

(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2008-501693

(P2008-501693A)

(43) 公表日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07H 21/02 (2006.01)	C07H 21/02	4B024
C07H 21/04 (2006.01)	C07H 21/04 B	4B063
A61K 31/713 (2006.01)	A61K 31/713	4C057
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 105	4C086
C12Q 1/68 (2006.01)	A61P 43/00 111	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-515521 (P2007-515521)	(71) 出願人	506094264 アイシス ファーマシューティカルズ、インク。
(86) (22) 出願日	平成17年6月2日(2005.6.2)		
(85) 翻訳文提出日	平成19年2月2日(2007.2.2)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/019219		アメリカ合衆国、92008 カリフォルニア州、カールスバッド、ルーサーフォード ロード 1896
(87) 国際公開番号	W02005/121371	(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(87) 国際公開日	平成17年12月22日(2005.12.22)	(74) 代理人	100099656 弁理士 山口 康明
(31) 優先権主張番号	PCT/US2004/017485	(72) 発明者	バット、バルクリシェン
(32) 優先日	平成16年6月3日(2004.6.3)		アメリカ合衆国、92009 カリフォルニア州、カールスバッド、ローズマリーアベニュー 911
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US2004/017522		
(32) 優先日	平成16年6月3日(2004.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/859, 825		
(32) 優先日	平成16年6月3日(2004.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子調節で使用するための個別に調節された鎖を有する二本鎖組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 本発明は二本鎖組成物を提供し、各鎖は - D - リボヌクレオシドおよび糖修飾ヌクレオシドの位置によって定義されているモチーフを保持するように修飾されている。より具体的には、本発明はギャプトモチーフを保持する一方の鎖と、ギャプトモチーフ、ヘミマーモチーフ、ブロックマーモチーフ、完全に修飾されたモチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、または交互モチーフを保持するもう一方の鎖とを有する。前記鎖の少なくとも1つは標的核酸に相補的である。前記組成物は、選択された核酸を標的化し、1若しくはそれ以上の遺伝子の発現を調節するのに有用である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は標的RNAの一部にハイブリダイズし、その結果、前記標的RNAの正常機能を損失させるものである。本発明は、遺伝子発現を調節する方法も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のオリゴマー化合物と第二のオリゴマー化合物とを有する組成物であって、前記第一のオリゴマー化合物の少なくとも一部は、前記第二のオリゴマー化合物の少なくとも一部とハイブリダイズすることができるものであり、

前記第一のオリゴマー化合物の少なくとも一部は、選択された標的核酸と相補的であり、ハイブリダイズすることができるものであり、

第一および第二のオリゴマー化合物の1つは、インターヌクレオシド結合基によって結合されているヌクレオシドを有し、前記結合されたヌクレオシドはギャップモチーフを有するものであり、

もう1つの前記第一および第二のオリゴマー化合物は、インターヌクレオシド結合基によって結合されたヌクレオシドを有し、前記結合されたヌクレオシドはギャップモチーフ、交互モチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、または完全に修飾されたモチーフを有するものであり、

前記組成物はさらに、1若しくはそれ以上の選択的なオーバーハング、リン酸部位、共役基、又はキャッピング基を有するものであり、

この時、前記第一および第二のオリゴマー化合物それぞれは個別に、ギャップモチーフを有し、次に前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの3'または5'末端の少なくとも一方は、2'-OH₃修飾ヌクレオシド以外の修飾ヌクレオシドを有する、または前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つは、非対称ギャップモチーフを有するものである、組成物。

【請求項 2】

請求項 1 記載の組成物において、ギャップモチーフを有する各オリゴマー化合物は、結合ヌクレオシドの外部領域 2 つに隣接した結合ヌクレオシドの内部領域を有し、前記内部領域のヌクレオシドは前記外部領域それぞれのヌクレオシドと異なり、前記外部領域それぞれのヌクレオシドは個別に 2'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド、および二環式糖部位を有するヌクレオシドから選択されるものである。

【請求項 3】

請求項 2 記載の組成物において、ギャップモチーフを有する前記オリゴマー化合物の少なくとも1つの内部領域は、-D-リボヌクレオシド配列である。

【請求項 4】

請求項 2 記載の組成物において、ギャップモチーフを有する前記オリゴマー化合物の少なくとも1つの内部領域は、修飾ヌクレオシド配列である。

【請求項 5】

請求項 4 記載の組成物において、前記修飾ヌクレオシドは、2'-F修飾ヌクレオシドまたは4'-チオ修飾ヌクレオシドから選択されるものである。

【請求項 6】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つは、対称ギャップモチーフを有するものである。

【請求項 7】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つは、非対称ギャップモチーフを有するものである。

【請求項 8】

請求項 7 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のもう一方は、対称ギャップモチーフを有するものである。

【請求項 9】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、2'-修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

請求項 9 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも 1 つの各外部領域は、2' - 修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 11】

請求項 9 記載の組成物において、前記 2' - 置換基それぞれは個別に、ハロゲン、アリル、アミノ、アジド、O - アリル、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、OCF₃、O - (CH₂)₂ - O - CH₃、2' - O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂O - N(R_m)(R_n)、または O - CH₂ - C(=O) - N(R_m)(R_n) であり、各 R_m および R_n は個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキルである。

【請求項 12】

請求項 11 記載の組成物において、前記 2' - 修飾基それぞれは個別に、- F、- OCH₃、または - O - (CH₂)₂ - O - CH₃ である。 10

【請求項 13】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも 1 つの外部領域の少なくとも 1 つは、4' - チオ修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 14】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも 1 つの外部領域の少なくとも 1 つは、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 15】

請求項 14 記載の組成物において、前記 4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシドの 2' - 置換基は、ハロゲン、アリル、アミノ、アジド、O - アリル、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、- OCF₃、O - (CH₂)₂ - O - CH₃、2' - O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂O - N(R_m)(R_n)、または O - CH₂ - C(=O) - N(R_m)(R_n) から選択されるものであり、各 R_m および R_n は個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキルである。 20

【請求項 16】

請求項 15 記載の組成物において、前記 2' - 置換基のそれぞれは個別に、- F、- OCH₃、- OCF₃、または - O - (CH₂)₂ - O - CH₃ である。

【請求項 17】

請求項 16 記載の組成物において、前記 2' - 修飾基のそれぞれは個別に、- OCH₃、または - O - (CH₂)₂ - O - CH₃ である。 30

【請求項 18】

請求項 2 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも 1 つの外部領域の少なくとも 1 つは、二環式糖部分を有するものである。

【請求項 19】

請求項 18 記載の組成物において、前記二環式糖部分はそれぞれ個別に、2' - O - (CH₂)_n - 4' 架橋を有し、n は 1 または 2 である。

【請求項 20】

請求項 1 記載の組成物において、前記第一オリゴマー化合物はギャップトモチーフを有するものである。 40

【請求項 21】

請求項 20 記載の組成物において、前記ギャップトオリゴマー化合物の外部領域は、それぞれ個別に、4' - チオ修飾ヌクレオシドまたは 2' - 修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 22】

請求項 20 記載の組成物において、前記ギャップトオリゴマー化合物の外部領域の 1 つは 4' - チオ修飾ヌクレオシドを有し、もう一方の外部領域は 2' - 修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 23】

請求項 22 記載の組成物において、前記第一オリゴマー化合物の 5' - 末端に位置する 50

前記外部領域は、2'-OCH₃、2'-F、または4'-チオ修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項24】

請求項22記載の組成物において、前記2'-修飾ヌクレオシドは、2'-OCH₃または2'-F修飾ヌクレオシドである。

【請求項25】

請求項24記載の組成物において、前記2'-修飾ヌクレオシドは、2'-OCH₃修飾ヌクレオシドである。

【請求項26】

請求項1記載の組成物において、前記第二のオリゴマー化合物はギャップモチーフを有するものである。

10

【請求項27】

請求項26記載の組成物において、前記ギャップオリゴマー化合物の外部領域は、2'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド、または二環式糖部分を有するヌクレオシドを有するものである。

【請求項28】

請求項27記載の組成物において、前記ギャップオリゴマー化合物の外部領域の少なくとも1つは、ハロゲン、アリル、アミノ、アジド、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択される2'-修飾ヌクレオシドを有するものであり、各R_mおよびR_nは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキルである。

20

【請求項29】

請求項28記載の組成物において、前記ギャップオリゴマー化合物の外部領域の少なくとも1つは、アリル、O-アリル、O-C₂~C₁₀アルキル、O-(CH₂)₂-O-CH₃、または2'-O(CH₂)₂SCH₃から選択される2'-修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項30】

請求項29記載の組成物において、前記2'-修飾基のそれぞれは、-O-(CH₂)₂-O-CH₃である。

30

【請求項31】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、二環式糖部分を有するものである。

【請求項32】

請求項31記載の組成物において、前記二環式糖部分はそれぞれ個別に2'-O-(CH₂)_n-4'架橋を有し、nは1または2である。

【請求項33】

請求項2記載の組成物において、ギャップモチーフを有する前記オリゴマー化合物の各外部領域は、それぞれ個別に約1~約6ヌクレオシドを有するものである。

【請求項34】

請求項2記載の組成物において、ギャップモチーフを有する前記オリゴマー化合物の各外部領域は、それぞれ個別に約1~約4ヌクレオシドを有するものである。

40

【請求項35】

請求項2記載の組成物において、ギャップモチーフを有する前記オリゴマー化合物の各外部領域は、それぞれ個別に約1~約3ヌクレオシドを有するものである。

【請求項36】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の1つは、下記の構造式：



を有する交互モチーフを有するものであり、

50

各 L は、個別にインターヌクレオシド結合基であり、
 各 A は、 β -D-リボヌクレオシドまたは糖修飾ヌクレオシドであり、
 各 B は、 β -D-リボヌクレオシドまたは糖修飾ヌクレオシドであり、
 n は、約 7 ~ 約 11 であり、
 nn は、0 または 1 であり、

各 A ヌクレオシドを有する前記糖部分は同一であり、各 B ヌクレオシドを有する前記糖部分は同一であり、前記 A ヌクレオシドの糖部分は前記 B ヌクレオシドの糖部分とは異なり、A および B の少なくとも 1 つは糖修飾ヌクレオシドである。

【請求項 37】

請求項 36 記載の組成物において、各 A または各 B は、 β -D-リボヌクレオシドである。 10

【請求項 38】

請求項 36 記載の組成物において、各 A または各 B は、2'-修飾ヌクレオシドであり、前記 2'-置換基は、ハロゲン、アリル、アミノ、アジド、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SC₂H₅、O(CH₂)₂O-N(R_m)(R_n)、または O-(CH₂)₂-C(=O)-N(R_m)(R_n) から選択され、各 R_m および R_n は個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換 C₁~C₁₀アルキルである。

【請求項 39】

請求項 38 記載の組成物において、前記 2'-置換基は、アリル、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、O-(CH₂)₂-O-CH₃、または 2'-O(CH₂)₂SC₂H₅ である。 20

【請求項 40】

請求項 39 記載の組成物において、前記 2'-置換基は O-(CH₂)₂-O-CH₃ である。

【請求項 41】

請求項 36 記載の組成物において、各 A および B は修飾ヌクレオシドである。

【請求項 42】

請求項 41 記載の組成物において、各 A および B の一方は、2'-OCH₃ 修飾ヌクレオシドを有するものである。 30

【請求項 43】

請求項 42 記載の組成物において、各 A および B のもう一方は、2'-F 修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 44】

請求項 36 記載の組成物において、前記第二のオリゴマー化合物は交互モチーフを有し、各 A および各 B の一方は β -D-リボヌクレオシドである。

【請求項 45】

請求項 44 記載の組成物において、各 A および各 B のもう一方は、2'-修飾ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 46】

請求項 45 記載の組成物において、前記 2'-修飾ヌクレオシドの各 2'-置換基は、アリル、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、O-(CH₂)₂-O-CH₃、または 2'-O(CH₂)₂SC₂H₅ である。 40

【請求項 47】

請求項 46 記載の組成物において、前記 2'-修飾ヌクレオシドの各 2'-置換基は、O-(CH₂)₂-O-CH₃ である。

【請求項 48】

請求項 36 記載の組成物において、各 L は個別に、ホスホジエステル、またはホスホロチオエートインターヌクレオシド結合基である。

【請求項 49】

請求項 1 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の 1 つは、完全に修飾されたモチーフを有し、前記オリゴマー化合物の各ヌクレオシドは基本的に糖修飾ヌクレオシドであり、各糖修飾は同じである。

【請求項 50】

請求項 49 記載の組成物において、各糖修飾ヌクレオシドは、2' - 修飾ヌクレオシド、4' - チオ修飾ヌクレオシド、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシド、および二環式糖部分を有するヌクレオシドから選択されるものである。

【請求項 51】

請求項 50 記載の組成物において、前記完全に修飾されたオリゴマー化合物の各ヌクレオシドは、2' - 修飾ヌクレオシドである。

10

【請求項 52】

請求項 51 記載の組成物において、前記完全に修飾されたオリゴマー化合物の各ヌクレオシドは、2' - OCH₃、または 2' - F 修飾ヌクレオシドである。

【請求項 53】

請求項 52 記載の組成物において、前記完全に修飾されたオリゴマー化合物の各ヌクレオシドは、2' - OCH₃ 修飾ヌクレオシドである。

【請求項 54】

請求項 49 記載の組成物において、前記 3' および 5' 末端の 1 若しくは両方は、 β -D - リボヌクレオシドである。

【請求項 55】

請求項 1 記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の一方は、位置的に修飾されたモチーフを有するものである。

20

【請求項 56】

請求項 55 記載の組成物において、位置的に修飾されたモチーフを有する前記オリゴマー化合物は、約 4 ~ 約 8 領域から成る結合ヌクレオシドの連続配列を有するものであって、各領域は、 β -D - リボヌクレオシドの配列または糖修飾ヌクレオシドの配列であり、前記領域は交互であり、前記 β -D - リボヌクレオシド領域のそれぞれは、糖修飾ヌクレオシドの領域によって両側に隣接され、糖修飾ヌクレオシドの各領域は、片側にのみ隣接されるであろう 3' および 5' 末端に位置付けられた領域を除き、 β -D - リボヌクレオシド領域によって両側に隣接されるものであり、前記糖修飾ヌクレオシドは、2' - 修飾ヌクレオシド、4' - チオ修飾ヌクレオシド、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシド、および二環式糖部分を有するヌクレオシドから選択されるものである。

30

【請求項 57】

5 ~ 7 領域を有する、請求項 56 記載の組成物。

【請求項 58】

請求項 56 記載の組成物において、前記 β -D - リボヌクレオシド領域のそれぞれは、長さ 2 ~ 8 ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 59】

請求項 56 の組成物において、前記糖修飾ヌクレオシド領域のそれぞれは、長さ 1 ~ 4 ヌクレオシドを有するものである。

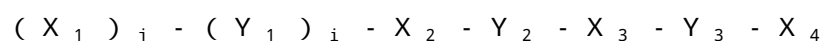
40

【請求項 60】

請求項 59 の組成物において、前記糖修飾ヌクレオシド領域のそれぞれは、長さ 2 ~ 3 ヌクレオシドを有するものである。

【請求項 61】

請求項 56 記載の組成物において、位置的に修飾されたモチーフを有する前記オリゴマー化合物は以下の化学式を有するものであり、



X₁ は、1 ~ 約 3 の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、

Y₁ は、1 ~ 約 5 の β -D - リボヌクレオシドの配列であり、

X₂ は、1 ~ 約 3 の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、

50

Y₂ は、2～約7の -D-リボヌクレオシドの配列であり、
 X₃ は、1～約3の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 Y₃ は、4～約6の -D-リボヌクレオシドの配列であり、
 X₄ は、1～約3の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 i は、0または1であり、
 j は、0または1であり、iが1の場合は1またはiが0のとき0である。

【請求項62】

請求項61記載の組成物において、

X₄ は、3の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 Y₃ は、5の -D-リボヌクレオシドの配列であり、
 X₃ は、2の糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 Y₁ は、2の -D-リボヌクレオシドの配列である。

10

【請求項63】

請求項62記載の組成物において、iは0であり、Y₂ は7の -D-リボヌクレオシドの配列である。

【請求項64】

請求項62記載の組成物において、iは1であり、jは0であり、Y₂ は2の -D-リボヌクレオシドの配列であり、Y₁ は5の -D-リボヌクレオシドの配列である。

【請求項65】

請求項62記載の組成物において、iは1であり、jは1であり、Y₂ は2の -D-リボヌクレオシドの配列であり、Y₁ は3の -D-リボヌクレオシドの配列であり、X₁ は2の糖修飾ヌクレオシドの配列である。

20

【請求項66】

請求項61記載の組成物において、前記糖修飾ヌクレオシドのそれぞれは、2'-修飾ヌクレオシド、または4'-チオ修飾ヌクレオシドである。

【請求項67】

請求項55記載の組成物において、前記第一鎖は、前記位置的モチーフを有するものである。

【請求項68】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の各インターヌクレオシド結合基は個別に、ホスホジエステル、またはホスホロチオエートから選択されるものである。

30

【請求項69】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のそれぞれは個別、に約12～約30ヌクレオシドを有するものである。

【請求項70】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のそれぞれは個別、に約17～約23ヌクレオシドを有するものである。

【請求項71】

請求項1記載の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のそれぞれは個別に、約19～約21ヌクレオシドを有するものである。

40

【請求項72】

請求項1の組成物において、前記第一および第二のオリゴマー化合物は、相補的アンチセンス/センス siRNA二本鎖を形成するものである。

【請求項73】

細胞、組織、または動物の遺伝子発現を阻害する薬物の調合における、請求項1記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

関連文献の相互参照

本明細書は、1) 2004年6月29日に出願された米国仮出願番号第60/584,045号および2004年9月7日に出願された米国仮出願番号第60/607,927号、2) 2004年6月3日に出願された米国一部継続出願番号第10/859,825号および2004年9月20日に出願された米国出願番号第10/946,147号、および3) 2004年6月3日に出願された国際出願の一部継続出願番号第PCT/US2004/017485号および2004年6月3日に出願された国際出願番号第PCT/US2004/017522号対して優先権を主張しており、それぞれの全体はこの参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、遺伝子発現を調節するオリゴマー化合物を有する組成物を提供する。1実施形態において、そのような調節はRNA干渉経路を介してなされる。本発明の調節オリゴマー化合物は、野生型核酸と比較して、様々な物理的特性および特質を増強できるモチーフを有している。より詳しくは、両鎖の調節は、RNAi経路などの選択された経路においてそれら特定の役割の有効性を最大限にするように、各鎖を非依存的に増強することを可能にする。前記組成物は、例えば選択された核酸分子を標的にし、1若しくはそれ以上の遺伝子の発現を調節するのに有用である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は標的RNAの一部にハイブリダイズし、その結果、前記標的RNAの正常機能を損失させるものである。

10

【背景技術】

20

【0003】

多くの生物種において、二本鎖RNA(dsRNA)の導入は、強力且つ特異的な遺伝子サイレンシングを誘発する。この現象は、植物及び動物の両方で起き、ウイルス防御及びトランスポゾンサイレンシング機構の役割を有するものである。この現象は、もともとは、ペチュニア花を研究する研究者らによって10年以上前に最初に報告されたものである。これらの花の紫色を濃くしようとして、Jorgensenらは、強力なプロモーターの制御下で色素産生遺伝子を導入した。濃い紫色を期待していたが、多くの花は、色がまだらになったり白くなるものさえあった。これは前記導入遺伝子及び相同の内在性遺伝子の両方の発現が抑制されたためであることから、Jorgensenは、観察された現象を"共抑制"と名付けた(Napoli et al., Plant Cell, 1990, 2, 279-289; Jorgensen et al., Plant Mol. Biol., 1996, 31, 957-973)。

30

【0004】

その後、共抑制は植物、菌類の多くの生物種で起こることが発見されているが、特にアカパンカビにおいて特に顕著に見出すことができ、"クエリング(queiling)"として知られている(Cogoni and Macino, Genes Dev. 2000, 10, 638-643; Guru, Nature, 2000, 404, 804-808)。

【0005】

dsRNAが動物において遺伝子サイレンシングを導くことができるという最初の証拠は、線形動物であるC. elegans(エレガンス線虫)の研究によってもたらされた。1995年に、研究者GuoおよびKempheusは、その機能を推定するために、アンチセンスRNAの使用を試み、par-1遺伝子の発現を停止した。予想されたように、前記アンチセンスRNAの注入はpar-1の発現を破壊したが、奇妙なことにそのセンス鎖コントロールの注入でも発現は破壊された(Guo et al., Cell, 1995, 81, 611-620)。この結果は、Fireらが線虫にdsRNA(センスおよびアンチセンス鎖両者の混合)を注入するまで謎であった。この注入は、センス鎖またはアンチセンス鎖単独の注入より、より効果的なサイレンシングをもたらした。細胞に対して少量のdsRNA分子の注入は、相同性遺伝子の発現を完全にサイレンスするのに十分であった。その上、虫の腸へのdsRNAの注入は、その虫全体だけでなく第一

