構造を含むdsRNAによる遺伝子のノックダウン

H - 型励起構造に連結されたオリゴヌクレオチドの機能性を示すため、eGFPの発現についてトランスジェニックであるマウスの血液細胞からの細胞当たりの蛍光を、図2に記載したように、H - 型励起構造により誘導体化され、そしてeGFP (Kim et al, Nature Biotechnol. 22:321-5 (2004)) をコードするセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む2本鎖RNA (dsRNA)への曝露の後に、測定した。測定は、単核細胞の分離後マウスの血液からのフローサイトメトリーにより行った。

30

【0443】

図4は、対照及びダイサー処理された集団の両方のヒストグラムを重ねたものである。対照細胞は、2つの集団を示す：第2の集団に比べて、細胞当たり > 10 蛍光単位を有する67%の細胞。ダイサー基質による処理は、非蛍光対照細胞の平均蛍光に比べて僅かに高い平均蛍光を有する単一の集団をもたらす。

【図 1 a】

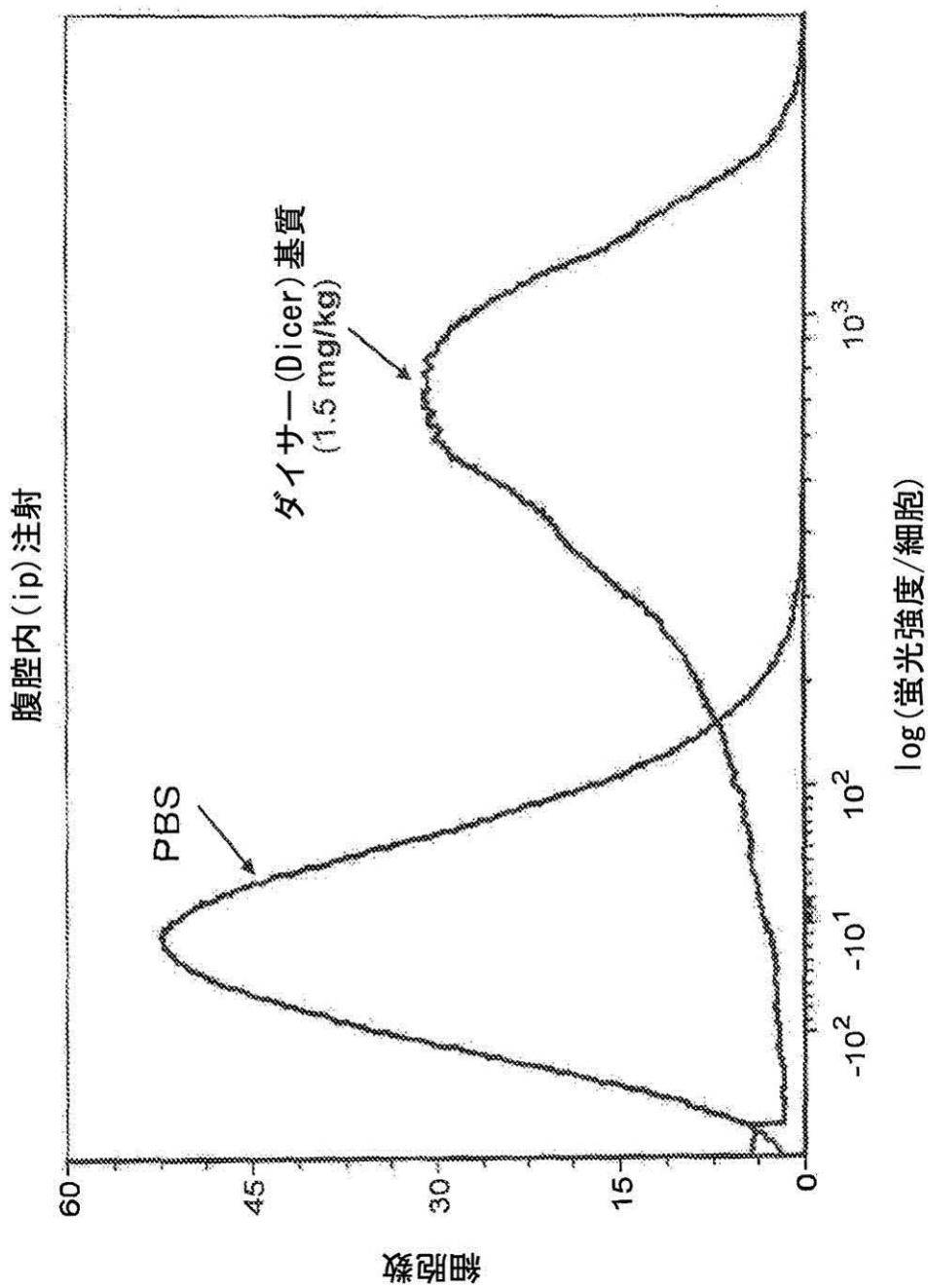


Fig. 1a

【図 1 b】

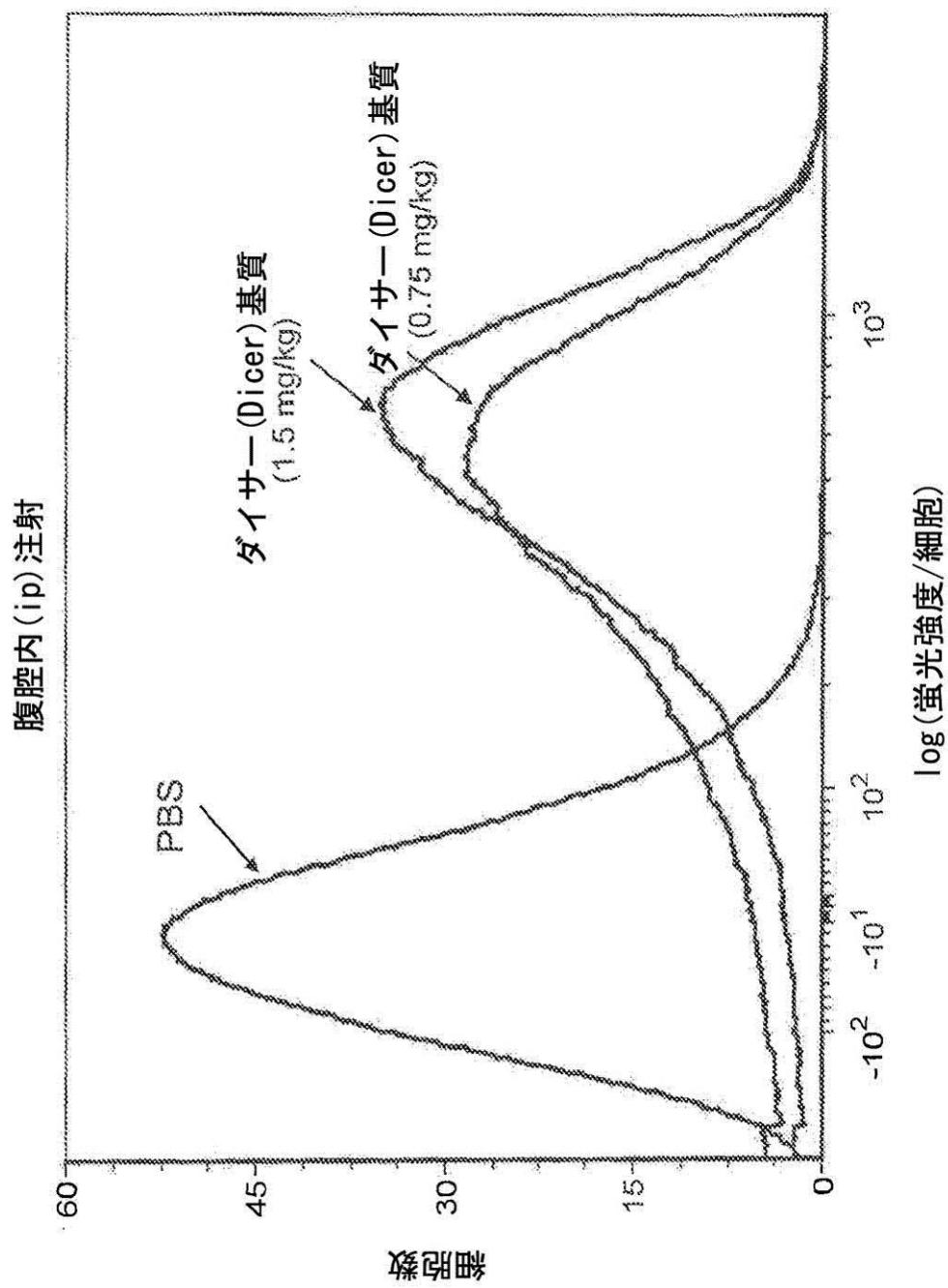
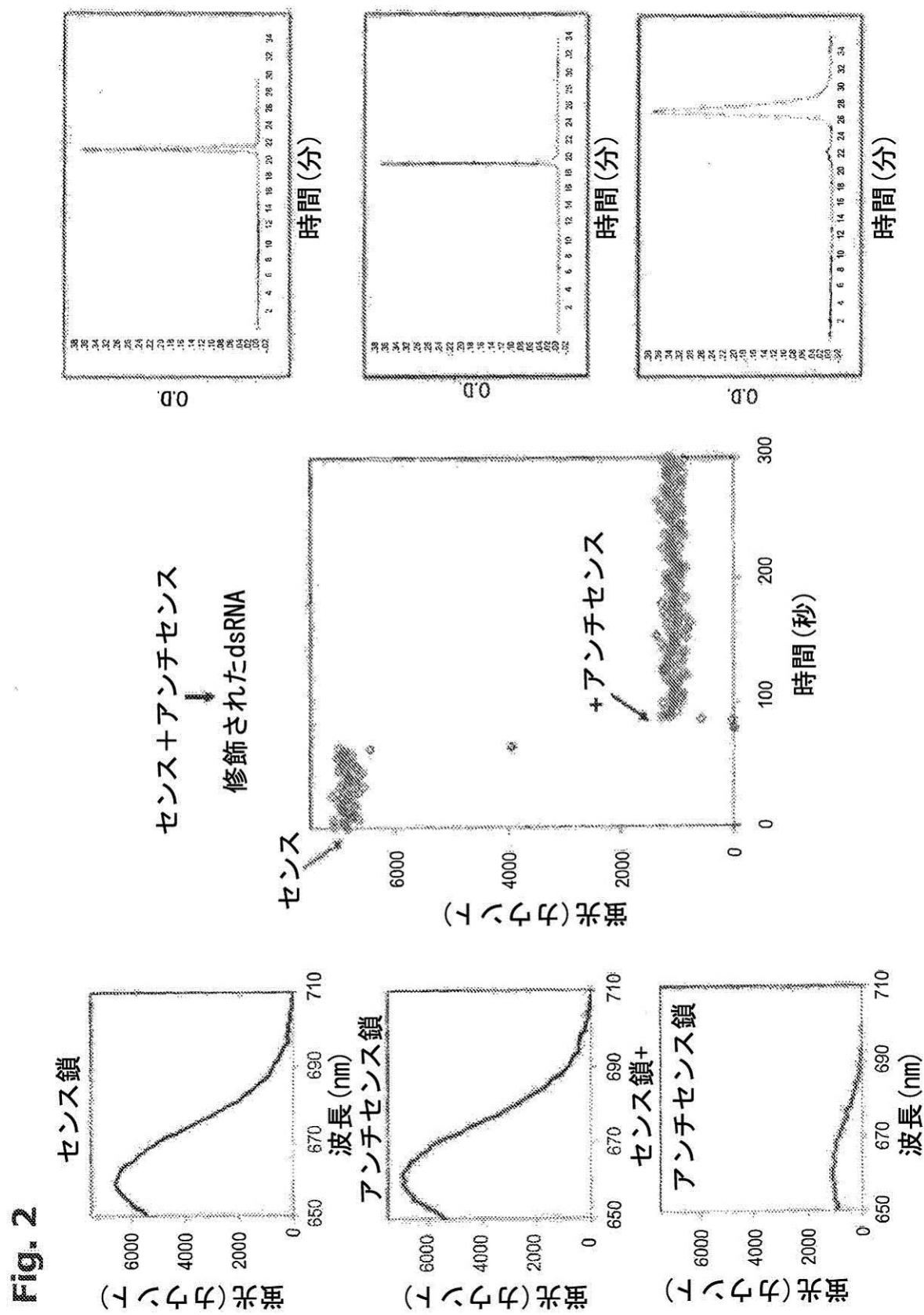