40

50

世代子孫においても遺伝子サイレンシングを引き起こした (Fire et al., Nature, 1998, 391, 806~811)。

【0006】

この現象の効力によって、TimmonsおよびFireらは、線虫unc-22遺伝子に相同的なdsRNAを発現するように設計した線形動物細菌を与えることによってdsRNA効果の限界を探索することになった。驚くことに、これらの虫はunc-22ヌル様表現型を発生した (Timmons et al., Nature, 1998, 395, 854; Timmons et al., gene, 2001, 263, 103~112)。更なる研究によって、dsRNA中に虫を浸漬してもサイレンシングを誘導することができることが示された (Tabara et al., Science, 1998, 282, 430~431)。国際公開公報番号第WO01/48183号には、線形動物における標的遺伝子の発現を阻害する方法が開示されており、これには線虫による食物生物体の消化に続いて、前記標的遺伝子の一部と実質的に同一なヌクレオチド配列を有する二本鎖RNA構造を産生できる食物生物体を前記虫に与える工程、または前記二本鎖RNA構造を産生することができるDNAを導入する工程が含まれている。

10

【0007】

二本鎖RNA (dsRNA) への暴露に起因した線虫において定義された転写後遺伝子サイレンシングは、RNA干渉 (RNAi) と表された。この用語は、共抑制とは違って、トランスジェニックDNAは導入遺伝子および内因性遺伝子の両者のサイレンシングを導く、内因性標的mRNAレベルの配列特異的減少を導くdsRNAに関する遺伝子サイレンシングの全ての形態を一般化するようになった。

20

【0008】

線虫への外因性二本鎖RNA (dsRNA) の導入は、相同性配列を含む遺伝子の活性を特異的に且つ強力に破壊することを示した。Montgomeryらは、dsRNAの主要な干渉効果は転写後であると示唆し、この結論はdsRNA仲介性干渉後の主要DNA配列の検討、すなわち改変の証拠がないという発見の後のその下流遺伝子の活性には影響を及ぼさない上流オペロンの改変を含む研究に由来している。これらの結果は転写の開始または延長における影響に反する。最終的に彼らは、転写産物の細胞質蓄積は実質的に排除された一方、dsRNA仲介性干渉によって、完全ではないが核における新生転写産物の蓄積における実質的な減少を産生したことをin situハイブリダイゼーションによって観察した。これらの結果は、内因性mRNAは干渉の主要な標的であることを示し、翻訳が起こる前に前記標的mRNAを分解するメカニズムを示唆するものであった。また、このメカニズムは、異常なメッセージを標的化し破壊することに関与する線虫におけるmRNA監視システムであるSMGシステムに依存しないことも見出された。その著者はさらに、dsRNAが分解のために相同性mRNAを標的化する触媒性メカニズムとしてどのように機能するかのモデルを示唆した (Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502~15507)。

30

【0009】

多くのRNAiの特徴を再現するシンシウム胚盤葉ショウジョウバエ胚からの無細胞システムの開発が報告された。この反応において観察された干渉は、配列特異的であり、一本鎖RNAではなくdsRNAによって促進され、特異的mRNA分解によって機能し、dsRNAの最小長を必要とする。その上、dsRNAのプレインキュベーションはその活性を増強し、これはRNAiが可溶性反応における配列特異的工工程によって仲介され得ることを示している (Tuschl et al., Genes Dev., 1999, 13, 3191~3197)。

40

【0010】

一連の実験において、Tuschlらはショウジョウバエin vitroシステムを用いて、21-および22-nt RNA断片はRNAiの配列特異的メディエーターであることを示した。これらの断片 (低分子干渉RNAs (siRNA) と名付けられた)

50

は、長 dsRNA から RNase III 様プロセッシング反応によって産生されることが示された。彼らはさらに、オーバーハング 3' 末端を有する化学的に合成された siRNA 二本鎖はショウジョウバエ可溶化液において効率的な標的 RNA 切断を仲介し、その切断部位は誘導 siRNA によって広がった領域の中心付近に位置付けられていることを示した。さらに彼らは、dsRNA プロセッシングの方向性は、センスまたはアンチセンス標的 RNA が siRNA-タンパク質複合体によって切断され得るかどうかを決定すると示唆した (Elbashir et al., *Genes Dev.*, 2001, 15, 188~200)。さらに 21~23 ヌクレオチド siRNA に起因する内因性および異種性遺伝子の発現の抑制に関する特徴は、ヒト胚性腎臓 (293) および HeLa 細胞を含むいくつかの哺乳類細胞株において調査された (Elbashir et al., *Nature*, 2001, 411, 494~498)。

10

【0011】

Tijsterman らは、実は、アンチセンス極性の一本鎖 RNA オリゴマーは遺伝子サイレンシングの強力な誘導因子となり得ることを示していた。共抑制の場合のように、彼らは、アンチセンス RNA は RNAi 遺伝子 *rde-1* および *rde-4* とは個別に働くが、変異誘発物 / RNAi 遺伝子 *mut-7* および仮想 DEAD box RNA ヘリカーゼである *mut-14* を必要とすることを示した。著者によると、彼らのデータは、遺伝子サイレンシングは、続いて分解される dsRNA を導く型として mRNA を用いた RNA プライマー伸長によって達成されるという仮説を支持し、これは一本鎖 RNA オリゴマーが RNAi 現象に最終的に関与していることを示唆するものである (Tijsterman et al., *Science*, 2002, 295, 694~697)。

20

【0012】

いくつかのほかの刊行物は、RNAi 活性に必要とされる dsRNA トリガーに対する構造的必要性を記載していた。最近の報告は、理想的な dsRNA 配列は 2 nt 3' 末端オーバーハングを含む長さ 21 nt であると示唆した (Elbashir et al., *EMBO (2001)*, 20, 6877~6887, Sabine Brantl, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1575, 15~25)。このシステムにおいて、3' 末端から 2'-デオキシヌクレオシドでの 4 ヌクレオシドの置換は、活性に影響を及ぼさないことを示した。一方、配列 (センスまたはアンチセンス) に亘る 2'-デオキシヌクレオシドまたは 2'-OMe-ヌクレオシドでの置換は、RNAi 活性に対して有害であることが示された。

30

【0013】

線虫における RNA サイレncing に対する構造的必要性の調査は、インターヌクレオチド結合の修飾 (ホスホロチオエート) によって活性を干渉しないことを示した (Parrish et al., *Molecular Cell*, 2000, 6, 1077~1087)。2'-アミノまたは 5'-ヨードウリジンのような化学修飾は dsRNA のセンスにおいてよく許容されるがアンチセンス鎖では許容されないことが Parrish らによって示され、これは RNAi の 2つの鎖は異なる役割を担っていることを示唆するものであった。グアニンからイノシンへ (1つの水素結合を失う) などの塩基修飾は、修飾の位置 (センスまたはアンチセンス) とは関係なく RNAi 活性を減少することが示された。同じ「位置とは無関係な」活性の減少は、dsRNA トリガーにおける mismatches の導入に続いて観察された。修飾のいくつかのタイプ、例えば 5-ヨード U などの立体的に要求される塩基の導入は、アンチセンス鎖に位置付けられた場合、RNAi 活性に有害であることが示された一方、センス鎖に位置付けられた修飾は RNAi 活性に対する有害度はより少ないと示された。21 nt dsRNA 配列の場合のように、RNA-DNA ヘテロ二本鎖は RNAi に対するトリガーとして働かなかった。しかしながら、2'-F-2'-デオキシヌクレオシドを含む dsRNA は、2'-F-2'-デオキシヌクレオシドの位置 (センスまたはアンチセンス) とは関係なく RNAi 反応の引き金を引くのに有効であるように見られた。

40

【0014】

50

1 実験において、遺伝子発現の減少は、移植後マウス胚において電気穿孔 dsRNA および 25mer モルフォリノを用いて研究された (Mellitzer et al., Mechanisms of Development, 2002, 118, 57~63)。このモルフォリノオリゴマーは、活性を示したが dsRNA と同程度有効ではなかった。

【0015】

多くの PCT 出願が RNAi 減少に関連して公開されている。これらは：国際公開公報番号第 WO00/44895 号；国際公開公報番号 WO00/49035 号；国際公開公報番号 WO00/63364 号；国際公開公報番号 WO01/36641 号；国際公開公報番号 WO01/36646 号；国際公開公報番号 WO99/32619 号；国際公開公報番号 WO00/44914 号；国際公開公報番号 WO01/29058 号；および国際公開公報番号 WO01/75164 号を含む。

10

【0016】

米国特許番号第 5,898,031 号明細書および第 6,107,094 号明細書には、RNA 様特性を有する特定のオリゴヌクレオチドが記載されている。RNA とハイブリダイズした場合、これらオリゴヌクレオチドは dsRNA 酵素の基質としての役目をし、その結果前記酵素による RNA の切断が生じる。

【0017】

別の刊行物において (Martinez et al., Cell, 2002, 110, 563~574)、一本鎖 siRNA と同様に二本鎖 siRNA は、eIF2C1 および eIF2C2 (ヒト GERp950 Argonaut タンパク質) と共に RNA 誘導性サイレンシング複合体 (RISC) に存在することが示された。5'-リン酸化一本鎖 siRNA の活性は、このシステム研究において二本鎖 siRNA と同程度であった。関連研究において、5'-リン酸化部位の封入は、ショウジョウバエ胚における siRNA の in vivo での活性を増強することが示された (Boutla et al., Curr. Biol., 2001, 11, 1776~1780)。別の研究において、5'-リン酸化はヒト HeLa 細胞における siRNA 機能に必要であったことが報告された (Schwarz et al., Molecular Cell, 2002, 10, 537~548)。

20

【0018】

非修飾組成物と比較して安定性および効力を含む特性を増強しようと試みるために、siRNA 組成物に多種多様な化学修飾を行った。初期の研究の多くは、他の鎖は非修飾で保持しながら一本鎖の修飾を観察していた。より最近の研究は、両鎖の修飾に焦点を当てていた。

30

【0019】

1 グループは、各鎖が交互性パターンを有する (ここにおいて各ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドのブロックは非修飾 - D - リボヌクレオシドと交互に現れる) ように siRNA 二本鎖の両鎖を修飾するという研究をしている。修飾部位で使用された化学修飾は、2'-OCH₃ 修飾ヌクレオシドである (2004年2月18日に公開された欧州公開公報番号第 EP1389637 A1 号、および 2004年2月19日に公開された国際公開公報番号第 WO2004015107 号を参照)。

40

【0020】

別のグループは、両鎖に修飾を有した多数の siRNA コンストラクトを調製した (2003年8月28日に公開された国際公開公報番号第 WO03/070918 号を参照)。開示された前記コンストラクトは通常、鎖の修飾によって、さらにはその鎖におけるプリンおよびピリミジンの位置付けによって決定付けられるパターンで分散したヌクレオシドを修飾した。一般的に、アンチセンス鎖におけるプリンは 2'-OCH₃ または 2'-H、ピリミジンは 2'-F であり、センス鎖におけるプリンは 2'-H、ピリミジンは 2'-OCH₃ または 2'-F である。本明細書において使用された定義に従うと、これらのコンストラクトは置換パターンに対するセットモチーフがないように位置的に修飾され

50

るように見え、位置的な修飾はランダム置換パターンを表すことができる。

【0021】

二環性糖部位を有する特定のヌクレオシド化合物は、固定核酸またはLNAとして知られている(Koshkin et al., Tetrahedron 1998, 54, 3607~3630)。これらの化合物は、その文献内で二環式ヌクレオチド類似体としても言及されているが(Imanishi et al., 国際出願番号第WO98/39352号)、この用語はLNAに加えて他の類似体を含む化合物の属にも適用可能である。そのような修飾ヌクレオシドは、結合親和性の増強、およびヌクレアーゼに対する抵抗性の増加という利点を有した未変性リボヌクレオシドの3'-エンド糖立体配座を模倣する。

10

【0022】

1グループは最近、siRNA二本鎖内にそれぞれ4'-CH₂-O-2'架橋を有する、二環式ヌクレオシドの取り込みは、増強されたヌクレアーゼ抵抗性を介して、血清における半減期を劇的に改善し、増加した親和性によって前記二本鎖安定性も増加したことを報告した。この効果は、siRNA二本鎖内の特異的位置として位置付けられた最低LNAを有するのに見られた。センス鎖の5'末端へのLNAの配置は、標的ではない効果を軽減するこの鎖の荷重を軽減するのに見られた(Elmen et al., Nucleic Acids Res., 2005, 33(1), 439~447)。

【0023】

いくつかのLNAは、糖環の4'炭素原子に結合している2'-ヒドロキシル基を有しており、それにより二環式糖部位を形成している。この結合は、2'酸素原子および4'炭素原子とを架橋するメチレン(-CH₂-)_n基となり、ここにおいてnは1または2である(Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455~456; 米国特許公開公報番号第:第US2002/0147332号、および日本出願番号第平-11-33863号(1999年2月12日))。

20

【0024】

米国公開公報番号第2002/0068708号には、様々な立体構造および化学組成物を含む二環式糖を作る様々な架橋を保持する様々な二環式等部位を有する、多数のヌクレオシドが開示されている。

【0025】

Braashら(Biochemistry 2003, 42, 7967~7975)は、siRNAの有効性を損なうことなくLNA修飾siRNAの熱安定性を改善することを報告した。Grunwellerら(Nucleic Acid Research, 2003, 31, 3185~3193)は、特定のLNAギャップマーおよびsiRNAの効力を開示した。

30

【0026】

1グループは、形質細胞様樹状細胞における配列特異的TLR7依存性免疫反応を誘発するsiRNA二本鎖内の9塩基配列を同定した。この免疫活性化は、3'末端でのセンス鎖の4'-CH₂-O-2'架橋(LNA)をそれぞれ有する4二環式ヌクレオシドの取り込みによって減少された。彼らはまた、1つの鎖はヌクレオシドを修飾され、もう一本は非修飾であるsiRNA二本鎖への取り込みに対するセンスおよびアンチセンスの5'、および3'と5'の両方バージョンも作成した(Hornung et al., 2005, 11(3)I, 263~270を参照)。

40

【0027】

1グループの研究者は、シグナル伝達(インスリン様増殖因子受容体(IGF1R)および分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ1(MAPK14またはp38))に関与した2つの遺伝子のsiRNA誘導性サイレンシングの有効性および特異性に関するゲノムワイド解析を実行するために発現プロファイリングを使用した。ユニークな発現プロファイルは、MAPK14を標的にした8siRNA、およびIGF1Rを標的にした16siRNAのそれぞれを生じ、これは標的ではない効果が特定の配列に高度に依存している

50

ことを示唆するものである。これらの発現パターンは各個人 *siRNA* を再産生可能であった。このグループは、標的ではない効果は *siRNA* 二本鎖のアンチセンス鎖およびセンス鎖両方に起因すると決定した。アンチセンスのみを選択的に取り込み、その結果、*RISC* へ取り込まれたセンス鎖に起因する標的ではない効果を減少するように設計された *siRNA* に対する必要性がある。

【0028】

本明細書の同一出願人による多数の公開された出願は二本鎖組成物を開示しており、ここにおいて1若しくは両方の鎖は特定のモチーフを有する。このモチーフは、ヘミマー (*hemimer*) モチーフ、ブロックマー (*blockmer*) モチーフ、ギャップト (*gapped*) モチーフ、完全に修飾されたモチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、および交互モチーフを含む (2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/044133号、3'-エンドモチーフ; 2004年12月29日に公開された国際出願番号第WO2004/113496号、3'-エンドモチーフ; 2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/044136号、交互モチーフ; 2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/044140号、2'-修飾モチーフ; 2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/043977号、2'-Fモチーフ; 2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/043978号、2'-OCH₃モチーフ; 2004年5月21日に公開された国際出願番号第WO2004/041889号、多環式糖モチーフ; 2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/043979号、糖代用モチーフ; および2004年5月27日に公開された国際出願番号第WO2004/044138号、キメラモチーフを参照、さらに2005年4月14日に公開された米国出願番号第US20050080246号も参照のこと)。

【0029】

RNAse H 経路のように、遺伝子発現のアンチセンス調節の *RNA* 干渉経路は、特異的遺伝子産物のレベルを調節するための有効手段であり、従って遺伝子サイレンシングに関わる多くの治療、診断および研究適用に比類なく有用であると分かる。従って、本発明はさらに *RNA* 干渉などの作用アンチセンスメカニズム、*dsRNA* 酵素、さらには非アンチセンスメカニズムに依存している経路を含む、遺伝子発現経路を調節するのに有用な組成物を提供する。この開示を一度理解した本分野の当業者は、過度な実験をすることなしに、これらの使用のための付加的な組成物を同定することができるであろう。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0030】

1 実施形態において、本発明は第一のオリゴマー化合物と第二のオリゴマー化合物とを有する組成物を提供し、ここにおいて前記第一の少なくとも一部は前記第二のオリゴマーの少なくとも一部とハイブリダイズすることができ、前記第一のオリゴマー化合物の少なくとも一部は選択された核酸標的と相補的でありハイブリダイズすることができるものである。第一および第二のオリゴマー化合物の1つは、インターヌクレオシド結合基によって結合されているヌクレオシドを有し、前記結合されたヌクレオシドはギャップトモチーフを有するものである。もう1つの前記第一および第二のオリゴマー化合物は、インターヌクレオシド結合基によって結合されたヌクレオシドを有し、前記結合されたヌクレオシドはギャップトモチーフ、交互モチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、完全に修飾されたモチーフ、ブロックマーモチーフ、またはヘミマーモチーフを有するものである。

【0031】

前記組成物はさらに、任意のオーバーハング、リン酸部分、共役基、もしくはキャップ (キャッピング) 基の1若しくはそれ以上を有する。前記第一および第二のオリゴマー化合物それぞれが個別にギャップトモチーフを有する場合、少なくとも1つの前記第一および第二のオリゴマー化合物の3'または5'末端少なくとも1つが2'-OCH₃ 修飾ヌクレオチド以外の修飾ヌクレオチドを有するか、または少なくとも1つの前記第一および

第二のオリゴマー化合物が非対称ギャップトモチーフを有する。

【0032】

1実施形態において、ギャップトモチーフを有する各オリゴマー化合物は結合ヌクレオシドの外部領域に隣接された結合ヌクレオシドの内部領域を有し、前記内部領域のヌクレオシドは前記外部領域それぞれのヌクレオシドと異なり、前記外部領域それぞれのヌクレオシドは2'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド、および二環式糖部分を有するヌクレオシドから個別に選択される。1実施形態において、ギャップトモチーフを有する前記オリゴマー化合物の少なくとも1つの内部領域が、-D-リボヌクレオシドの配列である。別の実施形態において、ギャップトモチーフを有する前記オリゴマー化合物の少なくとも1つの内部領域が、修飾ヌクレオシド配列と2'-Fまたは4'-チオ修飾ヌクレオシドである。

【0033】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の1つは、対称ギャップトモチーフを有する。別の実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つは、非対称ギャップトモチーフを有する。更なる実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の一方は対称ギャップトモチーフを有し、前記第一および第二のオリゴマー化合物のもう一方は非対称ギャップトモチーフを有する。

【0034】

別の実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、2'-修飾ヌクレオシドを有する。更なる実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域それぞれは2'-修飾ヌクレオシドを有する。

【0035】

1実施形態において、前記オリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、2'-修飾ヌクレオシド内で修飾され、2'-修飾のそれぞれは個別に、ハロ、アシル、アミノ、アジド、O-アシル、O-C₁-C₁₀アルキル、OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)であり、各R_mとR_nが個別にH、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁-C₁₀アルキルである。2'-修飾は、-F、-OCH₃、または-O-(CH₂)₂-O-CH₃を含む。

【0036】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、4'-チオ修飾ヌクレオシドを有する。別の実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシドを有する。1実施形態において、前記4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシドの2'-置換基はハロゲン、アシル、アミノ、アジド、O-アシル、O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)から選択され、各R_mおよびR_nは個別にH、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁-C₁₀アルキルである。1実施形態において、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシドの各2'-置換基は、-F、-OCH₃、-OCF₃、または-O-(CH₂)₂-O-CH₃から選択され、-OCH₃または-O-(CH₂)₂-O-CH₃が適している。

【0037】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つは二環式糖部分を有する。別の実施形態において、二環式糖部分のそれぞれは個別に、2'-O-(CH₂)_n-4'架橋を有し、nは1または2である。

【0038】

1実施形態において、前記第一のオリゴマー化合物はギャップトモチーフを有する。更なる実施形態において、前記第一のオリゴマー化合物はギャップトモチーフを有し、前記

外部領域それぞれは個別に、4' - チオ修飾ヌクレオシドまたは2' - 修飾ヌクレオチドを有する。別の実施形態において、前記第一オリゴマー化合物の前記外部領域の一方は、4' - チオ修飾ヌクレオシドを有し、もう一方の前記外部領域は、2' - 修飾ヌクレオシドを有する。別の実施形態において、前記2' - 修飾ヌクレオチドは2' - OCH₃または2' - F修飾ヌクレオシドであり、2' - OCH₃修飾ヌクレオチドが適している。別の実施形態において、前記第一のオリゴマー化合物の5' - 末端に位置する外部領域は2' - OCH₃、2' - F、または4' - チオ修飾ヌクレオシドを有する。

1実施形態において、前記第二のオリゴマー化合物は、ギャップモチーフを有する。別の実施形態において、前記第二のギャップオリゴマー化合物の外部領域は、2' - 修飾ヌクレオシド、4' - チオ修飾ヌクレオシド、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシド、または二環式糖部分を有するヌクレオシドを有する。更なる実施形態において、前記第二のギャップオリゴマー化合物の外部領域の少なくとも1つは、ハロゲン、アрил、アミノ、アジド、O - アрил、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、- OCF₃、O - (CH₂)₂ - O - CH₃、2' - O(CH₂)₂SCH₃、O - (CH₂)₂ - O - N(R_m)(R_n)、またはO - CH₂ - C(=O) - N(R_m)(R_n)から選択され、各R_mおよびR_nは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁ ~ C₁₀ アルキルである。別の実施形態において、前記第二のギャップオリゴマー化合物の外部領域の少なくとも1つは、アрил、O - アрил、O - C₂ ~ C₁₀ アрил、O - (CH₂)₂ - O - CH₃、または2' - O(CH₂)₂SCH₃から選択される2' - 修飾ヌクレオシドを有する。別の実施形態において、前記第二ギャップオリゴマー化合物の各2' - 修飾ヌクレオシドは、2' - O - (CH₂)₂ - O - CH₃修飾ヌクレオシドである。

【0039】

別の実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の少なくとも1つの外部領域の少なくとも1つが、少なくとも1つの二環式糖部分を有する。前記外部領域の1つにおける各修飾糖は、二環式糖部分とすることができる。二環式糖部分は個別に2' - O - (CH₂)_n - 4' 架橋を有し、nは1または2である。

【0040】

1実施形態において、ギャップモチーフを有する各オリゴマー化合物の外部領域は、それぞれ個別に約1 ~ 約6のヌクレオシドから成る。別の実施形態において、ギャップモチーフを有する各オリゴマー化合物は、それぞれ個別に約1 ~ 約4のヌクレオシドから成る。別の実施形態において、ギャップモチーフを有する各オリゴマー化合物は、それぞれ個別に約1 ~ 約3のヌクレオシドから成る。

【0041】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の1つが下記の構造式：
5' - A(-L-B-L-A)_n(-L-B)_nn - 3'
を有する交互モチーフを有し、ここで、
各Lは、個別にインターヌクレオシド結合基であり、
各Aは、-D-リボヌクレオシドまたは糖修飾ヌクレオシドであり、
各Bは、-D-リボヌクレオシドまたは糖修飾ヌクレオシドであり、
nは、約7 ~ 約11であり、
nnは、0または1であって、
各Aヌクレオシドを有する前記糖鎖は同一であり、各Bヌクレオシドを有する前記糖鎖は同一であり、Aヌクレオシドの前記糖鎖はBヌクレオシドの前記糖鎖とはことなり、AおよびBの少なくとも1つは糖修飾ヌクレオシドである。

【0042】

1実施形態において、各Aまたは各Bは-D-リボヌクレオシドである。別の実施形態において、各Aまたは各Bは、2' - 修飾ヌクレオシドであり、この2' - 置換基は、ハロゲン、アрил、アミノ、アジド、O - アрил、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、OCF₃、O - (CH₂)₂ - O - CH₃、2 - O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂O

- N (R_m) (R_n)、または O - (C H₂) - C (= O) - N (R_m) (R_n) から選択され、各 R_m および R_n は、個別に H、アミノ保護基、または置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキルである。1実施形態において、前記 2' - 置換基はアリル、O - アリル、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、O - (C H₂)₂ - O - C H₃、または 2' - O (C H₂)₂ S C H₃ であり、O - (C H₂)₂ - O - C H₃ が特に好ましい。

【0043】

1実施形態において、各 A および各 B は修飾ヌクレオシドである。1実施形態において、各 A および各 B の1つは、2' - O C H₃ 修飾ヌクレオシドを有する。別の実施形態において、各 A および各 B は 2' - F 修飾ヌクレオシドを有する。

【0044】

1実施形態において、前記第二のオリゴマー化合物は交互モチーフを有し、各 A および各 B の1つは - D - リボヌクレオシドである。別の実施形態において、各 A および各 B のもう1つは 2' - 修飾ヌクレオシドを有し、ここにおいて 2' - 置換基は、これに限定されるものではないが、アリル、O - アリル、O - C₁ ~ C₁₀ アルキル、O - (C H₂)₂ - O - C H₃、または 2' - O (C H₂)₂ S C H₃ であり、O - (C H₂)₂ - O - C H₃ が特に好ましい。

【0045】

1実施形態において、各 L は個別に、リン酸ジエステル、またはホスホロチオエートインターヌクレオシド結合基である。

【0046】

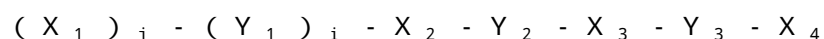
1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の1つは完全に修飾されたモチーフを有し、基本的に前記オリゴマー化合物の各ヌクレオシドは糖修飾ヌクレオシドであり、各糖修飾は同一である。1実施形態において、各糖修飾ヌクレオシドは 2' - 修飾ヌクレオシド、4' - チオ修飾ヌクレオシド、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシド、および二環式糖部位を有するヌクレオシドから選択される。別の実施形態において、前記完全に修飾されたオリゴマー化合物の各ヌクレオシドは 2' - 修飾ヌクレオシドであり、2' - O C H₃ または 2' - F 修飾ヌクレオシドは適しており、2' - O C H₃ 修飾オリゴヌクレオシドは特に適している。別の実施形態において、前記完全に修飾されたオリゴマー化合物は、1つの - D - リボヌクレオシドを有する 3' および 5' 末端の1または両方を含む。

【0047】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物の1つは位置的に修飾されたモチーフを有し、前記位置的に修飾されたモチーフは約 4 ~ 約 8 領域から成る結合ヌクレオシドの連続した配列を有しており、各領域は - D - リボヌクレオシドの配列または糖修飾ヌクレオシドの配列であり、前記領域は交互であり、各前記 - D - リボヌクレオシド領域は糖修飾ヌクレオシドによって各側で隣接されており、糖修飾ヌクレオシドの各領域は - D - リボヌクレオシド領域によって各側で隣接されており (片側にのみ隣接される 3' および 5' 末端に位置した領域は例外である)、前記糖修飾ヌクレオシドは 2' - 修飾ヌクレオシド、4' - チオ修飾ヌクレオシド、4' - チオ - 2' - 修飾ヌクレオシド、および二環式糖部位を有するヌクレオシドから選択されるものである。1実施形態において、前記位置的に修飾されたモチーフは 5 ~ 7 領域を有している。別の実施形態において、前記 - D - リボヌクレオシド領域は長さ 2 ~ 8 ヌクレオシドを有している。更なる実施形態において、前記糖修飾ヌクレオシド領域は、長さ 1 ~ 4 ヌクレオシド、または長さ 2 ~ 3 ヌクレオシドを有している。

【0048】

1実施形態において、位置的に修飾されたモチーフを有するオリゴマー化合物は、以下の構造式：



を有しており、ここで、

X₁ は、1 ~ 約 3 糖修飾ヌクレオシドの配列であり、

10

20

30

40

50

Y_1 は、1～約5 - D - リボヌクレオシドの配列であり、
 X_2 は、1～約3糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 Y_2 は、2～約7 - D - リボヌクレオシドの配列であり、
 X_3 は、1～約3糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 Y_3 は、4～約6 - D - リボヌクレオシドの配列であり、
 X_4 は、1～約3糖修飾ヌクレオシドの配列であり、
 i は、0または1であり、
 j は、0または1であり、 i が1の場合は1または i が0のとき0である。

【0049】

別の実施形態において、 X_4 は3糖修飾ヌクレオシドの配列であり、 Y_3 は5 - D - リボヌクレオシドの配列であり、 X_3 は2糖修飾ヌクレオシドの配列であり、 Y_1 は2 - D - リボヌクレオシドの配列である。別の実施形態において、 i は0であり、 Y_2 は7 - D - リボヌクレオシドの配列である。別の実施形態において、 i は1であり、 j は0であり、 Y_2 は2 - D - リボヌクレオシドの配列であり、 Y_1 は5 - D - リボヌクレオシドの配列である。別の実施形態において、 i は1であり、 j は1であり、 Y_2 は2 - D - リボヌクレオシドの配列であり、 Y_1 は3 - D - リボヌクレオシドの配列であり、 X_1 は2糖修飾ヌクレオシドの配列である。1実施形態において、各前記糖修飾ヌクレオシドは2' - 修飾ヌクレオシドまたは4' - チオ修飾ヌクレオシドである。

【0050】

1実施形態において、前記組成物の第一鎖は、位置的なモチーフを有する。別の実施形態において、前記位置的に修飾されたオリゴマー化合物の各インターヌクレオシド結合基は個別に、ホスホジエステルまたはホスホロチオエートから選択される。

1実施形態において、第一および第二のオリゴマー化合物はそれぞれ個別に、約12～約30ヌクレオシドから成る。更なる実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のそれぞれは個別に、約17～約23ヌクレオシドから成る。別の実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物のそれぞれは個別に、約19～約21ヌクレオシドから成る。

【0051】

1実施形態において、前記第一および第二のオリゴマー化合物は相補的アンチセンス/センス $s i R N A$ 二本鎖を形成する。

【0052】

1実施形態において、本発明は、1若しくはそれ以上の細胞、組織または動物を以下に記載された組成物と接触させる工程を有する、遺伝子発現を阻害する方法も提供する。

【0053】

別の実施例において、本発明の組成物は細胞、組織、または動物における遺伝子発現を阻害するための薬物の調合において使用される。

【0054】

本発明は二本鎖組成物を提供し、各鎖は1若しくはそれ以上の修飾されたヌクレオシドおよび修飾されたおよび未修飾のヌクレオシドの位置によって定義されたモチーフを有するものである。モチーフは鎖における他の修飾されたおよび未修飾のヌクレオシドに対する、修飾されたヌクレオシドの位置付けに由来し、インターヌクレオシド結合のタイプ、あるいは核酸塩基のタイプ（例えばプリンまたはピリミジン）と無関係である。本発明の組成物は、前記モチーフまたは前記各化学的性質が異なるように、異なって修飾された鎖を有している。この戦略は、遺伝子調節の工程におけるそれらの意図された役割（例えばRNA干渉）とは無関係で、各鎖の望ましい特性を最大限にできる。各鎖の化学的性質およびモチーフを調節することは、個別に、各鎖を領域的に増強することも可能である。より具体的には、本発明はギャップモチーフを保持する一方の鎖と、ギャップモチーフ、ヘミマーモチーフ、ブロックマーモチーフ、完全に修飾されたモチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、または交互モチーフを保持するもう一方の鎖とを有する。

【0055】

本発明の様々なモチーフの組み合わせを有する前記組成物は、増強された特性を保持することが示された。増強され得るこの特性は、これに限定されるものではないが、タンパク質結合、タンパク質オフ割合 (off-rate)、吸収およびクリアランスの調節を介した薬物動態的特性の調節；ヌクレアーゼ安定性や化学的安定性の調節；結合親和性およびオリゴマーの特異性（相補的配列および酵素に対する親和性および特異性）の調節；およびRNA切断の有効性の増加を含む。

【0056】

二本鎖領域を形成するように完全にまたは少なくとも部分的にハイブリダイズされた第一および第二のオリゴマー化合物を有し、さらに核酸標的と相補的でハイブリダイズする領域を有する組成物が提供される。そのような組成物は、核酸標的と完全なまたは部分的な相補性を保持するアンチセンス鎖である第一のオリゴマー化合物、および第一のオリゴマー化合物と相補的な1若しくはそれ以上の領域を持ち、第一のオリゴマー化合物と少なくとも1つの二本鎖領域を形成するセンス鎖である第二のオリゴマー化合物を有することが適当である。

10

【0057】

本発明の組成物は、例えば遺伝子発現の調節に有用である。例えば、標的細胞、細胞群、組織あるいは動物は、遺伝子発現を直接阻害できるmRNAの減少をもたらすために本発明の組成物と接触させる。別の実施形態において、前記mRNAの減少は、標的遺伝子から非標的遺伝子に関連した経路を介して非標的遺伝子を間接的に上方制御する。本発明の組成物を用いた遺伝子を制御するための数多くの方法およびモデルは、本分野および以下の実施例の項において説明されている。

20

【0058】

本発明の組成物は、核酸標的とハイブリダイズし、その結果その正常機能を損失させることによって遺伝子発現を調節する。ここで用いられたように、「標的核酸」または「核酸標的」という用語は制限なく、DNA、そのようなDNAから転写されたRNA（プレmRNAおよびmRNA、またはそれらの一部を含む）、およびそのようなRNAに由来したcDNAも含む、標的化され得るあらゆる核酸を便宜上範囲に含むために使用される。いくつかの実施形態において、前記標的核酸はメッセンジャーRNAである。別の実施形態において、前記標的化メッセンジャーRNAの分解は、本発明の組成物で形成された活性化RISC複合体によって促進される。別の実施形態において、前記標的化メッセンジャーRNAの分解は、RNase Hなどのヌクレアーゼによって促進される。

30

【0059】

本発明は二本鎖組成物を提供し、ここにおいて前記鎖の1つは例えば反対鎖のRISC（または切断）複合体への優先的な荷重に影響する場合に有用である。特に、本発明は反対の鎖の荷重をRISC（または切断）複合体へ移すために少なくとも1つの鎖に化学修飾を有するオリゴマー化合物を提供する。そのような修飾は、安定性を増強するように修飾された二本鎖コンストラクトの作用強度を増加するために使用され得る。第二の鎖の荷重を移す化学修飾の実施例としては、これに限定されるものではないが、MOE（2-O（CH₂）₂OCH₃）、2'-O-メチル、-エチル、-プロピル、および-N-メチルアセトアミドを含むと予想される。そのような修飾は鎖の至る所に分散され得る、または前記センス鎖上にギャップモチーフを形成するように5および/または3'末端に設置され得る。前記組成物は、選択された核酸を標的化し、1若しくはそれ以上の遺伝子の発現を調節するのに有用である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は標的RNAの一部にハイブリダイズし、その結果、前記標的RNAの正常機能を損失させるものである。

40

【0060】

本発明は二本鎖組成物を提供し、ここにおいて1つの鎖はギャップモチーフを有し、別の鎖はギャップモチーフ、ヘミマーモチーフ、ブロックマーモチーフ、完全に修飾されたモチーフ、位置的に修飾されたモチーフ、または交互モチーフを有する。本発明の組成物の各鎖は、例えばsiRNA経路などにおいて特定の役割を果たすように修飾され得

50

る。各鎖における異なるモチーフ、または各鎖に異なる化学修飾がある同じモチーフを使用することで、前記センス鎖の取り込みを阻害する一方、RISC複合体に対して前記アンチセンス鎖を標的化することが可能となる。このモデルにおいて、各鎖はその特定の役割のために増強されるように、個別に修飾され得る。前記アンチセンス鎖は、3'末端がRISCの異なる領域においてその役割を増強するように異なって修飾され得る一方、RISCの1領域においてその役割を増強するように5'末端で修飾される。研究者は様々なモデルを用いて、ガイド配列とRISCとの相互関係を調査していた。3'末端、5'末端、およびmRNAの切断部位と一致する領域に対する異なる要求性は、これらの研究を通じて解明された。ガイド配列の3'末端はPAZドメインと複合体化する一方、5'末端はPiwiドメインと複合体化する (Song et al., Science, 2004, 305, 1434~1437; Song et al., Nature Structural Biology, 2003, 10(12), 1026~1032; Parker et al., Letters to Nature, 2005, 434, 663~666)。

10

20

30

40

50

【0061】

本発明で用いるとおり、「ギャップモチーフ」という用語は、3領域に分割される隣接するヌクレオシド配列、つまり2つの外部領域に隣接した内部領域を含むことを意味する。前記領域は、前記ヌクレオシドを有する異なる糖鎖を少なくとも有することで、互いに区別される。ギャップオリゴマー化合物の領域を区別するために用いられるヌクレオシドのタイプには、-D-リボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド、および二環式修飾ヌクレオシドを含む。各領域は均一に修飾される、例えば糖部分は同一である。前記内部領域または前記ギャップは一般に-D-リボヌクレオシドを有するが、糖修飾ヌクレオシド配列とすることもできる。ギャップオリゴマー化合物のギャップに位置するヌクレオシドは、両方のウイングとは異なる糖部分を有する。

【0062】

ギャップオリゴマー化合物は、さらに「対称」または「非対称」とであると定義される。前記各ウイングにおいて同じ均一な糖修飾を有するギャップマーは、対称ギャップオリゴマー化合物と呼ばれる。各ウイングにおいて異なる均一の修飾を有するギャップマーは、非対称ギャップオリゴマー化合物と呼ばれる。これらのギャップオリゴマー化合物は、例えば、4'-チオ修飾ヌクレオシド(対称ギャップマー)を有する両方のウイング、および-D-リボヌクレオシド、または4'-チオ修飾ヌクレオシド以外の修飾ヌクレオシドを有するギャップを有することが可能である。非対称ギャップオリゴマー化合物は、例えば2'-OCH₃修飾ヌクレオシドを有する1つのウイングと、4'-チオ修飾ヌクレオシドを有するもう1つのウイング、および-D-リボヌクレオシドを有する内部領域(ギャップ)または4'-チオまたは2'-OCH₃修飾ヌクレオシド以外の糖修飾ヌクレオシドを有することができる。

【0063】

本発明で使用されるギャップオリゴマー化合物には、個別に1~約6ヌクレオシドを有するウイングを含む。適切なウイングは1~約4ヌクレオシドを有し、1~約3ヌクレオシドを有するウイングを有してもよい。各ウイングのヌクレオシド数は同じであっても異なってもよい。従って、本発明にはギャップオリゴマー化合物を含み、各ウイングは個別に1、2、3、4、5、または6糖修飾ヌクレオシドを有する。

【0064】

ギャップオリゴマー化合物は化学的に修飾されその性質が向上し、異なる修飾を行って、特にsiRNA二本鎖のアンチセンス鎖またはセンス鎖を亢進できる。本発明の1実施形態では、両鎖がギャップオリゴマー化合物である。両鎖がギャップオリゴマー化合物の場合、少なくとも1つは非対称ギャップオリゴマー化合物であるか、前記ギャップオリゴマー化合物のウイングの少なくとも1つは、2'-OCH₃修飾ヌクレオシド以外の糖修飾ヌクレオシドを有する。

【0065】

各鎖のギャップモチーフを有する本発明のオリゴマー化合物は、一般に各鎖のウイングで糖修飾を利用し、遺伝子調節で意図した役割について前記鎖を亢進する。例えば、前記センス鎖のウイングで $2' - MOE (2' - O - (CH_2)_2 - OCH_3)$ 修飾を利用すると、前記アンチセンス鎖の効率が上昇する。前記MOEギャップマーの大きなウイングはRISC複合体への取り込みを阻害し、それによって前記アンチセンス鎖の優先的ローディングが可能となり、的はずれの効果が減少し、前記アンチセンス鎖の効力が増大すると考えられている。本発明の組成物で前記センス鎖の取り込みを阻害するために、LNA修飾ヌクレオシドも利用された。

【0066】

前記センス鎖として使用するために修飾された前記ギャップオリゴマー化合物は、前記アンチセンス鎖として使用するために特異的に修飾されたギャップオリゴマー化合物とペアにすることができる。前記アンチセンス鎖は、前記ウイングにおける糖修飾ヌクレオシドを有することができ、これはRISCへの取り込みを阻害せず、ヌクレアーゼの安定性などの、他の性質をさらに向上させる。多数のギャップ組成物が作成、検討され、前記アンチセンス鎖のウイングは $2' - F$ 、 $2' - OCH_3$ 、および $4' - チオ$ から選択された糖修飾を有する。これらのアンチセンス鎖は対称および非対称モチーフの両方で調合された。前記アンチセンス鎖を利用した場合の前記非対称モチーフは、さらに前記 $3'$ および $5'$ - 末端の異なる化学的性質を、それぞれがRISC複体内で果たしている機能的に異なる役割にマッチさせることができる。多数の異なる対称ギャップアンチセンス鎖が作成され、異なるセンス鎖とペアにされ、それらの活性を決定した（活性データは以下の実施例のセクションに示す）。

【0067】

本発明で用いられたように、「交互モチーフ」という用語は、前記オリゴマー化合物の全体配列に本質的に交互となる2つの異なるヌクレオシドを有するヌクレオシドの近接する配列を含むことを意味している。交互のパターンは次の構造式： $5' - A - (-L - B - L - A)_n (-L - B)_n - 3'$ によって示され、ここにおいてAおよびBは少なくとも異なる糖鎖を保持することによって区別されたヌクレオシドであり、各Lはインターヌクレオシド結合基であり、nnは0または1であり、nは約7～約11である。これは、長さで約17～約24ヌクレオシドの交互オリゴマー化合物を可能にする。この長さの範囲はより長いおよびより短いオリゴマー化合物を制限することを意味するものではなく、本発明に従うものである。この構造式は、交互オリゴマー化合物に対して偶数および奇数の長さも可能であり、 $3'$ および $5'$ 末端ヌクレオシドは同じ（奇数）または異なる（偶数）である。