Fig. 1b

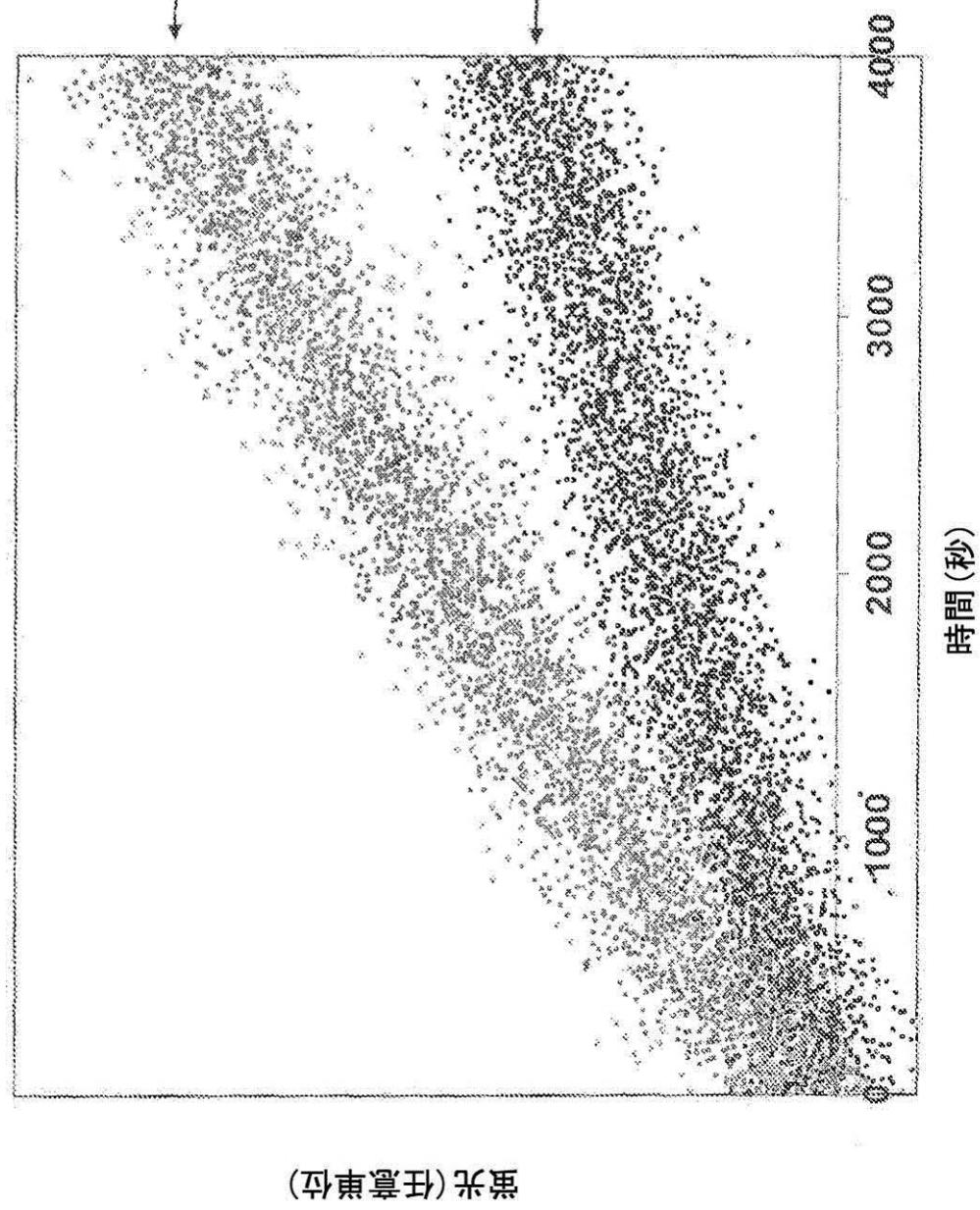
【図2】



【図3】

Fig. 3

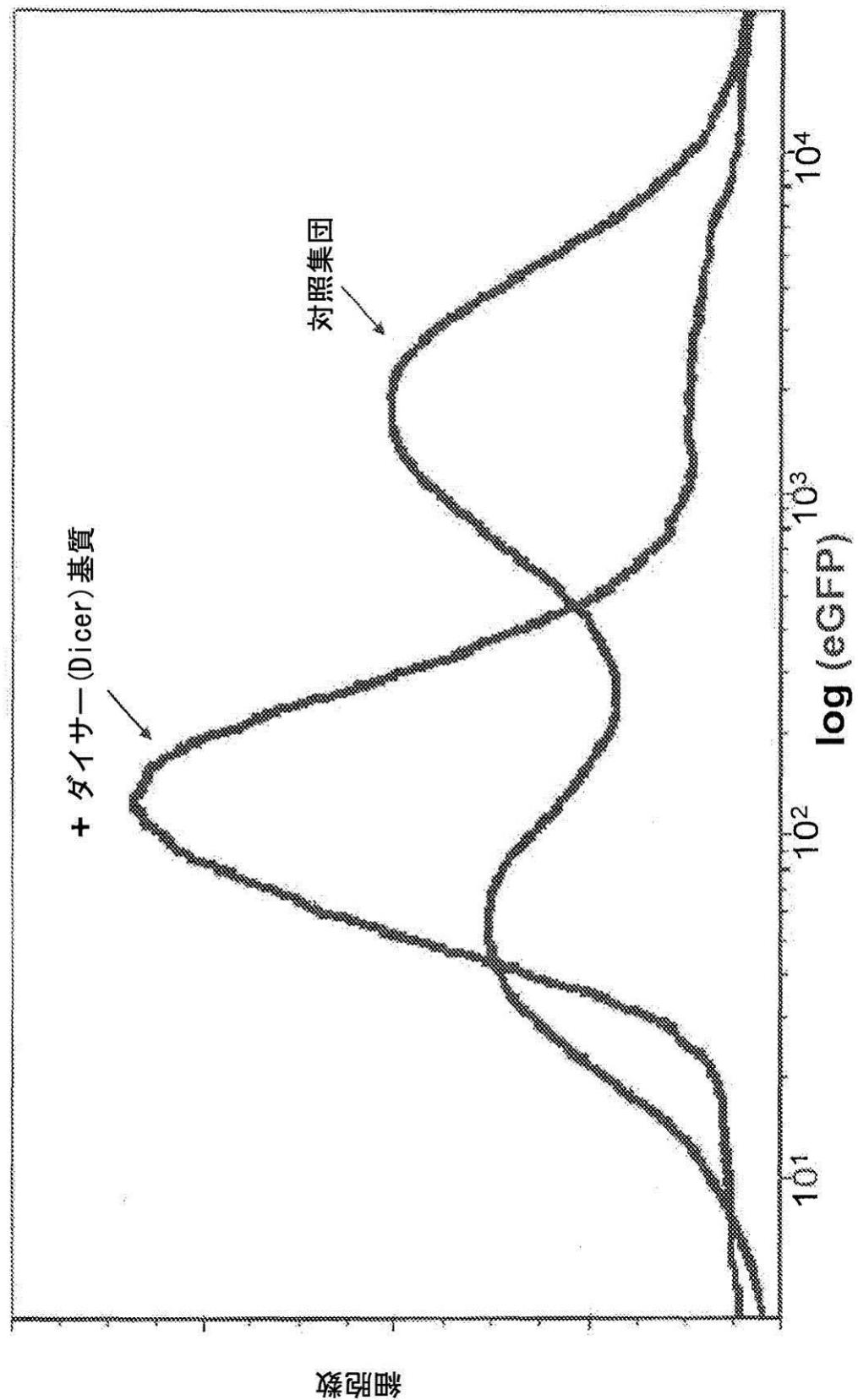
ダイサー(Dicer)活性



【図4】

eGFPトランスジェニックマウスからの脾細胞  
+インターロイキン-2 3日

Fig. 4



【配列表】

2015502365000001.app

## 【国際調査報告】

61400610013



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/US 12/69294

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC(8) - A61K 9/00; A61K 31/7088; A61K 48/00 (2013.01)  
 USPC - 424/400; 514/44R; 514/44A

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)  
 IPC(8): A61K 9/00; A61K 31/7088; A61K 48/00 (2013.01)  
 USPC: 424/400; 514/44R; 514/44A

 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 USPC: 435/375; 435/455; 536/24.5

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 PatBase; Google Scholar; esp@cenet: H-type, excitonic, antisense, gapmer, morpholino, PNA, RNase H, siRNA, DNA mimic, OncoImmunin, Beverly Packard, Akira Komorilya