【0068】

本発明の交互オリゴマー化合物を有する「A」および「B」ヌクレオシドは、少なくとも異なる糖部位を保持することによって互いに異なる。AおよびBヌクレオシドのそれぞれは、 $-D-$ リボヌクレオシド、 $2'$ - 修飾ヌクレオシド、 $4'$ - チオ修飾ヌクレオシド、 $4'$ - チオ - $2'$ - 修飾ヌクレオシド、および二環式糖修飾ヌクレオシドから選択される。前記交互モチーフは、異なる糖鎖を保持するヌクレオシドの改変を含むが、核酸塩基およびインターヌクレオシド結合とは個別にいる。前記インターヌクレオシド結合はそれぞれまたは選択された位置で変えることができる、または前記オリゴマー化合物全体において均一または交互であり得る。

【0069】

本発明の交互オリゴマー化合物は、センス鎖およびアンチセンス鎖として機能するように設計され得る。交互 $2 - OCH_3 / 2' - F$ 修飾オリゴマー化合物はアンチセンス鎖として使用され、多様なセンス鎖の優れた活性を示した。交互モチーフを有する1つのアンチセンスオリゴマー化合物は $19mer$ であり、ここにおいてA'は $2' - OCH_3$ 修飾ヌクレオシドであり、B'は $2' - F$ 修飾ヌクレオシド（nnは0でありnは9である）。結果生じた交互オリゴマー化合物はレジスタ（register）を有することがあり

10

20

30

40

50

、ここにおいて3'および5'末端は両方とも2'-OCH₃修飾ヌクレオシドである。

【0070】

交互オリゴマー化合物は、センス鎖としても機能するように設計された。化学的性質またはレジスターは通常、アンチセンス鎖を指定しているオリゴマー化合物とは異なっている。交互2'-F/2'-OCH₃修飾19merが以前のパラグラフにあるアンチセンスと対を形成した場合、好ましい配向性はオフセットレジスターとなるように決定され、ここにおいて前記センス鎖の3'および5'末端は2'-F修飾ヌクレオシドである。対応したレジスターにおいて、糖修飾はハイブリダイズされたヌクレオシド間で適合するので、19merの全ての末端は同じ糖修飾を保持している。センス鎖においてテストされ実験した別の交互モチーフは、2'-MOE修飾ヌクレオシドと交互の-D-リボヌクレオシド側である。

10

【0071】

本発明で用いられたように、「完全に修飾されたモチーフ」という用語は、糖修飾ヌクレオシドの近接した配列を含むことを意味しており、ここにおいて本質的に各ヌクレオシドは同じ糖修飾を保持するように修飾されている。本発明の組成物は、センス鎖、または前記完全に修飾された鎖として好ましいセンス鎖を有するアンチセンス鎖として、完全に修飾された鎖を有することができる。本発明の完全に修飾された鎖に対して適切な糖修飾ヌクレオシドは、2'-F、4'-チオ、および2'-OCH₃を含み、2'-OCH₃が特に適している。1観点において、前記3'および5'末端ヌクレオシドは未修飾である。

20

【0072】

本発明において用いられたように、「ヘミマーモチーフ」という用語は、均一な糖部位（同一の糖、修飾されたまたは修飾されていない）を保持するヌクレオシドの配列を含むことを意味しており、ここにおいて5'末端および3'末端の1つはヘミマー修飾オリゴマー化合物における他のヌクレオシドとは異なる糖修飾ヌクレオシドである2~12ヌクレオシドの配列を保持している。典型的なヘミマーの例としては、その末端の1つに糖修飾ヌクレオシドの配列を有する-D-リボヌクレオシドを有するオリゴマー化合物がある。1つのヘミマーモチーフは、その末端の1つに位置付けられた2~12糖修飾ヌクレオシドを有する-D-リボヌクレオシドの配列を含む。別のヘミマーモチーフは、その末端の1つに位置付けられた2~6糖修飾ヌクレオシド（好ましくは2~4である）を有する-D-リボヌクレオシドの配列を含む。

30

【0073】

本発明で用いられたように、「ブロックマーモチーフ」という用語は、均一に修飾された糖修飾ヌクレオシドのブロックによって内部で中断される均一な糖（同意通な糖、修飾されたまたは修飾されていない）を保持するヌクレオシドの配列を含むことを意味しており、ここにおいて前記修飾は他のヌクレオシドとは異なっている。より一般的には、ブロックマーモチーフを保持するオリゴマー化合物は、2~6、または2~4糖修飾ヌクレオシドの1つの内部ブロックを有する-D-リボヌクレオシドの配列を有する。前記内部ブロック領域は、ヘミマーとなる末端の1位置でない限り、前記オリゴマー化合物内のあらゆる位置で存在し得る。この塩基配列およびインターヌクレオシド結合は、ブロックマーモチーフ内のあらゆる位置で変更され得る。

40

【0074】

本発明で用いられたように、「位置的に修飾されたモチーフ」という用語は、-D-リボヌクレオシドの配列を含むことを意味しており、ここにおいて前記配列は1~約4糖修飾ヌクレオシドから成る2またはそれ以上の領域によって中断されるものである。前記位置的に修飾されたモチーフは糖修飾ヌクレオシドの内部領域を含み、1または両方の末端も含むことができる。糖修飾ヌクレオシドの領域内における各特定の糖修飾は、望ましい均一な修飾を保って可変的である。前記糖修飾領域は同じ糖修飾を保持することができる、または1つの領域がもう一方の領域とは異なる糖修飾を保持するように変化させることができる。位置的に修飾された鎖は少なくとも2つの糖修飾領域、および3'および5'

50

' - 末端が糖修飾領域を保持する場合は少なくとも3つの糖修飾領域を有する。あらゆる位置的モチーフによって定義された領域置換のパターンはこれらの他のモチーフによって定義されていないので、位置的に修飾されたオリゴマー化合物はギャプトモチーフ、ヘミマーモチーフ、ブロックマーモチーフ、および交互モチーフとは区別される。位置的に修飾されたモチーフは核酸塩基配列、またはインターヌクレオシド結合の位置またはタイプによって決定されない。位置的に修飾されたオリゴマー化合物という用語は、多くの異なる特定置換パターンを含む。多数のこれら置換パターンは調合され、組成物においてテストされた。

【0075】

本発明の組成物のアンチセンスまたはセンス鎖は、位置的に修飾され得る。1実施形態において、前記位置的に修飾された鎖はアンチセンス鎖として設計される。実施例に説明された位置的に修飾されたオリゴマー化合物に対応した異なる置換パターンのリストは、以下に示している。このリストは教訓的なものであり、限定するものではない。

10

【0076】

【表 1】

ISIS 番号:長さ	置換パターン 5'-3'	修飾位置	
	下線は置換された	5' 末端から	
345838 19mer	5- <u>1</u> -5-1-2- <u>1</u> -2- <u>2</u>	6, 12, 15 及び 18-19	
352506 19mer	5- <u>2</u> -2- <u>2</u> -5- <u>3</u>	7-8, 10-11, 17-19	
352505 19mer	4- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>3</u>	5, 8, 11, 14, 17-19	
xxxxxx 19mer	4- <u>1</u> -6- <u>1</u> -4- <u>3</u>	5, 12, 17-19	
xxxxxx 19mer	4- <u>2</u> -4- <u>2</u> -5- <u>2</u>	5-6, 11-12, 18-19	10
345839 19mer	4- <u>2</u> -2- <u>2</u> -6- <u>3</u>	5-6, 9-10, 17-19	
xxxxxx 19mer	3- <u>1</u> -4- <u>1</u> -4- <u>1</u> -3- <u>1</u> -1	4, 9, 14, 18	
353539 19mer	<u>3</u> -5- <u>1</u> -2- <u>1</u> -4- <u>3</u> *	1-3, 9, 12	
355715 19mer	3- <u>1</u> -4- <u>1</u> -8- <u>1</u> -1	4, 9, 18	
xxxxxx 19mer	3- <u>1</u> -5- <u>1</u> -7- <u>1</u> -1	4, 10, 18	
384760 19mer	<u>2</u> -7- <u>2</u> -5- <u>3</u> *	1-2, 10-11 及び 17-19	
371315 19mer	<u>3</u> -6- <u>2</u> -5- <u>3</u>	1-3, 10-11, 17-19	20
353538 19mer	2- <u>1</u> -5- <u>1</u> -2- <u>1</u> -4- <u>3</u>	3, 9, 12, 17-19	
xxxxxx 19mer	2- <u>1</u> -4- <u>1</u> -4- <u>1</u> -4- <u>1</u> -1	3, 8, 13, 18	
336674 20mer	15- <u>1</u> -1- <u>3</u>	16, 18-20	
355712 20mer	4- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>3</u> *	5, 8, 11, 14	
347348 20mer	<u>3</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>3</u>	1-3, 6, 9, 12, 15, 18-20	
348467 20mer	<u>3</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -2- <u>1</u> -5	1-3, 6, 9, 12, 15	
357278 20mer	3- <u>1</u> -4- <u>1</u> -4- <u>1</u> -3- <u>1</u> -1	4, 9, 14, 18	
xxxxxx 20mer	<u>3</u> -1- <u>1</u> -10- <u>1</u> -1- <u>3</u>	1-3, 5, 16, 18-20	30
xxxxxx 20mer	3- <u>1</u> -6- <u>1</u> -7- <u>1</u> -1	4, 11, 19	
357276 20mer	3- <u>1</u> -3- <u>1</u> -7- <u>1</u> -4	4, 8, 16	
xxxxxx 20mer	3- <u>1</u> -5- <u>2</u> -5- <u>1</u> -3	4, 11, 17	
357275 20mer	3- <u>1</u> -5- <u>1</u> -8- <u>1</u> -1	4, 10, 19	
373424 20mer	<u>3</u> -6- <u>2</u> -5- <u>3</u>	1-3, 11-12, 18-20	
357277 20mer	2- <u>1</u> -5- <u>1</u> -5- <u>1</u> -4- <u>2</u>	3, 9, 15, 20-21	
345712 20mer	2- <u>2</u> -5- <u>2</u> -5- <u>2</u> -2	3-4, 10-11, 17-18	

* は1タイプ以上の糖修飾ヌクレオシドが糖修飾領域において使用されたことを意味している。

40

【0077】

本発明で用いられたように「糖修飾ヌクレオシド」という用語は、本分野で知られた糖修飾の全ての様式を含むことを意図している。糖修飾ヌクレオシドは、あらゆる複素環塩基部位およびインターヌクレオシド結合を保持することができ、さらに前記糖修飾とは独立したグループを含む。糖修飾ヌクレオシドのグループは、2'-修飾ヌクレオシド、4'-チオ修飾ヌクレオシド、4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド、および二環式糖修飾ヌクレオシドを含む。

【0078】

50

本発明で用いられたように「2'-修飾ヌクレオシド」という用語は、HおよびOH以外の2'-置換基を保持するヌクレオシドの全ての様式を含むことを意図している。本発明の2'-修飾ヌクレオシドに対して適切な2'-置換基は、これに限定されるものではないが、ハロ、アリル、アミノ、アジド、アミノ、SH、CN、OCN、CF₃、OCF₃、O⁻、S⁻またはN(R_m)-アルキル；O⁻、S⁻またはN(R_m)-アルケニル；O⁻、S⁻またはN(R_m)-アルキニル；O-アルキレニル(alkylenyl)-O-アルキル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、O-アラルキル、O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)を含み、ここにおいてR_mおよびR_nは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキルである。これら2'-置換基はさらに、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(NO₂)、チオール、チオアルコキシ(S-アルキル)、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル、およびアルキニルから選択された置換基で置換され、ここにおいて各R_mは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキルである。

10

【0079】

2'-置換基のリストは、F、-NH₂、N₃、OCF₃、O-CH₃、O(CH₂)₃NH₂、CH₂-CH=CH₂、-O-CH₂-CH=CH₂、OCH₂CH₂OCH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、-O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、およびN-置換アセトアミド(O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n))を含み、ここにおいて各R_mおよびR_nは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキルである。2'-置換基の別のリストは、F、OCF₃、O-CH₃、OCH₂CH₂OCH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、-O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂、およびN-置換アセトアミド(O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n))を含み、ここにおいて各R_mおよびR_nは個別に、H、アミノ保護基、または置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキルである。

20

【0080】

本発明は多数の異なる立体配置を調合し得る塩基性フラノース環システムの立体化学の操作にも適している。1'位への複素環塩基の結合は、-アノマー(下)または-アノマー(上)を生じさせることができる。前記-アノマーは未変性DNAおよびRNAに見出されるアノマーであるが、両形態はオリゴマー化合物を調合するために使用され得る。更なる操作は、フラノースの未変性型を鏡像異性型で置換する、例えば未変性D-フラノースをその鏡像異性体であるL-フラノースに置き換えることを介して達成され得る。フラノース環システムを操作する別の方法は、例えばリボフラノース(下)またはアラビノフラノース(上)を生じさせるような2'位での置換、またはキシロフラノースを生じさせるような3'位での置換、キシロフラノースを同時に生じさせるような2'および3'位の変化などによって、立体異性体を調合するものである。同じ置換基の立体異性体の使用は、例えばリボ立体配置内の3'-エンド、およびアラビノ立体配置における2'-エンドである2'-Fなどの完全に異なる立体配座幾何学を生じさせることができる。オリゴマー化合物における異なるアノマーおよび立体異性体糖の使用は、本分野では既知であり、本発明に適している。

30

40

【0081】

「4'-チオ修飾ヌクレオシド」という用語は、4'-Sで置換された4'-Oを保持する-D-リボヌクレオシドを含むことを意図している。「4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシド」という用語は、2'-置換基で置換された2'-OHを保持する4'-チオ修飾ヌクレオシドを含むことを意図している。4'-チオ修飾ヌクレオシドの調合は、例えば1997年6月17日に出願された米国特許番号第5,639,837号明細書、および2005年3月31日に公開された国際公開公報番号第WO2005/027962号などの公報に開示されている。4'-チオ-2'-修飾ヌクレオシドの調合およびそれ

50

らのオリゴヌクレオチドへの取り込みは、2005年3月31日に公開された国際公開公報番号第WO2005/027962号に開示されている。4'-チオ-2'-修飾ヌクレオチドは、好ましい基として以前に言及した2'-OCH₃、2'-O-(CH₂)₂-OCH₃、および2'-Fと同じ2'-置換基で調合され得る。

【0082】

「二環式糖修飾ヌクレオチド」という用語は、リボース環の2原子を架橋することによって形成された第二の環を保持するヌクレオチドを含むことを意図している。そのような二環式糖修飾ヌクレオチドは、第二の環を形成する多数の異なる架橋基を取り込むことができ、フラノース環上の異なる環炭素原子から形成され得る。前記架橋が4'および2'-炭素と結合し、構造式4'-(CH₂)_n-O-2'（ここにおいてnは1または2）を保持する二環式糖修飾ヌクレオチドが適している。二環式糖修飾ヌクレオチドの合成は、米国特許番号第6,268,490号明細書、第6,794,499号明細書、および公開された米国出願番号第20020147332号明細書に開示されている。

10

【0083】

前記架橋がアデニン、シトシン、グアニン、5-メチル-シトシン、チミンおよびウラシルから選択された核酸塩基を保持する4'-CH₂-O-2'である二環式糖修飾ヌクレオチドの合成および調合は、それらのオリゴマー化および核酸認識特性とともに記載された(Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607~3630、および国際公開公報番号第WO98/39352号および第WO99/14226号)。この二環式糖修飾ヌクレオチドのL異性体も調合された(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365~6372)。4'-CH₂-S-2'類似体(Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219~2222)および2'-アミノ-LNA(Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035~10039)も調合された。

20

本発明のオリゴマー化合物は、1若しくはそれ以上の末端リン酸部位も含むことができる。末端リン酸部位は、あらゆる末端ヌクレオチドに位置付けられ得るが、5'-末端ヌクレオチドが適しており、アンチセンス鎖の5'-末端ヌクレオチドも適している。1観点において、前記末端リン酸は、構造式-O-P(=O)(OH)OHを持ち非修飾である。別の観点において、前記末端リン酸は、OおよびOH基の1若しくはそれ以上がH、O、S、N(R)、またはアルキルで置換されるように修飾されており、ここにおいてRはH、アミノ保護基、または非置換または置換アルキルである。

30

【0084】

ここで用いられたように「アルキル」という用語は、24炭素原子以下を含んでいる飽和直鎖状または分枝炭化水素ラジカルを意味している。アルキル基の例としては、これに限定するものではないが、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、n-ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、およびそれと同等のものを含む。アルキル基は一般的に1~約24炭素原子、より一般的には1~約12炭素原子を含み、好ましくは1~約6炭素原子である。ここで用いられたようなアルキル基は任意で1若しくはそれ以上の異なる置換基を含む。

40

【0085】

ここで用いられたように「アルケニル」という用語は、24炭素原子以下を含み、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を保持している直鎖状または分枝炭化水素鎖ラジカルを意味している。アルケニル基の例としては、これに限定されるものではないが、エテニル(ethenyl)、プロベニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イル、1,3-ブタジエンなどのジエン、およびそれらと同等のものを含む。アルケニル基は一般的に2~約24炭素原子、より一般的には2~約12炭素原子を含み、好ましくは2~約6炭素原子である。ここで用いられたようなアルケニル基は任意で1若しくはそれ以上の異なる置換基を含む。

【0086】

50

ここで用いられたように「アルキニル」という用語は、24炭素原子以下を含み、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を保持している直鎖状または分枝炭化水素ラジカルを意味している。アルキニル基の例としては、これに限定されるものではないが、エチニル、1-プロピニル、1-ブチニル、およびそれらと同等のものを含む。アルキニル基は一般的に2~約24炭素原子、より一般的には2~約12炭素原子を含み、好ましくは2~約6炭素原子である。ここで用いられたようなアルキニル基は任意で1若しくはそれ以上の更なる置換基を含む。

【0087】

ここで用いられたように「脂肪族」という用語は、24炭素原子以下を含んでいる直鎖状または分枝炭化水素ラジカルを意味しており、ここにおいてあらゆる2つの炭素原子間の飽和は単結合、二重結合、または三重結合である。脂肪族基は、1~約24炭素、より一般的には1~約12炭素原子を含み、望ましくは1~約6炭素原子である。脂肪族基の直鎖状または分枝鎖は、窒素、硫黄、およびリンを含む1若しくはそれ以上のヘテロ原子で中断される。ヘテロ原子によって中断されるそのような脂肪族基は、これに限定されるものではないが、例えばポリアルキレングリコールなどのポリアルコキシ、ポリアミン、およびポリイミンを含む。ここで用いられたような脂肪族基は選択的に更なる置換基を含む。

10

【0088】

ここで用いられたように「アルコキシ」という用語は、アルキル基および酸素原子間に形成されたラジカルを意味しており、前記酸素原子はアルコキシ基を親分子に結合するために使用される。アルコキシ基の例としては、これに限定されるものではないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペントキシ、ネオペントキシ、*n*-ヘキソキシ、およびそれらと同等のものを含む。ここで用いられたようなアルコキシ基は選択的に更なる置換基を含む。

20

【0089】

ここで用いられたように「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、フッ素、塩素、臭素、およびイオジンから選択された原子である。

【0090】

ここで用いられたように「アリール」および「芳香族」という用語は、1若しくはそれ以上の芳香族環を保持しているモノ-または多環式炭素環システムラジカルを意味している。アリール基の例としては、これに限定されるものではないが、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、イデニル、およびそれらと同等のものを含む。ここで用いられたようなアリール基は選択的に更なる置換基を含む。

30

【0091】

ここで用いられたように「複素環」という用語は、少なくとも1つのヘテロ原子を含み、不飽和、部分的に飽和、または完全に飽和されている、ラジカルモノ-、または多環式環システムを意味しており、従ってヘテロアリールを含むものである。複素環は融合環システムも含み、前記融合環の1若しくはそれ以上はヘテロ原子を含まない。複素環基は一般的に硫黄、窒素、または酸素から選択された少なくとも1つの原子を含む。複素環基の例としては、[1,3]ジオキサラン、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、モルフォリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジノニル、テトラヒドロフリル、およびそれらと同等のものを含む。ここで用いられたような複素環基は選択的に更なる置換基を含む。

40

【0092】

ここで用いられたような「置換基 (substituent および substituent group)」という用語は、他の基または親化合物に付加され、望ましい特性を増強するまたは望ましい効果を与える基を含むことを意味している。置換基は保護されるまたは保護されず、親化合物における1つの利用可能な部位へまたは多くの利用可能な部位へ付加され得る。置換基はさらに他の置換基でも置換され、親化合物に対して直接に

50

またはアルキルまたはヒドロカルボニル基などの結合基を介して付加される。そのような置換基は、これに限定されるものではないが、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル(- C (O) R_a)、カルボキシル(- C (O) O - R_a)、脂肪族、脂環、アルコキシ、置換オキソ(- O - R_a)、アリール、アラルキル、複素環、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ、(- N R_b R_c)、イミノ(= N R_b)、アミド(- C (O) N R_b R_c または - N (R_b) C (O) R_a)、アジド(- N₃)、ニトロ(- N O₂)、シアノ(- C N)、カルバミド(O C (O) N R_b R_c または - N (R_b) C (O) O R_a)、ウレイド(- N (R_b) C (O) - N R_b R_c)、チオウレイド(- N (R_b) C - (S) N R_b R_c)、グアニジニル(- N (R_b) C (= N R_b) N R_b R_c)、アミジニル(- C (= N R_b) N R_b R_c または - N (R_b) C (N R_b) R_a)、チオール(- S R_b)、スルフィニル(- S (O) R_b)、スルホニル(- S (O)₂ R_b)、スルホンアミジル(- S (O)₂ N R_b R_c または - N (R_b) S - (O)₂ R_b)を含む。ここにおいて各 R_a、R_b、および R_c は、これに限定されるものではないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環、複素環、およびヘテロアリールアルキルなどとすることができる、更なる置換基である。

10

【0093】

ここで用いられたように「保護基」という用語は、合成手順の間望ましくない反応に対抗して、これに限定されるものではないがヒドロキシル、アミノおよびチオール基を含む反応基を保護すると本分野では知られている不安定化学部位を意味している。保護基は、他の反応部位での反応の間部位を保護するために一般的に選択的および/または直交性で使用され、続いて無保護基をそのまま残すために、または更なる反応に利用するために除去され得る。本分野では既知の保護基は、Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999) に一般的に記載されている。

20

【0094】

ヒドロキシル保護基の例としては、これに限定されるものではないが、ベンジルオキシカルボニル、4-ニトロベンジルオキシカルボニル、4-プロモベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、メトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル(BOC)、イソプロポキシカルボニル、ジフェニルメトキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル、2-フルフリルオキシカルボニル、アリルオキシカルボニル(Alloc)、アセチル(Ac)、ホルミル、クロロアセチル、トリフルオロアセチル、メトキシアセチル、フェノキシアセチル、ベンゾイル(Bz)、メチル、t-ブチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-トリメチルシリルエチル、1,1-ジメチル-2-プロペニル、3-メチル-3-ブテニル、アリル、ベンジル(Bn)、パラ-メトキシベンジルジフェニルメチル、トリフェニルメチル(トリチル)、4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル(DMT)、置換或いは非置換型9-(9-フェニル)キサントニル(ピキシル)、テトラヒドロフリル、メトキシメチル、メチルチオメチル、ベンジルオキシメチル、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、メタンスルフォニル、パラ-トルエンスルフォニル、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、およびそれらと同等のものを含む。本発明に適したヒドロキシル保護基は、DMT、および置換或いは非置換ピキシルである。

30

40

【0095】

アミノ保護基の例としては、これに限定されるものではないが、t-ブトキシカルボニル(BOC)、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)、ベンジルオキシカルボニル、およびそれらと同等のものを含む。チオール保護基の例としては、これに限定されるものではないが、トリフェニルメチル(Trt)、ベンジル(Bn)、およびそれらと同等のものを含む。

50

【0096】

合成オリゴマー化合物は反応混合物から分離され、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、沈降または再結晶などの方法によってさらに精製され得る。ここに記載された構造式の前記化合物を合成する更なる方法は、本分野の当業者にとっては明らかであるだろう。さらに、様々な合成工程は望ましい化合物を生じる交互の配列においてまたは順序で実行される。ここに記載された本分野では既知である、前記化合物を合成するのに有用な合成化学変換(トランスフォーメーション)および保護基方法論(保護および脱保護)は、例えば、R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); および L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995)、およびそれらの続版に記載されたようなものを含む。

10

【0097】

ここに記載された前記化合物は1若しくはそれ以上の不斉中心を含み、従って絶対立体化学の観点でアミノ酸に対する(R)-または(S)-として、または(D)-または(L)-として定義された、鏡像異性体、ジアステレオマーおよび他の立体異性型を生じる。本発明は、全てのそのような異性体、さらにはそれらのラセミ体および光学純粋型を含むことを意味している。光学異性体は、上述の手順によって、またはラセミ体混合物を分解することによってそれらそれぞれの光学活性前駆体から調合される。分解は分解因子の存在下で、クロマトグラフィーによってまたは結晶化を繰り返すことによって、または本分野の当業者には既知であるこれらの技術のいくつかを組み合わせることによって実行され得る。分解に関する更なる詳細は Jacques, et al., *Enantiomers, Racemates, and Resolutions* (John Wiley & Sons, 1981)に見出すことができる。ここに記載された前記化合物がオレフィン二重結合、他の不飽和、または幾何学不斉の他の中心を含む場合、特に指定しない限り、前記化合物はEおよびZ幾何学異性体の両方、またはシス-およびトランス-異性体の両方を含むことを意図している。同様に、全ての互変異性型も含まれることを意図している。ここに見られるあらゆる炭素-炭素二重結合の立体配置は、便宜上でのみ選択されており、本文でそう述べない限り特定の立体配置を指定する意図はないので、ここに任意でトランスとして表現された炭素-炭素二重結合または炭素-ヘテロ原子二重結合は、シス、トランス、またはあらゆる割合でのそれら2つの混合物である。

20

30

【0098】

ここで用いられたように「ヌクレオシド」という用語は、塩基-糖組み合わせを意味している。ヌクレオシドの塩基部分は通常、複素環塩基部位である。そのような複素環塩基の2つの最も多く見られる種類は、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、さらに前記ヌクレオシドの糖部位に共有結合したリン酸基を含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むそれらヌクレオシドに対して、前記リン酸基は前記糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部位に結合され得る。ヌクレオシドという用語は、修飾および非修飾ヌクレオシドの両方を含むことを意味している。オリゴヌクレオチド構造内で、前記リン酸基は前記オリゴマー化合物のバックボーンを形成するものとして共通して言及される。オリゴヌクレオチドを形成する場合、前記リン酸基は隣接するヌクレオシドと別のものとを共有結合し、直線ポリマー化合物を形成する。RNAおよびDNAの正常なインターヌクレオシド結合は3'から5'のリン酸ジエステル結合である。

40

【0099】

本発明の文脈において、「オリゴヌクレオシド」という用語は、リン原子を保持してい

50

ないインターヌクレオシド結合によって結合されているヌクレオシドの配列を意味している。このタイプのインターヌクレオシド結合はさらに、以下の「修飾インターヌクレオシド結合」の項に記載されている。

【0100】

ここで用いられたように「オリゴヌクレオチド」という用語は、天然由来の核酸塩基、糖、およびリン酸ジエステルインターヌクレオシド結合から成るリボ核酸 (RNA) またはデオキシリボ核酸 (DNA) のオリゴマーまたはポリマーを意味している。

【0101】

ここで用いられたように「オリゴマー」および「オリゴマー化合物」という用語は、特定配列においてインターヌクレオシド結合基と共に結合されている、複数の天然由来および/または非天然由来ヌクレオシドを意味している。少なくともいくつかのオリゴマー化合物は、標的核酸の領域とハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド擬態、オリゴヌクレオシド、およびそれらのキメラ組み合わせは「オリゴマー」および「オリゴマー化合物」という用語に含まれる。そのような用語「オリゴマー化合物」は「オリゴヌクレオチド」という用語より意味が広いので、これに限定されるものではないが当業者にとって既知であるものを含む修飾の全ての様式を保持する全てのオリゴマーを含む。オリゴマー化合物は一般的に、機能的に互換性があっても、天然由来または合成野生型オリゴヌクレオチドから構造的に区別される。従って、オリゴマー化合物は、望ましいRNAまたはDNA鎖の前記構造および/または機能は機能を模倣する(例えば標的にハイブリダイズすることによって)のに有効な機能を保持する全てのそのような構造を含む。そのような非天然由来オリゴヌクレオチドは、例えば増強された細胞取り込み、核酸標的に対する増強された親和性、およびヌクレアーゼ存在下での増加した安定性などの増強された特性を有するため、しばしば天然由来型よりも望ましい。

【0102】

オリゴマー化合物は、例えば二本鎖ハイブリダイズコンストラクト、または完全なまたは部分的な二本鎖化合物のハイブリダイゼーションおよび形成を可能にするのに十分な自己相補性を有する一本鎖を形成する2つのオリゴマー化合物などの、二本鎖コンストラクトを有する組成物を含むことができる。本発明の1実施形態において、二本鎖オリゴマー化合物は、低分子干渉RNA (siRNA) を含む。ここで用いられたように「siRNA」という用語は、第一鎖と第二鎖を有し、前記第一鎖と第二鎖との間に中心相補性部分を持ち、前記第一鎖と前記第二鎖との間にまたは標的核酸と選択的に相補性を有する末端部分を保持する、二本鎖コンストラクトとして定義されている。この複合体における各鎖は、約12~約24ヌクレオシドの長さであり、さらにこれら定義された長さの1つを保持する中心相補性部分を有する。各鎖はさらに、長さで1~約6核酸塩基を保持する末端非ハイブリダイズ部分を有する。siRNAは平滑末端として言及される末端部分(オーバーハング)も保持しない。siRNAの2つの鎖は、遊離3'または5'末端を残して内部的に結合され得る、または連続ヘアピン構造またはループを形成するように結合され得る。このヘアピン構造は、一本鎖特徴の伸長を生じさせる5'または3'末端上にオーバーハングを含む。

【0103】

本発明の1実施形態において、二本鎖コンストラクトを有する組成物は、基準siRNAである。ここで用いられたように「基準siRNA」という用語は、第一鎖および第二鎖を保持する二本鎖オリゴマー化合物として定義され、ここにおいて各鎖は19核酸塩基以上相補的である鎖を保持する長さが21の核酸塩基であり、各鎖の各3'末端にデオキシチミジンダイマー (dTdT) を保持しており、そこにおいて前記二本鎖化合物は3'オーバーハングとして作用するものである。別の観点において、オーバーハングを保持する二本鎖コンストラクトを有する組成物は、様々な長さのオーバーハングを有して様々な長さであり、1つの鎖のみがオーバーハングを保持する組成物を含む。

【0104】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、二本鎖コンストラクトを有する組成物は平滑末端 *siRNA* である。ここで用いられたように「平滑末端 *siRNA*」という用語は、終端オーバーハングを保持しない *siRNA* として定義されている。すなわち、二本鎖コンストラクトの少なくとも1つの末端は平滑である。1若しくはそれ以上のオーバーハングを保持する、または平滑である *siRNA* は、*dsRNAse* 酵素を誘発し、*RNAi* アンチセンスメカニズムの補充または活性化の引き金を引くように働く。更なる実施形態において、*RNAi* アンチセンスメカニズムを介して働く一本鎖 *RNAi* (*ssRNA*) 化合物が考えられる。

【0105】

二本鎖化合物に対して更なる修飾をすることができ、これには末端の1若しくはそれ以上、選択された核酸塩基部位、糖部位、またはインターヌクレオシド結合の1つに結合された共役基を含むことができる。または、前記2つの鎖は非核酸部位またはリンカー基を介して結合され得る。1つの鎖のみから形成された場合、*dsRNA* は二本鎖を形成するように自身を折り畳む自己相補的ヘアピンタイプ分子の形態をとることができる。従って、*dsRNA* は完全なまたは部分的な二本鎖になり得る。2つの鎖、または二本鎖を形成するために自身を折り畳んだ自己相補的ヘアピンタイプ分子の形態をとった一本鎖から形成された場合、その2つの鎖（または一本鎖の二本鎖形成領域）はワトソン-クリック様式の塩基対である相補的 *RNA* 鎖である。

【0106】

本発明に従ったオリゴマー化合物は、約8～約80核酸塩基（すなわち、約8～約80結合ヌクレオシド/単量体サブユニット、または80以下の結合ヌクレオシド/単量体サブユニット）を有する。本発明は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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79または80核酸塩基、またはそれらのあらゆる範囲内の長さのオリゴマー化合物を具体化することを本分野の当業者は、理解するであろう。

【0107】

1実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は長さが10～15核酸塩基、または50核酸塩基以下である。これは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または50核酸塩基、またはそれらのあらゆる範囲内の長さのオリゴマー化合物を具体化することを本分野の当業者は理解するであろう。

【0108】

別の実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は長さが12～30核酸塩基、または30核酸塩基以下である。これは12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基、またはそれらのあらゆる範囲内の長さのオリゴマー化合物を具体化することを本分野の当業者は理解するであろう。

【0109】

別の実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は長さが17～23核酸塩基、または23核酸塩基以下である。これは17、18、19、20、21、22、または23核酸塩基、またはそれらのあらゆる範囲内の長さのオリゴマー化合物を具体化することを本分野の当業者は理解するであろう。

【0110】

別の実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は長さが19～21核酸塩基、または21核酸塩基以下である。これは19、20、または21核酸塩基、またはそれらのあ

10

20

30

40

50

らゆる範囲内の長さのオリゴマー化合物を具体化することを本分野の当業者は理解するであろう。

【0111】

ここで用いられたように「複素環塩基部位」という用語は、本発明のヌクレオシドを形成するために使用された核酸塩基および修飾または置換核酸塩基を意味している。「複素環塩基部位」という用語は、未変性プリン塩基であるアデニン(A)およびグアニン(G)、およびピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)などの非修飾核酸塩基を含む。この用語は、これに限定されるものではないが、ここで定義されたような、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノピリジンおよび2-ピリドン、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチレン(hydroxymethylene)シトシン、2-アミノおよび2-フルオロアデニン、2-プロピルおよびアデニンおよびグアニンのほかのアルキル誘導体、2-チオシトシン、ウラシル、チミン、3-デアザ(deaza)グアニンおよびアデニン、4-チオウラシル、5-ウラシル(シュードウラシル)、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシルおよびシトシン、およびピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、5-ハロ(特に5-ブromo)、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシルおよびシトシン、6-メチル、およびアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、7-メチルアデニンおよびグアニン、7-デアザアデニンおよびグアニン、8-ハロ、8-アミノ、8-アザ、8-チオ、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、普遍的塩基、疎水性塩基、無差別塩基、サイズが拡大された塩基、およびフッ素化塩基などの合成および天然核酸塩基を含む修飾または置換核酸塩基の全ての様式を含むことも意図する。更なる修飾核酸塩基は、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)およびフェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)などの三環式ピリミジンを含む。

【0112】

更なる核酸塩基(および核酸塩基を有するヌクレオシド)は、米国特許番号第3,687,808号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858~859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されているもの、Limbach et al., Nucleic Acids Research, 1994, 22(12), 2183~2196に開示されているもの、およびSanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289~302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993に開示されているものを含む。

【0113】

特定のこれら核酸塩基は、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加するために特に有用である。これらは、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、および2-アミノプロピル-アデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含むN-2、N-6およびO-6置換プリンを含む。5-メチルシトシン置換基は0.6~1.2で核酸二本鎖安定性を増加し(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276~278)、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)糖修飾と組み合わせた時に特に有用であることが示された。

【0114】

上述の修飾核酸塩基および他の修飾核酸塩基に関する特定の調合を教示した代表的な米

10

20

30

40

50

国特許は、これに限定されるものではないが、上述した米国特許番号第3,687,808号明細書、さらに第4,845,205号明細書；第5,130,302号明細書；第5,134,066号明細書；第5,175,273号明細書；第5,367,066号明細書；第5,432,272号明細書；第5,457,187号明細書；第5,459,255号明細書；第5,484,908号明細書；第5,502,177号明細書；第5,525,711号明細書；第5,552,540号明細書；第5,587,469号明細書；第5,594,121号明細書；第5,596,091号明細書；第5,614,617号明細書；第5,645,985号明細書；第5,830,653号明細書；第5,763,588号明細書；第6,005,096号明細書；第5,681,941号明細書および第5,750,692号明細書を含む。

10

【0115】

ここで用いられたように「普遍的塩基」という用語は、あらゆる塩基で置換される部位を意味している。この普遍的塩基はハイブリダイゼーションに寄与する必要はないが、ハイブリダイゼーションから著しく減らすべきではなく、一般的に二本鎖の第二の配列における対応する部分で天然由来の塩基（すなわちA、C、G、TまたはU）と対を形成できる第一の配列におけるモノマーを意味しており、この二本鎖において以下の1若しくはそれ以上が当てはまる：（1）基本的にこの2つの間には対（ハイブリダイゼーション）はない；または（2）それらの間の対形成は、天然由来の塩基の1若しくはそれ以上とハイブリダイズしている普遍的塩基と判別不能であり、その二本鎖の著しい不安定化はない。例示的な普遍的塩基は、これに限定されるものではないが、イノシン、5-ニトロインドール、および4-ニトロベンズイミダゾールを含む。普遍的塩基の更なる実施例および記述は、the applications of universal DNA base analogs. (Loakes, Nucleic Acids Research, 2001, 29, 12, 2437~2447)の調査と要約を参照のこと。

20

【0116】

ここで用いられたように「無差別(promiscuous)塩基」という用語は、二本鎖の第二の配列における対応する部分で天然由来の塩基（すなわちA、C、G、TまたはU）と対を形成できる第一の配列におけるモノマーを意味し、この二本鎖において前記無差別塩基は天然由来の塩基（すなわちA、C、G、T、U）の1つ以上と判別不能に対形成できる。無差別塩基の限定されない例は、以下に示したように、6H, 8H-3, 4-ジヒドロピリミド[4,5-c][1,2]オキサジン-7-オンおよびN⁶-メトキシ-2,6-ジアミノプリンである。更なる情報は、Polymerase recognition of synthetic oligodeoxyribonucleotides incorporating degenerate pyrimidine and purine bases. (Hill, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1998, 95, 4258~4263)を参照のこと。

30

【0117】

G-クランプの例としては、置換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）および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）を含む。

40

【0118】

第二のオリゴヌクレオチドにおいてグアノシンと3つの水素結合を作る代表的なシトシン類似体は、1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン(Kurchavov et al., Nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, 1837~1846)、1,3-ジアザフェノチアジン-2-オン(Lin et al., J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3873~3874)、および6,7,8,9-テトラフルオロ-1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン(Wang et al., Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385~8388

50

)を含む。オリゴヌクレオチドへ取り込まれた時、これら塩基修飾は相補的グアニンとハイブリダイズされ(後者はアデニンともハイブリダイズされる)、伸長したスタッキング相互作用によってヘリックス熱安定性が増強される(米国特許番号第10/013,295号を参照)。

【0119】

本発明のオリゴマー化合物は、議論された2'-修飾糖などの1若しくはそれ以上の置換等部位を含む。糖置換基のより総合的だが限定されないリストは、OH; F; O-、S-、またはN-アルキル; O-、S-、またはN-アルケニル; O-、S-、またはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルを含み、ここにおいてアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換或いは非置換C₁~C₁₀アルキル、C₂~C₁₀アルケニルおよびアルキニルである。特定の置換基は、O((CH₂)_nO_m)CH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON((CH₂)_nCH₃)₂であり、ここにおいてnおよびmは1~約10である。いくつかのオリゴヌクレオチドは、C₁~C₁₀低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、またはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、挿入基、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善する基、および同様な特性を有する他の置換基から選択された糖置換基を有する。

【0120】

1つの修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られている)(Martinet al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486~504)、すなわちアルコキシアルコキシ基を含む。1つの修飾は、以下の実施例に記載されているような2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわちO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基(2'-DMAOEとしても知られている)、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとしても知られている)、すなわち2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂を含む。

【0121】

他の糖置換基は、メトキシ(-O-CH₃)、アミノプロポキシ(-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、アリル(-CH₂-CH=CH₂)、-O-アリル(-O-CH₂-CH=CH₂)、およびフルオロ(F)を含む。2'-糖置換基は、アラビノ(上)位またはリボ(下)位としてもよい。1つの2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様な修飾は、オリゴマー化合物上の他の位、特に3'末端ヌクレオチド上のまたは2'-5'結合オリゴヌクレオチドにおける糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位でもなされる。オリゴマー化合物は、ペントフラノシル糖の位置におけるシクロブチル部位などの糖擬態も保持する。そのような修飾糖構造の調合を教示した代表的な米国特許は、これに限定されるものではないが、米国特許番号第4,981,975号明細書;第5,118,800号明細書;第5,319,080号明細書;第5,359,044号明細書;5,393,878号明細書;第5,446,137号明細書;第5,466,786号明細書;第5,514,785号明細書;第5,519,134号明細書;第5,567,811号明細書;第5,576,427号明細書;第5,591,722号明細書;第5,597,909号明細書;5,610,300号明細書;5,627,053号明細書;第5,693,873号明細書;第5,646,265号明細書;第5,658,873号明細書;第5,670,633号明細書;第5,792,747号明細書;および第5,700,920号明細書を含む。