**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0325168 A1 (PACKARD et al.) 31 December 2009 (31.12.2009), abstract; para [0004], [0014], [0031], [0095], [0127], [0128], [0148], [0163], [0164], [0176], [0177], claim 12.	1-23, 25-28
Y	PACKARD et al., A Method in Enzymology for Measuring Hydrolytic Activities in Live Cell Environments. Methods in Enzymology. 2008, Volume 450, Pages 1-19. Especially abstract; pg 16, paras 1 and 2.	1-23, 25-28
Y	US 2005/0142581 A1 (GRIFFEY et al.) 30 June 2005 (30.06.2005), para [0010], [0047], [0060], [0090], [0094], [0222], [0286], [0312], [0313], [0339], [0491], [0501], [0524], [0577], [0590], [0950], [0960], [0961], [0962].	8-13, 16-23, 25-28
Y	US 2003/0224377 A1 (WENGEL et al.) 4 December 2003 (04.12.2003), abstract; para [0113], [0117] [0118], [0192], [0194], [0199].	20

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:	
"A" 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	Date of mailing of the international search report
28 January 2013 (28.01.2013)	22 FEB 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 22.10.2014

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 12/69294

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.: 24  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

**Remark on Protest**

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

## 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 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)	A 6 1 K 31/7115	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	

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

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ビバリー パッカード

アメリカ合衆国,メリーランド 20877,ポトマック,ダリン ドライブ 12950

(72)発明者 アキラ コモリヤ

アメリカ合衆国,メリーランド 20877,ポトマック,ダリン ドライブ 12950

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 HA17

4C084 AA13 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA89 ZA96 ZB07 ZB11 ZB26

ZB31 ZC21

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZA36 ZA89

ZA96 ZB07 ZB11 ZB26 ZB31 ZC21