【0122】

代表的な糖置換基は、以下の構造式I_aまたはII_a：

10

20

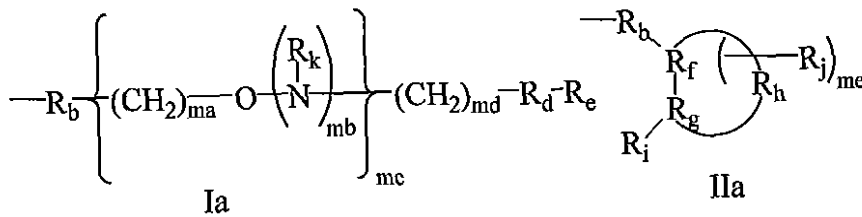
30

40

50

【 0 1 2 3 】

【 化 1 】



の基を含み、ここで、

10

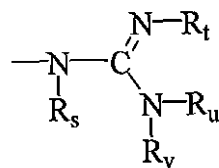
R_b は、O、S、またはNHであり；

R_d は、単結合、O、S、またはC(=O)であり；

R_e は、C₁ ~ C₁₀ アルキル、N(R_k)(R_m)、N(R_k)(R_n)、N=C(R_p)(R_q)、N=C(R_p)(R_r)、または以下の構造式 IIIa を持ち；

【 0 1 2 4 】

【 化 2 】



20

IIIa

R_p および R_q はそれぞれ個別に、水素、または C₁ ~ C₁₀ アルキルであり；

R_r は、-R_x-R_y であり；

R_s、R_t、R_u、および R_v はそれぞれ個別に、水素、C(O)R_w、置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキル、置換或いは非置換 C₂ ~ C₁₀ アルケニル、置換或いは非置換 C₂ ~ C₁₀ アルキニル、アルキルスルフォニル、アリールスルフォニル、化学官能基または共役基であり、ここにおいて前記置換基は、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、およびアルキニルから選択されるものであり；

30

または選択的に R_u および R_v は、それらが結合した窒素原子とフタルイミド部位を共に形成し；

各 R_w は個別に、置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキル、トリフルオロメチル、シアノエチルオキシ、メトキシ、エトキシ、t-ブトキシ、アリルオキシ、9-フルオレニルメトキシ、2-(トリメチルシリル)-エトキシ、2,2,2-トリクロロエトキシ、ベンジルオキシ、ブチリル、イソ-ブチリル、フェニル、またはアリールであり；

R_k は、水素、窒素保護基、または -R_x-R_y であり；

R_p は、水素、窒素保護基、または -R_x-R_y であり；

R_x は、結合または結合部位であり；

40

R_y は、化学官能基、共役基、あるいは固体支持媒体であり；

R_m および R_n はそれぞれ個別に、H、窒素保護基、置換或いは非置換 C₁ ~ C₁₀ アルキル、置換或いは非置換 C₂ ~ C₁₀ アルケニル、置換或いは非置換 C₂ ~ C₁₀ アルキニルであり、ここにおいて前記置換基は、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、アルキニル、NH₃⁺、N(R_u)(R_v)、グアニジノ、およびアシルから選択されるものであり、ここにおいて前記アシルは酸アミドまたはエステルであり；

または R_m および R_n は、共に窒素保護基であり、N および O から選択された付加的なヘテロ原子を選択的に含む環構造に結合されており、または化学機能基であり；

50

R_i は、 OR_z 、 SR_z 、または $N(R_z)_2$ であり；
 R_z はそれぞれ個別に、 H 、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_1 \sim C_8$ ハロアルキル、 $C(=NH)N(H)R_u$ 、 $C(=O)N(H)R_u$ 、または $OC(=O)N(H)R_u$ であり；
 R_f 、 R_g 、および R_h は、約 4 ~ 約 7 炭素原子を保持する、または約 3 ~ 約 6 炭素原子を保持し、1 または 2 ヘテロ原子を保持する環システムを有する環システムであり、ここにおいて前記ヘテロ原子は酸素、窒素、および硫黄から選択されたものであり、前記環システムは脂肪族、不飽和脂肪族、芳香族、または飽和または不飽和複素環であり；
 R_j は、1 ~ 約 10 炭素原子を保持するアルキルまたはハロアルキル、2 ~ 約 10 炭素原子を保持するアルケニル、2 ~ 約 10 炭素原子を保持するアルキニル、6 ~ 約 14 炭素原子を保持するアリール、 $N(R_k)(R_m)OR_k$ 、ハロ、 SR_k または CN であり；
 m_a は、1 ~ 約 10 であり；
 m_b はそれぞれ個別に、0 または 1 であり；
 m_c は、0 または 1 ~ 10 の整数であり；
 m_d は、1 ~ 10 の整数であり；
 m_e は、0、1、または 2 であり；
 m_c が 0 の時、 m_d は 1 以上の場合とする。

【0125】

構造式 I の代表的な置換基は、「キャッピング 2' - オキシエトキシオリゴヌクレオチド」というタイトルで 1998 年 8 月 7 日に出願された米国特許出願番号第 09 / 130,973 号明細書に開示されている。

【0126】

構造式 II の代表的な環状置換基は、「立体配置的に事前構築された RNA 標的 2' - オリゴマー化合物」というタイトルで 1998 年 7 月 27 日に出願された米国特許出願番号第 09 / 123,108 号明細書に開示されている。

【0127】

特定の糖置換基は、 $O((CH_2)_n O_m)CH_3$ 、 $O(CH_2)_n OCH_3$ 、 $O(CH_2)_n NH_2$ 、 $O(CH_2)_n CH_3$ 、 $O(CH_2)_n ONH_2$ 、および $O(CH_2)_n ON((CH_2)_n CH_3)_2$ を含み、ここにおいて n および m は 1 ~ 約 10 である。

【0128】

構造式 III および IV に示された代表的なグアニジノ置換基は、「機能化されたオリゴマー」というタイトルで 1999 年 7 月 7 日に出願された米国特許出願番号第 09 / 349,040 号明細書に開示されている。

【0129】

代表的なアセトアミド置換基は、米国特許番号第 6,147,200 号明細書に開示されている。

【0130】

代表的なジメチルアミノエチルオキシエチル置換基は、「2' - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル - オリゴマー化合物」というタイトルで 1999 年 8 月 6 日に出願された国際特許出願番号第 PCT / US 99 / 17895 号に開示されている。

【0131】

ここで用いられたように「修飾インターヌクレオシド結合」および「修飾バックボーン」、または単に「修飾結合」という用語は、オリゴマー化合物範囲内に 2 つの隣接ヌクレオシドを結合している天然由来ホスホジエステルインターヌクレオシド結合の修飾または置換を意味している。そのような修飾結合は、リン原子を保持する結合およびリン原子を保持しない結合を含む。

【0132】

そこにリン原子を含むインターヌクレオシド結合は、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、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネートおよ

10

20

30

40

50

びキラルホスホネートを含むメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホラミダイトおよびアミノアルキルホスホラミダイトを含むホスホラミダイト、チオノホスホラミダイト、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'結合を保持するセレノリン酸およびボラノリン酸、これらの2'-5'結合類似体、および逆位極性を保持するそれらを含み、ここにおいて1若しくはそれ以上のインターヌクレオシド結合は3'~3'、5'~5'、または2'~2'結合である。逆位極性を保持するオリゴヌクレオチドは、3'-先端インターヌクレオチドでの単3'~3'結合、すなわち脱塩基(核酸塩基が欠損またはその場所にヒドロキシ基を保持する)である単逆位ヌクレオシド残基を有することができる。様々な塩類、混合塩類、および遊離酸形態も含まれる。上述のリン-含有結合の調合を教示した代表的な米国特許は、これに限定されるものではないが、米国特許番号第3,687,808号明細書;第4,469,863号明細書;第4,476,301号明細書;5,023,243号明細書;5,177,196号明細書;第5,188,897号明細書;第5,264,423号明細書;第5,276,019号明細書;第5,278,302号明細書;第5,286,717号明細書;第5,321,131号明細書;第5,399,676号明細書;第5,405,939号明細書;5,453,496号明細書;第5,455,233号明細書;第5,466,677号明細書;第5,476,925号明細書;第5,519,126号明細書;第5,536,821号明細書;第5,541,306号明細書;第5,550,111号明細書;第5,563,253号明細書;第5,571,799号明細書;第5,587,361号明細書;第5,194,599号明細書;第5,565,555号明細書;第5,527,899号明細書;第5,721,218号明細書;第5,672,697号明細書;および第5,625,050号明細書を含む。

10

20

30

【0133】

線虫システムにおいて、前記インターヌクレオチド結合の修飾(ホスホジエステルの場所のホスホロチオエート)は、RNAi活性では著しく干渉せず、これは本発明のオリゴマー化合物は1若しくはそれ以上の修飾インターヌクレオシド結合を持ち、活性を保持することができることを意味している。実は、そのような修飾インターヌクレオチド結合は、例えば増強された細胞性取り込み、核酸標的に対して増強された親和性、およびヌクレアーゼ存在下での増加された安定性などを与えることができるという有利な特性のために、しばしば天然由来ホスホジエステル結合よりも望ましい。

【0134】

修飾インターヌクレオチド結合を含む別のリンは、ホスホノ-モノエステルである(米国特許番号第5,874,533号および第6,127,346号を参照のこと)。ホスホノモノエステル核酸は、核酸の検出に対するプローブとして、および分子生物学における使用に対する補助として、遺伝子発現の阻害(アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、センスオリゴヌクレオチド、および三重形成オリゴヌクレオチド)という分野において有用な物理的、生物学的および薬学的特性を保持する。

【0135】

以前に定義したように、オリゴヌクレオチドは、リン原子を保持しないインターヌクレオチド結合によって結合されたヌクレオチドの配列を意味する。非リン含有インターヌクレオチド結合は、短鎖アルキル、シクロアルキル、混合ヘテロ原子アルキル、混合ヘテロ原子シクロアルキル、1若しくはそれ以上の短鎖ヘテロ原子、および1若しくはそれ以上の短鎖複素環を含む。これらのインターヌクレオチド結合は、これに限定されるものではないが、シロキサンの、スルフィド、スルホキシド、スルホン、アセチル、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、アルケニル、スルファミン酸、メチレンイミノ、メチレンヒドラジン、スルフォネート、スルフォンアミド、アミド、および混合N、O、SおよびCH₂構成成分部分を保持する他のものを含む。上述のオリゴヌクレオチドの調合を教示している代表的な米国特許は、これに限定されるものではないが、米国特許番号第5,034,504号明細書;第5,166,315号明細書;5,185,444号明細書;第5,214,134号明細書;第5,216

40

50

、141号明細書；第5、235、033号明細書；第5、264、562号明細書；5、264、564号明細書；第5、405、938号明細書；第5、434、257号明細書；第5、466、677号明細書；第5、470、967号明細書；第5、489、677号明細書；第5、541、307号明細書；第5、561、225号明細書；第5、596、086号明細書；第5、602、240号明細書；第5、610、289号明細書；第5、602、240号明細書；第5、608、046号明細書；第5、610、289号明細書；第5、618、704号明細書；第5、623、070号明細書；第5、663、312号明細書；第5、633、360号明細書；第5、677、437号明細書；第5、792、608号明細書；第5、646、269号明細書；および第5、677、439号明細書を含む。

10

【0136】

リン原子を含まない修飾インターヌクレオシド結合のいくつかの付加的例として、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ （メチレン（メチルイミノ）またはMMIバックボーンとして知られている）、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 、および $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ （ここにおいて未変性ホスホジエステルインターヌクレオシド結合は、 $-O-P(=O)(OH)-O-CH_2-$ として示されている）を含む。前記MMIタイプおよびアミドインターヌクレオシド結合はそれぞれ、以下の参考文献米国特許番号第5、489、677号明細書および第5、602、240号明細書に開示されている。

20

【0137】

オリゴマー化合物の特性を増強できる、または前記オリゴマー化合物またはその代謝産物を追跡するために使用され得る別の修飾は、1若しくはそれ以上の部位または共役体の付加である。一般的に増強される特性は、活性を限定することなく、細胞分布、および細胞性取り込みを含む。1実施形態において、そのような修飾オリゴマー化合物は、ヒドロキシルまたはアミノ機能基などのオリゴマー化合物上の利用可能な機能基への共役基の共有結合性付加によって調合される。本発明の共役基は、干渉物質、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、オリゴマーの薬力学的特性を増強する基、およびオリゴマーの薬物動態的特性を増強する基を含む。一般的な共役基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素を含む。本発明の文中における薬力学的特性を増強する基は、これに限定されるものではないが、オリゴマー取り込み、分解に対する増強されたオリゴマー耐性、および/またはRNAとの強化された配列特異的ハイブリダイゼーションを含む。本発明の文中における薬物動態的特性を増強する基は、これに限定されるものではないが、オリゴマー取り込み、分布、代謝および排出を含む。代表的な共役基は国際特許出願番号第PCT/US92/09196号に開示されている。

30

【0138】

共役基は、これに限定されるものではないが、コレステロール部分（Lettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553~6556）、コール酸（Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053~1060）、チオエーテル（例えばヘキシル-S-トリチルチオール）（Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306~309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765~2770）、チオコレステロール（Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533~538）、脂肪族鎖（例えばドデカンジオール、またはウンデシル残基）（Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111~1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327~330; Svinarchuk

40

50

et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49~54)、リン脂質(例えばジ-ヘキサデシル-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-S-H-ホスホネート(Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651~3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777~3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖(Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969~973)、またはアダマンタン酢酸(Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651~3654)、パルミチル部分(Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229~237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分(Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923~937)などの脂質部分を含む。

【0139】

本発明のオリゴマー化合物は、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリイオド安息香酸、フルフェナム酸、ホリニン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメタシン、バルピツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤、または抗生物質などの薬剤物質を活性化するためにも共役される。オリゴヌクレオチド-薬剤共役基およびそれらの調合は、米国特許番号第09/334,130号明細書に記載されている。

【0140】

そのようなオリゴヌクレオチド共役基の調合を教示する代表的な米国特許は、これに限定されるものではないが、米国特許番号第4,828,979号明細書;第4,948,882号明細書;第5,218,105号明細書;第5,525,465号明細書;第5,541,313号明細書;第5,545,730号明細書;第5,552,538号明細書;第5,578,717号明細書;第5,580,731号明細書;第5,580,731号明細書;第5,591,584号明細書;第5,109,124号明細書;第5,118,802号明細書;第5,138,045号明細書;第5,414,077号明細書;第5,486,603号明細書;第5,512,439号明細書;第5,578,718号明細書;第5,608,046号明細書;第4,587,044号明細書;第4,605,735号明細書;第4,667,025号明細書;第4,762,779号明細書;第4,789,737号明細書;第4,824,941号明細書;第4,835,263号明細書;第4,876,335号明細書;第4,904,582号明細書;第4,958,013号明細書;第5,082,830号明細書;第5,112,963号明細書;第5,214,136号明細書;第5,082,830号明細書;第5,112,963号明細書;第5,214,136号明細書;第5,245,022号明細書;第5,254,469号明細書;第5,258,506号明細書;第5,262,536号明細書;第5,272,250号明細書;第5,292,873号明細書;第5,317,098号明細書;第5,371,241号明細書;第5,391,723号明細書;第5,416,203号明細書;第5,451,463号明細書;第5,510,475号明細書;第5,512,667号明細書;第5,514,785号明細書;第5,565,552号明細書;第5,567,810号明細書;第5,574,142号明細書;第5,585,481号明細書;第5,587,371号明細書;第5,595,726号明細書;第5,597,696号明細書;第5,599,923号明細書;第5,599,928号明細書、および第5,688,941号明細書を含む。

【0141】

本発明の組成物において使用されたオリゴマー化合物は、例えばヌクレアーゼ安定性などの特性を増強するようにオリゴマー化合物の片側または両側の末端一般的に結合される

、1若しくはそれ以上の安定化基を保持するようにも修飾され得る。安定化基にはキャップ構造が含まれる。本明細書において使用されたように「キャップ構造」または「末端キャップ部位」という用語は、オリゴマー化合物の片側または両側の末端に結合され得る、化学修飾を意味している。これら末端修飾は、末端核酸部位を保持するオリゴマー化合物をエキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内の運搬および/または局在化を助けることができる。前記キャップは、5'-末端(5'-キャップ)に、または3'-末端(3'-キャップ)に存在し得る、または両末端に存在し得る。限定のない例において、前記5'-キャップは、逆位脱塩基残基(部位)、4',5'-メチレンヌクレオチド;1-(ベータ-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-無水ヘキシトールヌクレオチド;L-ヌクレオチド;アルファ-ヌクレオチド;修飾塩基ヌクレオチド;ホスホロジチオエート結合;トレオ-ペントフラノシスヌクレオチド;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-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド;3'-3'-逆位ヌクレオチド部位;3'-3'-逆位脱塩基部位;3'-2'-逆位ヌクレオチド部位;3'-2'-逆位脱塩基部位;1,4-ブタンジオールリン酸;3'-ホスホラミダイト;リン酸ヘキシル;リン酸アミノヘキシル;3'-リン酸;3'-ホスホロチオエート;ホスホロジチオエート;または架橋または非架橋メチルホスホン酸部位(より詳細はWincottら、国際公開公報番号第WO97/26270号を参照のこと)を含む。

10

【0142】

特に適した本発明の3'-キャップ構造は、例えば4',5'-メチレンヌクレオチド;1-(ベータ-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-アルキルリン酸、1,3-ジアミノ-2-プロピルリン酸、3-アミノプロピルリン酸;6-アミノヘキシルリン酸;1,2-アミノドデシルリン酸;ヒドロキシプロピルリン酸;1,5-無水ヘキシトールヌクレオチド;L-ヌクレオチド;アルファ-ヌクレオチド;修飾塩基ヌクレオチド;ホスホロジチオエート;トレオ-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-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-逆位ヌクレオチド部位;5'-5'-脱塩基部位;5'-ホスホラミダイト;5'-ホスホロチオエート;1,4-ブタンジオールリン酸;5'-アミノ;架橋および/または非架橋5'-ホスホラミダイト、ホスホロチオエートおよび/またはホスホロジチオエート、架橋または非架橋メチルホスホン酸、および5'-メルカプト部位(より詳細はBeaucage and Tyler, 1993, Tetrahedron 49, 1925、および2005年1月27日に公開された米国公開公報第US2005/0020525号を参照)を含む。

20

30

【0143】

オリゴマー化合物の片端または両端をキャップしヌクレアーゼ安定性を与えるために使用され得る更なる3'および5'-安定化基は、国際公開公報番号第WO03/004602号に開示されているものを含む。

【0144】

修飾および非修飾ヌクレオシドのオリゴマー化は、必要に応じて、DNA(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press)および/またはRNA(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 (2001), 57, 5707~5713)合成のための文献手順に従って実行される。さらに、本発明のオリゴマー化合物の合成に対する特別なプロトコールは、以下の実施例において説明される。

40

【0145】

50

支持体固定されたオリゴヌクレオチド合成は、伸長鎖の片端へのヌクレオチドの配列付加に依存している。一般的に、第一のヌクレオシド（あらゆる環外アミン官能性存在で保護基を保持する）は適切なガラスビーズ支持体へ接着され、適切な活性化亜リン酸エステル部位、すなわち「活性化亜リン酸基」（一般的にはさらに適切な保護基を生じる、ヌクレオチドホスホラミダイト）を生じるヌクレオチドは伸長オリゴヌクレオチドを伸長するために段階的に付加される。固相合成に対する付加的方法は、Caruthersの米国特許番号第4,415,732号明細書；第4,458,066号明細書；第4,500,707号明細書；第4,668,777号明細書；第4,973,679号明細書；および第5,132,418号明細書；およびKosterの米国特許番号第4,725,677号明細書および第Re.34,069号明細書に認められる。

10

【0146】

オリゴヌクレオチドは、溶液中でまたは支持媒体（例えば固体支持媒体など）上で一般的に調合される。一般的に、第一のシント（出発材料）（例えば、ヌクレオシドなどのモノマー）は、支持媒体に最初に接着され、次にオリゴヌクレオチドは前記支持体固定されたシントへの経時的なモノマーのカップリングによって合成される。この反復性伸長は最終的に最終オリゴマー化合物、またはポリペプチドなどの他のポリマーを生じる。適した支持媒体は可溶性または不溶性であり得る、または異なる溶媒における様々な溶解度を有し、これは伸長する支持体固定されたポリマーが要望通りに溶液内外に存在することを可能にする。固体支持媒体などの従来支持媒体は、大部分が不溶性であり、試薬と溶媒とが反応するおよび/または前記支持体から切断された後、オリゴマーが標的の長さ

20

【0147】

支持媒体という用語は、オリゴマー化合物およびペプチドなどの関連する化合物の合成用に本分野の当業者に既知である全ての形態の支持体を含むことを意味している。本発明の方法に従ったいくつかの代表的な支持媒体は、これに限定されるものではないが以下のもの：微細孔ガラス（CPG）；オキサリル-微細孔ガラス（例えば、Alul et al., Nucleic Acids Research 1991, 19, 1527を参照のこと）；例えばトリクロロ-[3-(4-クロロメチル)フェニル]プロピルシランと多孔性ガラスビーズとの反応によって形成されるような多孔性ガラスビーズおよびシリカゲルなどの、シリカ含有粒子（Parr and Grohmann, Angew. Chem. International. Ed. 1972, 11, 314を参照のこと、さらに商標「PORASILE」としてWaters Associates (Framingham, Mass., 米国)から販売されている）；1,4-ジヒドロキシメチルニルベンゼンのモノエステルおよびシリカ（Bayer and Jung, Tetrahedron Lett., 1970, 4503を参照のこと、さらに商標「BIOPAK」としてWaters Associatesから販売されている）；TENTAGEL（例えば、Wright, et al., Tetrahedron Letters 1993, 34, 3373を参照のこと）；架橋スチレン/ジビニルベンゼンコポリマービーズ状マトリックスまたはPORPS（ポリスチレン/ジビニルベンゼンのコポリマー、Perceptive Biosystemsから入手可能）；可溶性支持媒体であるポリエチレングリコールPEGs（Bonora et al., Organic Process Research & Development, 2000, 4, 225~231を参照のこと）を含む。

30

40

【0148】

本明細書において使用されるように「結合部位」という用語は、一般的に二官能性基であり、最終3'-ヌクレオシド（従って新生オリゴヌクレオチド）は合成の間、前記固体

50

支持媒体に共有結合的に結合するが、5' - 保護基および該当する場合あらゆる2' - 保護基が除去されるという条件に直交する条件下で切断される。適切な結合部分はこの限定されるものではないが、アルキレン、シクロアルキレン、アリーレン、ヘテロシクリル、ヘテロアリーレンなどの二価基、および上述されたような他の変形型を含む。

【0149】

例示的なアルキレン結合部位はこれに限定されるものではないが、C₁ ~ C₁₂ アルキレン（例えばメチレン、エチレン（例えばエチル - 1, 2 - エン）、プロピレン（例えばプロピル - 1, 2 - エン、プロピル - 1, 3 - エン）、ブチレン（例えばブチル - 1, 4 - エン、2 - メチルプロピル - 1, 3 - エン）、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、デシレン、ドデシレン）などを含む。例示的なシクロアルキレン基は、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンタニル - 1, 3 - エン、シクロヘキシル - 1, 3 - エン、シクロヘキシル - 1, 4 - エンなどのC₃ ~ C₁₂ シクロアルキレン基を含む。例示的なアリーレン結合部位はこれに限定されるものではないが、例えばフェニル - 1, 2 - エン、ナフチル - 1, 6 - エン、ナフチル - 2, 7 - エン、アントラセニルなどの、6 ~ 約14炭素原子を保持する単環性または二環性アリーレン基を含む。本発明の観点内の例示的なヘテロシクリル基は、約4 ~ 約12炭素原子および約1 ~ 約4ヘテロ原子（例えばN、OおよびSなど）を保持する単環式または二環式アリーレン基を含み、ここにおいて前記環状部分は部分的に脱水素化されているものである。

10

【0150】

本発明の観点内であるとして言及される特定のヘテロアリーレン基は、ピロリジニル、ピペリジニル（例えば2, 5 - ピペリジニル、3, 5 - ピペリジニル）、ピペラジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、テトラヒドロキナゾリニル、テトラヒドロキノキサリニルなどを含む。例示的なヘテロアリーレン基は、約4 ~ 約12炭素原子および約1 ~ 約4ヘテロ原子（例えばN、OおよびSなど）を保持する単環式または二環式アリーレン基を含む。本発明の観点内であるとして言及される特定のヘテロアリーレン基は、ピリジレン（例えばピリジル - 2, 5 - エン、ピリジル - 3, 5 - エン）、ピリミジニル、チオフェニル、フラニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、キノキサリニルなどを含む。

20

【0151】

オリゴマー化合物および関連する化合物の支持媒体ベース合成用にルーティンに使用される商業的に利用可能な装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, CA) を含むいくつかの製造供給元で販売されている。本分野で既知なそのような合成に対するあらゆる他の手段を、付加的にまたは代替的に利用する。自動合成技術を含む適切な固体相技術は、F. Eckstein (ed), *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1991) に記載されている。

30

【0152】

多くの研究がオリゴリボヌクレオチドの合成に焦点を当てているが、現在商業的に使用されている主要なRNA合成戦略は、5' - O - DMT - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル (TBDMS)、5' - O - DMT - 2' - O - [1 (2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル] (FPMP)、2' - O - [(トリイソプロピルシリル) オキシ] メチル (2' - O - CH₂ - O - Si(iPr)₃ (TOM)、および5' - シリルエーテル - 2' - ACE (5' - O - ビス(トリメチルシロキシ)シクロドデシルオキシシリルエーテル (DOD) - 2' - O - ビス(2 - アセトキシエトキリ)メチル (ACE) を含む。現在RNA産生を売り出している主要な会社のいくつかに関する現在のリストは、Pierce Nucleic Acid technologies、Dharmacon Research Inc.、Ameri Biotechnologies Inc.、およびIntegrated DNA Technologies, Inc. を含む。1つの会社であるPrinceton Separationsは

40

50

、特にTOMとTBDMSC化学とのカップリング時間を減少すると宣伝しているRNA合成活性化因子を市場販売している。そのような活性化因子も本発明に適している。商業用RNA合成に対して使用されている第一の基は：

TBDMSC = 5' - O - DMT - 2' - O - t - ブチルジメチルシリル；

TOM = 2' - O - ビス(2 - アセトキシエトキリ)メチル；

DOD / ACE = 5' - O - ビス(トリメチルシロキシ)シクロドデシルオキシシリルエーテル - 2' - O - ビス(2 - アセトキシエトキリ)メチル；

FPMP = 5' - O - DMT - 2' - O - [1(2 - フルオロフェニル) - 4 - メトキシピペリジン - 4 - イル]である。

【0153】

前述のRNA合成戦略の全てが本発明に適している。例えば1つの戦略からの5' - 保護基と別の戦略からの2' - O - 保護基とを用いた上述のハイブリッドとなる戦略も本発明に適している。

【0154】

本発明において使用されるように「アンチセンス」または「アンチセンス阻害」という用語は、オリゴマー化合物またはそれらの一部と選択された標的核酸とのハイブリダイゼーションを意味している。複数のアンチセンスメカニズムは、オリゴマー化合物が哺乳類細胞において遺伝子発現を調節するために使用され得る手段として存在している。そのようなアンチセンス阻害は、少なくとも1つの鎖または断片が切断される、分解される、または他の動作不能にするような相補鎖または断片の水素結合 - ベースハイブリダイゼーションに一般的に基づいている。この点に関して、そのようなアンチセンス阻害に対して特異的核酸分子およびそれらの機能を標的にすることは現在適している。

【0155】

干渉されるDNAの機能は複製および転写を含むことができる。複製および転写は、例えば内因性細胞型、ベクター、プラスミドコンストラクトまたは他のものからなされる。干渉されるRNAの機能は、タンパク質翻訳の部位へのRNAの転座、RNA合成の部位とは離れている細胞内の部位へのRNAの転座、RNAからのタンパク質の翻訳、1若しくはそれ以上のRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAに携わるまたはRNAによって促進される、RNAに関する触媒活性または複合体形成などの機能を含むことができる。

【0156】

一般に開発されたアンチセンスメカニズムは、標的RNAのRNase H - 依存性分解である。RNase Hは、アンチセンスDNA - RNAヘテロ二本鎖を認識しそのRNA鎖を加水分解するエンドヌクレアーゼを偏在的に発現されている。更なるアンチセンスメカニズムは、RNA - RNA二本鎖の切断を触媒する酵素の利用に関するものである。これらの反応は、これに限定されるものではないが、RNase IIIおよびRNase Lを含むRNase酵素群によって触媒される。RNA干渉(RNAi)として知られているアンチセンスメカニズムは、RNA - RNAハイブリッドおよびそれと同等のものに有効である。RNase Hベースアンチセンス(通常一本鎖化合物を使用する)およびRNA干渉(通常siRNAとして知られている二本鎖化合物を使用する)の両方がアンチセンスメカニズムであり、一般的に標的RNA機能の損失を生じる。

【0157】

最適化siRNAおよびRNase H依存性オリゴマー化合物は、有効性、最大効果、特異性、および作用持続期間、および効率の観点で同様に振舞う。さらに、一般的にdsRNAコンストラクトの活性は、同じ部位を標的化したRNase H依存性一本鎖アンチセンスオリゴマー化合物の活性と一致することが示されていた。1つの大きな例外は、RNase H依存性アンチセンスオリゴマー化合物が、プレmRNAにおける標的部位に対して活性化され、siRNAは活性化されないことである。

【0158】

これらのデータにより、一般的に、RNase H依存性オリゴヌクレオチドで活性化さ

10

20

30

40

50

れない標的RNA上の部位は、siRNAに対して同様により部位ではないことが示唆された。反対に、活性化RNaseHオリゴマー化合物とsiRNAとの間の著しい程度の相互関係は、ある部位がRNaseHオリゴマー化合物にハイブリダイズするのに利用可能である場合、siRNA複合体によるハイブリダイゼーションおよび切断にも利用可能であることを示唆している。その結果、一度適切な標的部位がアンチセンスアプローチによって決定されたら、これらの部位は代替アンチセンスメカニズムによって機能するコンストラクトを設計するために使用され得る (Vickers et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 7108)。さらに、一度ある部位がRNAiまたはRNaseHオリゴマー化合物に対して活性化であるとして示されたら、一本鎖RNAiオリゴマー化合物 (ssRNAiまたはasRNA) は設計され得る。

10

【0159】

本発明のオリゴマー化合物および方法は、低分子非コードRNAの研究、特徴付け、検証、および調節にも有用である。これらは、これ限定されるものではないが、マイクロRNA (miRNA)、低分子核内RNA (snRNA)、核小体低分子RNA (snorRNA)、低分子時間的RNA (small temporal RNAs: stRNA)、および微小非コードRNA (tncRNA)、またはそれらの前駆体、またはプロセシング転写産物、または他の細胞構成成分との関連物を含む。

【0160】

低分子非コードRNAは、植物、線虫および哺乳類を含む幅広い生物体の様々な発生および調節経路において機能すると示されていた。マイクロRNAは、酵素的切断によって大きな前駆体から加工された低分子非コードRNAであり、mRNAの翻訳を阻害する。stRNAはmiRNAと同様に前駆体から加工される一方、発生タイミング調節に関与していると示された。他の非コード低分子RNAは、転写産物の細胞性スプライシング、翻訳、輸送、および染色体構築と同じ位多様なイベントに関与している。

20

【0161】

低分子非コードRNA機能の調節因子として、本発明のオリゴマー化合物は例えばスプライシングの調節、染色体パッケージングまたはメチル化、発生的タイミングイベントの調節、特異的な生物学的経路への運搬のタイミングに依存した標的RNA発現レベルの増加または減少、および翻訳または転写調節などの、細胞性機能または加工の調節および操作における有用性も見出された。さらに、本発明のオリゴマー化合物は、例えば細胞質、核、核小体またはミトコンドリアなどの特定の細胞コンパートメントにおけるそれらの効果を最適化するために修飾され得る。

30

【0162】

本発明の化合物はさらに、RNAプロセシングまたは代謝の調節経路のコンポーネント、さらにはスクリーニングアッセイや装置におけるコンポーネントを同定するために使用され得る。

【0163】

特定の核酸分子に対してオリゴマー化合物を標的化することは、本発明の文脈において多段階工程であり得る。前記工程は、その機能を修飾される標的核酸の同定から通常始める。本明細書において使用されるように「標的核酸」および「核酸標的」という用語は、限定することなく、DNA (細胞性遺伝子)、そのようなDNAから転写されたRNA (プレmRNA、mRNA、およびそれらの一部を含む)、およびそのようなRNAから由来したcDNAも含む、標的となり得るあらゆる核酸を意味している。1実施形態において、選択された遺伝子の発現の調節は特定の障害または病状に関連している。別の実施形態において、前記標的核酸は、感染性因子からの核酸分子である。

40

【0164】

標的化工程は通常、例えば発現の調節などの望ましい効果を生じるようなアンチセンス相互作用に対する標的核酸内の少なくとも1つの標的領域、断片、または部位を決定する工程を含む。核酸標的に適用されるような本発明の文脈内で、「領域」という用語は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能または特徴を保持する前記標的核酸の一部として定

50

義される。領域内の標的核酸は断片である。「断片」は、標的核酸内の領域のより小さいまたはサブ部分として定義される。本発明で使用されるように「部位」は、標的核酸内の位置として定義される。領域、断片および部位という用語は、例えば3分離領域または断片を保持するギャプトオリゴマー化合物などの本発明のオリゴマー化合物を記載するためにも使用され得る。

【0165】

本分野において既知であるように、翻訳開始コドンは一一般的に5'-AUG(転写されたmRNA分子内;対応するDNA分子内では5'-ATG)であり、翻訳開始コドンも「AUGコドン」、「開始コドン」、または「AUG開始コドン」として言及される。少数の遺伝子は、RNA配列5'-GUG、5'-UUG、または5'-CUGを保持する翻訳開始コドンを保持しており、5'-AUA、5'-ACG、および5'-CUGが*in vivo*で機能を果たすと示された。従って、「翻訳開始コドン」および「開始コドン」という用語は、それぞれの場合におけるイニシエーターアミノ酸が一般的にメチオニン(真核生物)またはホルミルメチオニン(原核生物)であるけれども、多くのコドン配列を含むことができる。本分野では、真核生物および原核生物遺伝子は2またはそれ以上の代替開始コドンを持ち、それらの任意の1つは特定の細胞タイプまたは組織において、または特定の条件下での翻訳開始のために選択的に利用されるということも既知である。本発明の文脈において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、そのようなコドンの配列に関わらず、核酸標的をコード化している遺伝子から転写されるmRNAの翻訳を開始するために*in vivo*で使用されるコドンまたはコドン群を意味している。本分野では、遺伝子の翻訳終止コドン(または「終止コドン」)は3つの配列、すなわち5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA(対応DNA配列はそれぞれ5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGA)の1つを保持するということも既知である。

【0166】

「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」という用語は、翻訳開始コドンから両方向(すなわち5'または3')の約25~約50近接ヌクレオチドを含む、そのようなmRNAまたは遺伝子の一部を意味している。同様に、「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」という用語は、翻訳終止コドンから両方向(すなわち5'または3')の約25~約50近接ヌクレオチドを含む、そのようなmRNAまたは遺伝子の一部を意味している。その結果、「開始コドン領域」(または「翻訳開始コドン領域」)および「終止コドン領域」(または「翻訳終止コドン領域」)は、本発明のアンチセンスオリゴマー化合物で効果的に標的化される全ての領域である。

【0167】

翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域として本分野では既知であるオープンリーディングフレーム(ORF)または「コドン領域」は、効果的に標的化される領域でもある。本発明の文脈内で、1つの領域は遺伝子のオープンリーディングフレーム(ORF)の翻訳開始または終止コドンを含む、遺伝子内領域である。

【0168】

他の標的領域は、翻訳開始コドンから5'方向でのmRNAの一部として言及されると本分野では既知である5'非翻訳領域(5'UTR)を含み、従って5'キャップ部位とmRNAの翻訳開始コドンとの間のヌクレオチド(または遺伝子上の対応ヌクレオチド)を含み、翻訳終止コドンから3'方向でのmRNAの一部として言及されると本分野では既知である3'非翻訳領域(3'UTR)を含み、従って翻訳終止コドンとmRNAの3'末端との間のヌクレオチド(または遺伝子上の対応ヌクレオチド)を含む。mRNAの5'キャップ部位は、5'-三リン酸結合を解してmRNAの5'-最先端(most)残基に結合したN7-メチル化グアノシン残基を有する。mRNAの5'キャップ領域は、前記キャップ部位と隣接した最初の50ヌクレオチドと同様に、5'キャップ構造自体を含むと考えられている。5'キャップ領域を標的化することも適している。

【0169】

いくつかの真核生物mRNA転写産物は直接翻訳されるが、多くは、翻訳される前の転

写産物から除去される「イントロン」として知られている1若しくはそれ以上の領域を含む。残り(およびそのために翻訳された)領域は「エキソン」として知られており、連続mRNA配列を形成するために一緒にスプライシングされる。標的スプライシング部位、すなわちイントロン-エキソン接合部またはエキソン-イントロン接合部は、異常スプライシングが疾患に関連している、または特定のスプライシング産物の過剰産生が疾患に関連しているという状況で特に有用である。再構成または欠損に起因する異常な融合接合も適した標的部位である。異なる遺伝子源からの2つ(またはそれ以上)のmRNAのスプライシングの工程を介して産生されたmRNA転写産物は、「融合転写産物」として知られている。イントロンは、例えばDNAまたはプレ-mRNAを標的化したアンチセンスオリゴマー化合物を用いて効果的に標的化され得ることも既知である。

10

【0170】

選択的RNA転写産物はDNAの同じゲノム領域から産生され得るということは本分野において既知である。これらの選択的転写産物は一般的に「変異体」として知られている。より具体的には「プレ-mRNA変異体」は、それらの開始または終止位置における同じゲノムDNAから産生された他の転写産物とは異なり、イントロン配列およびエキソン配列の両方を含む、同じゲノムDNAから産生された転写産物である。

【0171】

スプライシングの間、エクソンまたはイントロン領域、またはそれらの一部の1若しくはそれ以上の切除で、プレ-mRNA変異体はより小さい「mRNA変異体」を産生する。次に、mRNA変異体はプレ-mRNA変異体にプロセッシングされ、それぞれ独特なプレ-mRNA変異体はスプライシングの結果としていつも独特なmRNA変異体を産生しなくてはならない。これらのmRNA変異体は「選択的スプライシング変異体」としても知られている。プレ-mRNA変異体のスプライシングが起こらなかった場合、次に前記プレ-mRNA変異体はmRNA変異体と同一である。

20

【0172】

変異体は転写を開始または終止するための選択的シグナルの使用を通じて産生され得、プレ-mRNAおよびmRNAは1つ以上の開始コドンまたは終止コドンを有することができるということも本分野では既知である。選択的開始コドンを用いるプレ-mRNAおよびmRNAに由来する変異体は、そのプレ-mRNAまたはmRNAの「選択的開始変異体」として知られている。選択的終止コドンを用いるそれら転写産物は、そのプレ-mRNAまたはmRNAの「選択的終止変異体」として知られている。選択的終止変異体の1つの特異的なタイプは、「ポリA変異体」であり、産生された複数の転写産物は転写機構によって1つの「ポリA終止シグナル」の代替的選択に起因し、それによって独特なポリA部位で終止する転写産物を産生する。本発明の文脈内で、ここに記載された変異体のタイプも適切な標的核酸である。

30

【0173】

前記アンチセンスオリゴマー化合物とハイブリダイズする前記標的核酸上の位置は、後述の通り「適切な標的断片」として言及される。本明細書において使用されるように「適切な標的断片」という用語は、活性型アンチセンスオリゴマー化合物が標的化している、標的領域の少なくとも8-核酸塩基部分として定義される。理論によって束縛されることなく、これら標的断片は、ハイブリダイゼーションに利用できる前記標的核酸の一部を表している現在信じられている。

40

【0174】

例示的なアンチセンスオリゴマー化合物は、例えば細胞性遺伝子またはその遺伝子から転写されたmRNAなどの、標的化した核酸の5'末端から少なくとも8連続した核酸塩基を有するオリゴマー化合物を含む(残りの核酸塩基は、同じオリゴヌクレオチドの連続伸長であり、前記標的核酸へ特異的にハイブリダイズする前記アンチセンスオリゴマー化合物の5'末端のすぐ上流から始まり、オリゴヌクレオチドが約8~約80核酸塩基を含むまで続けられる)。同様に、アンチセンスオリゴマー化合物は、実例的アンチセンスオリゴマー化合物の1つの3'末端から少なくとも8連続した核酸塩基を有するオリゴヌク

50

レオチド配列によって表されている（残りの核酸塩基は、同じオリゴヌクレオチドの連続伸長であり、前記標的核酸へ特異的にハイブリダイズする前記アンチセンスオリゴマー化合物の3'末端のすぐ下流から始まり、オリゴヌクレオチドが約8～約80核酸塩基を含むまで続けられる）。本明細書で説明されたアンチセンスオリゴマー化合物を理解している当業者は、過度な実験をすることなしに、更なるアンチセンスオリゴマー化合物を同定することができる。

【0175】

一度1若しくはそれ以上の標的領域、断片または部位が同定されたら、アンチセンスオリゴマー化合物は前記標的と十分に相補的である、すなわち、望ましい効果を提供するために十分な特異性を有して十分によくハイブリダイズされるものが選択される。

10

【0176】

本発明の1実施形態に従うと、本発明のアンチセンスオリゴマー化合物を有する一連の核酸二本鎖とそれらの相補鎖は、特異的な標的または標的群に対して設計され得る。前記鎖の末端は、オーバーハングを形成するように1若しくはそれ以上の天然または修飾核酸塩基の付加によって修飾されている。前記二本鎖のセンス鎖は次に、前記アンチセンス鎖の相補鎖として設計され合成され、両末端への修飾または付加も含む。例えば1実施形態において、前記二本鎖の両鎖は中央核酸塩基に対して相補的であり、それぞれは1または両末端にオーバーハングを保持する。

【0177】

前記二本鎖のRNA鎖は、本明細書で開示された方法によって合成され得る、または様々なRNA合成会社、例えばDharmacon Research Inc. (Lafayette, CO) などから購入される。合成したら、相補鎖をアニーリングした。前記一本鎖は一定分量にされ、50 μMの濃度まで希釈される。希釈したら、30 μMの各鎖は15 μLの5×アニーリングバッファー溶液と混合される。前記バッファーの最終濃度は100 mMアセチル酸カリウム、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、および2 mMアセチル酸マグネシウムであった。最終用量は75 μLである。この溶液を1分間90 でインキュベートし、15秒間遠心分離した。そのチューブは、dsRNA二本鎖を実験に使用するまで1時間37 で放置した。dsRNA化合物の最終濃度は20 μMである。この溶液は凍結(-20)で貯蔵可能であり、5回まで凍結融解可能である。

20

30

【0178】

調合されたら、この望ましい合成二本鎖は標的発現を調節するそれらの能力を評価される。細胞が80%コンフルエンスに達した場合、その細胞は本発明の少なくとも1つのオリゴマー化合物を有する合成二本鎖で処理される。96ウェルプレートで増殖した細胞に対しては、ウェルは200 μL OPTI-MEM-1低減血清培養液(Gibco BRL)で1回洗浄し、次に12 μg/mLリポフェクチン(Gibco BRL)および最終濃度200 nMの望ましいdsRNA化合物を含有した130 μLのOPTI-MEM-1で処理される。処理の5時間後、前記培養液は新鮮培養液に交換した。細胞は処理後16時間で回収し、その時点でRNAが単離され、標的減少をRT-PCRによって測定した。

40

【0179】

更なる実施形態において、本明細書において同定された「適切な標的断片」は、標的の発現を調節する付加的なオリゴマー化合物をスクリーニングする際に使用される。「修飾因子」は、標的をコード化する核酸分子の発現を減少または増加し、適切な標的断片に相補的な少なくとも8核酸塩基部分を有するオリゴマー化合物のことである。前記スクリーニング方法は、標的をコード化した核酸分子の適切な標的断片を1若しくはそれ以上の候補修飾因子と接触させる工程と、標的をコード化した核酸分子の発現を減少または増加する1若しくはそれ以上の候補修飾因子を選択する工程とを有している。候補修飾因子または修飾因子群が標的をコード化する核酸分子の発現を調節することができる（例えば、減少するまたは増加する）と示された場合、前記修飾因子は次に、標的の機能の更なる調査

50

研究において、または本発明に従った研究、診断、または治療用因子としての使用で用いられる。

【0180】

本発明の適切な標的断片は、本発明の各相補的アンチセンスオリゴマー化合物と組み合わせ、安定化二本鎖（二本鎖化）オリゴヌクレオチドを形成する。

【0181】

本発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」とは、相補的ヌクレオシドの複素環塩基部位間のワトソン-クリック、Hoogsteen型または予備Hoogsteen型水素結合である、水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは水素結合の形成を介して対をなす相補的核酸塩基である。本明細書において使用されたように「相補的」は、2つのヌクレオチド間で正確な対を形成することができる能力を意味している。例えば、オリゴヌクレオチドの特定位置のヌクレオチドがDNAまたは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る場合、前記オリゴヌクレオチドとDNAまたはRNAとは、それぞれ相補的であると考えられる。各分子において十分な数の一致する位置がそれぞれ水素結合することができるヌクレオチドによって占有される時、前記オリゴヌクレオチドおよびDNAまたはRNAは互いに相補的であると考えられる。従って、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、十分な程度に相補性であること、または、適切で特異的な結合が前記オリゴヌクレオチドとDNAまたはRNA標的との間に生じるように正確に対をなすことを意味するために使用される用語である。アンチセンスオリゴマー化合物の配列は、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸と100%相補的である必要はないことは当業者には理解される。アンチセンスオリゴマー化合物は、前記標的DNAまたはRNA分子への化合物の結合が標的DNAまたはRNAの正常機能を干渉し完全なまたは部分的な機能欠損を引き起こす場合、および、特異的な結合が望ましい条件下、すなわち治療上処置における生理学条件下、または*in vitro*または*in vivo*アッセイを実行する条件下で前記アンチセンスオリゴマー化合物の非標的配列への非特異的結合を避けるのに十分な程度に相補的である場合、特異的にハイブリダイズ可能である。さらに、オリゴヌクレオチドは、介在または隣接断片はハイブリダイゼーション現象（例えばループ構造、ミスマッチまたはヘアピン構造）には関連しないように、1若しくはそれ以上の断片とハイブリダイズする。

【0182】

本発明のオリゴマー化合物は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%配列相補性を有し、それらが標的化する標的核酸配列内の標的領域を標的化する。例えば、前記アンチセンスオリゴマー化合物の20核酸塩基中18核酸塩基が標的領域に対して相補的であり、従って特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴマー化合物は90%相補性を示す。この実施例において、残りの非相補的核酸塩基は、相補的核酸塩基でクラスタ化され散在され、お互いにまたは相補的核酸塩基と隣接する必要はない。そのようなものとして、前記標的核酸と完全に相補的な2つの領域に隣接する、4非相補的核酸塩基を保持する長さ18核酸塩基であるアンチセンスオリゴマー化合物は、前記標的核酸と77.8%総合相補性を持ち、従って本発明の観点内には入らない。

【0183】

アンチセンスオリゴマー化合物の標的核酸の領域とのパーセント相補性は、当業者には既知であるBLASTプログラム（塩基局在アライメントサーチ手段）およびPowerBLASTプログラムを用いてルーティンに決定され得る（Altschulet al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403~410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649~656）。パーセント相同性、配列同一性または相補性は、例えばSmithおよびWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482~489）を用いるデフォルトセッティングを用いた、Gapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix（

登録商標)、Genetics Computer Group, University Research Park, ウィスコンシン州 Madison) などによって決定され得る。いくつかの実施例において、前記オリゴマー化合物と前記標的との間の相同性、配列同一性または相補性は、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または100%である。

【0184】

いくつかの実施形態において、「適切な標的断片」は選択されたタンパク質の発現を調節する付加的なオリゴマー化合物のスクリーニングに用いられる。「修飾因子」は、タンパク質をコード化する核酸分子の発現を減少または増加し、適切な標的断片と相補的な少なくとも8核酸塩基部分を有する、オリゴマー化合物である。前記スクリーニング方法は、タンパク質をコード化する核酸分子の適切な標的断片を1若しくはそれ以上の候補修飾因子と接触させる工程と、タンパク質をコード化する核酸分子の発現を減少または増加する1若しくはそれ以上の候補修飾因子を選択する工程とを有する。候補修飾因子または修飾因子群がペプチドをコード化する核酸分子の発現を調節することができる(例えば、減少するまたは増加する)と示された場合、前記修飾因子は次に、ペプチドの機能の更なる調査研究において、または本発明に従った研究診断、または治療用因子としての使用で用いられる。

【0185】

本発明の適切な標的断片は、本発明の各相補的アンチセンスオリゴマー化合物と組み合わせ、安定化二本鎖(二本鎖化)オリゴヌクレオチドを形成する。そのような二本鎖オリゴヌクレオチド部位は標的発現を修飾し、アンチセンスメカニズムを介したRNAプロセッシングと同様に翻訳を制御すると本分野では示されていた。さらに、前記二本鎖部位は化学修飾の対象となりうる(Fire et al., Nature, 1998, 391, 806~811; Timmons and Fire, Nature 1998, 395, 854; Timmons et al., Gene, 2001, 263, 103~112; Tabara et al., Science, 1998, 282, 430~431; Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998, 95, 15502~15507; Tuschl et al., Genes Dev., 1999, 13, 3191~3197; Elbashir et al., Nature, 2001, 411, 494~498; Elbashir et al., Genes Dev., 2001, 15, 188~200)。例えば、そのような二本鎖部位は、前記標的に対する二本鎖のアンチセンス鎖の古典的ハイブリダイゼーションによって前記標的を阻害し、それによって前記標的の酵素分解を引き起こすと示された(Tijsterman et al., Science, 2002, 295, 694~697)。本発明のオリゴマー化合物は、ドラッグデリバリーおよび標的バリデーションの領域にも適用され得る。本発明は、タンパク質と病状、表現型または状態との間に存在する関連性を解明するためのドラッグデリバリー作用における、本明細書で同定されたオリゴマー化合物および標的の使用を含む。これらの方法は、サンプル、組織、細胞または器官を本発明のオリゴマー化合物と接触させる工程、処理後のある時点で前記標的および/または関連した表現型または化学エンドポイントの核酸またはタンパク質レベルを測定する工程と、選択的に測定値と非処理サンプルまたは本発明の更なるオリゴマー化合物で処理したサンプルを比較する工程とを有する、標的ペプチドを決定する工程または調節する工程を含む。これらの方法は、他の実験と平行してまたは組み合わせて実行され、標的バリデーションの工程で未知遺伝子の機能を決定する、または特定の疾患、状態、または表現型の治療または予防のための標的として特異的遺伝子産物の機能を決定することができる。

【0186】

RNAi活性に対するヌクレオシド修飾の影響は、既存の文献(Elbashir et al., Nature, 2001, 411, 494~498; Nishikura et al., Cell, 2001, 107, 415~416; および Bass et

10

20

30

40

50

a l . , C e l l , 2 0 0 0 , 1 0 1 , 2 3 5 ~ 2 3 8) に従って評価され得る。

【0187】

本発明のオリゴマー化合物は、診断、治療、予防、および研究試薬およびキットとして利用され得る。さらには、精巧な特異性を有して遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の機能を解明するために、または生物学的経路の様々なメンバーの機能を区別するために、当業者によってしばしば使用される。キットおよび診断において使用するために、本発明のオリゴマー化合物は、単独でまたは他のオリゴマー化合物または療法との組み合わせで、細胞および組織内で発現した遺伝子の一部のまたは全体の相補鎖の発現パターンを解明するためのディファレンシャル（差次的）および/またはコンビナトリアル（組み合わせ）解析における手段として使用され得る。

10

【0188】

限定されない1実施例として、1若しくはそれ以上のアンチセンスオリゴマー化合物で処理された細胞または組織内の発現パターンは、アンチセンスオリゴマー化合物で処理されていない対照細胞または組織と比較され、産生された前記パターンは、例えば疾患関連、シグナル経路、細胞性局在、発現レベル、サイズ、検討された遺伝子の構造または機能に関連するような遺伝子発現のディファレンシャルレベルに対して解析される。これらの解析は、発現パターンに影響を及ぼす他の化合物またはオリゴマー化合物の存在下または非存在下で、刺激または未刺激細胞上で実行され得る。

【0189】

本分野では既知である遺伝子発現解析の方法の例としては、DNAアレイまたはマイクロアレイ (Brazma and Vliet, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 17~24; Celis, et al, *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2~16)、SAGE (遺伝子発現の連続解析; serial analysis of gene expression) (Madden, et al., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415~425)、READS (消化cDNAsの制限酵素増幅) (Prashar and Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258~72)、TOGA (総遺伝子発現解析) (Sutcliffe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 1976~81)、タンパク質アレイおよびプロテオミクス (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2~16; Jungblut, et al., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100~10)、発現配列タグ (EST) シークエンシング (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2~16; Larsson, et al., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143~57)、サブトラクティブRNAフィンガープリンティング (SuRP) (Fuchs, et al., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91~98; Larson, et al., *Cytometry*, 2000, 41, 203~208)、サブトラクティブクローニング、ディファレンシャルディスプレイ (DD) (Jurecic and Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316~21)、比較ゲノムハイブリダイゼーション (Carulli, et al., *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286~96)、FISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 技術 (Going and Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895~904) および質量分析法 (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235~41) を含む。

20

30

40

【0190】

本発明のオリゴマー化合物は、タンパク質をコード化する核酸とハイブリダイズするので、1観点において研究および診断に有用である。例えば、そのような効率性を有し、効果的なタンパク質阻害剤となると本明細書で開示されたような条件下でハイブリダイズすると示されたオリゴヌクレオチドは、好都合な遺伝子増幅または検出の条件下でそれぞれ効

50

果的なプライマーまたはプローブでもある。これらのプライマーおよびプローブは、タンパク質をコード化する核酸分子の特異的な検出を必要とする方法において、および更なる研究における検出または使用に対する核酸分子の増幅において有用である。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、特に核酸に対する本発明のプライマーおよびプローブは、本分野で既知である手段によって検出され得る。そのような手段はオリゴヌクレオチドへの酵素共役、前記オリゴヌクレオチドの放射線ラベル、または他のあらゆる最適な検出手段を含む。サンプル内の選択されたタンパク質のレベルを検出するためのそのような検出手段を用いるキットも調合される。

【0191】

アンチセンスの特異性および感受性も、治療用途に対して本分野の当業者によって利用される。アンチセンスオリゴマー化合物は、ヒトを含む動物における病状の治療における治療部分として利用されていた。リボザイムを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド薬剤は、ヒトに対して安全で効果的に投与されており、たくさんの治験が現在進行中である。従って、アンチセンスオリゴマー化合物は、細胞、組織、および動物（特にヒト）の治療に対する治療投与計画において有用であるように設定される、有用な治療モダリティとなり得ると確定された。

10

【0192】

本明細書において使用されるように「患者」という用語は、1若しくはそれ以上の遺伝子の発現または過剰発現に関連した1若しくはそれ以上の障害を患った哺乳類を意味する。さらに、本発明は特に1若しくはそれ以上の哺乳類発現または過剰発現の阻害に関するものであることも理解される。本発明は特に哺乳類の1若しくはそれ以上の遺伝子の発現または過剰発現の阻害に関連するものであることも理解される。

20

【0193】

本分野の当業者は、前記障害を現在患った患者を本発明の1若しくはそれ以上のオリゴマー化合物または組成物の有効な量で治療することによって遺伝子の発現または過剰発現に関連した障害に影響を及ぼすことを理解する。従って、「治療」および「治療する」という用語は、全ての工程を意味することを意図しており、これには本明細書に記載された前記障害の進行を遅延、中断、抑止、調節、または停止する工程が含まれるが、全ての症状の完全な除去を意図する必要はない。

【0194】

本明細書において使用されるように本発明の化合物の「有効な量」または「治療上有効な量」という用語は、本明細書に記載された前記障害を治療または予防するのに有効な量を意味している。

30

【0195】

治療用に、遺伝子の発現を調節することによって治療され得る病気または障害を患っている疑いがあるヒトなどの患者は、本発明に従ってアンチセンスオリゴマー化合物を投与することによって治療される。本発明の化合物は、アンチセンスオリゴマー化合物の有効な量を適切な薬学的に許容可能な希釈剤または担体に添加することによって薬学的組成物において利用され得る。本発明のアンチセンスオリゴマー化合物および方法の使用は、例えば、感染、炎症または腫瘍形成を妨げるまたは遅らせるようになど、予防的にも有用である。いくつかの実施形態において、治療される患者は、そのような治療を必要とするとして同定されていた、またはそのように以前診断されていた。

40

【0196】

本発明のオリゴマー化合物は、あらゆる薬学的に許容可能な塩類、エステル、またはそのようなエステルの塩類、またはヒトを含む動物への投与で生物活性代謝産物またはそれらの残留物を（直接的または間接的に）提供することができる他の化合物を含む。従って、本明細書の開示には、例えば本発明の化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容可能な塩類、そのようなプロドラッグの薬学的に許容可能な塩類、および他の生物学的同等物も記載されている。オリゴヌクレオチドに対して、薬学的に許容可能な塩類およびそれらの使用の例については、さらに米国特許番号第6,287,860号に記載されている。

50

【0197】

本発明の組成物は、例えばリポソーム、受容体標的分子、経口、直腸、局所的または取り込み、分配および/または吸収を補助するための他の処方として、他の分子、分子構造または化合物の混合物と混合される、封入される、共役される、または関連する。そのような取り込み、分配および/または吸収補助処方の調合を教示する代表的な米国特許は、これに限定されるものではないが、米国特許番号第5,108,921号明細書；第5,354,844号明細書；第5,416,016号明細書；第5,459,127号明細書；第5,521,291号明細書；第5,543,158号明細書；第5,547,932号明細書；第5,583,020号明細書；第5,591,721号明細書；第4,426,330号明細書；第4,534,899号明細書；第5,013,556号明細書；第5,108,921号明細書；第5,213,804号明細書；第5,227,170号明細書；第5,264,221号明細書；第5,356,633号明細書；第5,395,619号明細書；第5,416,016号明細書；第5,417,978号明細書；第5,462,854号明細書；第5,469,854号明細書；第5,512,295号明細書；第5,527,528号明細書；第5,534,259号明細書；第5,543,152号明細書；第5,556,948号明細書；第5,580,575号明細書；および第5,595,756号明細書を含む。

10

【0198】

本発明は、薬学的組成物および本発明の組成物を含む処方も含む。本発明の薬学的組成物は、局所的または全身的治療のどちらが望ましいか、および治療される領域に依存して、多くの方法で投与される。投与は、局所的（膣および直腸運搬を含む眼および粘膜を含む）、例えば、噴霧器によるもの含む粉末またはエアロゾルの吸入またはガス注入による肺性；気管内、鼻腔内、上皮、および経皮、経口的または非経口的である。非経口的投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内注射または注入；または頭蓋内（例えばくも膜下腔内または脳室内）投与を含む。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると信じられている。局所的投与に対する薬学的組成物および処方は、経皮的パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、飴、坐薬、スプレー、液体および粉末を含む。通常薬学的担体、水溶液、粉末または油性基剤、増粘剤、およびそれらの同等物は、必要であるまたは望ましい。コーティングコンドーム、グローブ、およびそれらの同等物も有用である。

20

30

【0199】

本発明の薬学的組成物は、これに限定されるものではないが、溶液、乳濁剤、発泡剤、およびリポソーム含有処方を含む。本発明の薬学的組成物および処方は、1若しくはそれ以上の浸透増強剤、担体、賦形剤、または他の活性または不活性成分を有する。

【0200】

当業者は、処方はそれらの意図された使用、すなわち投与の経路に従ってルーティンに設計される。

【0201】

局所投与に対して適切な処方は、本発明のオリゴヌクレオチドが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化因子および界面活性剤などの局所的運搬因子と混合される処方を含む。適切な脂質およびリポソームは、中性（例えば、ジオレオイルフォスファチジルD O P E エタノールアミン、ジミリストイルフォスファチジルコリンD M P C、ジステアロイルフォスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルフォスファチジルグリセロールD M P G）、およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルD O T A PおよびジオレオイルフォスファチジルエタノールアミンD O T M A）を含む。浸透増強剤およびそれらの使用はさらに、米国特許番号第6,287,860号に開示されている。界面活性剤およびそれらの使用はさらに米国特許番号第6,287,860号に開示されている。

40

【0202】

経口投与に対する組成物および処方は、粉末または顆粒、微粒子、ナノ粒子、水または

50

非水溶性溶媒における懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、小袋、錠剤または微小錠剤を含む。増粘剤、香料添加物、希釈剤、乳濁剤、分散補助剤、または結合剤は望ましい。適切な経口処方、本発明のオリゴヌクレオチドが1若しくはそれ以上の浸透増強剤、界面活性剤、キレート剤との組み合わせで投与される処方である。適切な界面活性剤は、脂肪酸および/またはエステルまたはそれらの塩類、胆汁酸および/またはその塩類を含む。適切な胆汁酸/塩類および脂肪酸およびそれらの使用はさらに米国特許番号第6,287,860号に記載されている。例えば、胆汁酸/塩類との組み合わせでの脂肪酸/塩類などの浸透増強剤の組み合わせも適切である。特に適切な組み合わせは、ラウリル酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。更なる浸透増強剤は、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルを含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥粒子を含む顆粒状形態で、または微小顆粒またはナノ顆粒を形成するような複合体で経口的に運搬される。オリゴヌクレオチド複合体因子およびそれらの使用はさらに、米国特許番号第6,287,860号に開示されている。オリゴヌクレオチドのための経口処方およびそれらの調合は、米国出願番号第09/108,673号(1998年8月1日出願)、第09/315,298号(1999年5月20日出願)、および第10/071,822号(2002年2月8日出願)に詳細に記載されている。

10

【0203】

別の関連する実施例において、治療上有効な併用療法は、2またはそれ以上の本発明の組成物の使用を含み、複数の組成物は単一または複数の核酸標的を標的化しているものである。アンチセンスオリゴマー化合物多くの実施例は本分野では既知である。2またはそれ以上の併用化合物は、一緒にまたは経時的に使用される。

20

【0204】

薬学的組成物の処方およびそれに続く投与は、本分野の当業者の範囲内であると信じられている。用量は、何日から何ヶ月にも亘る治療の経過での、または治療が効果を表すまたは前記病状の減少が達成されるまでの、治療される病状の重症度および反応性に依存する。最適投薬スケジュールは、患者の体内における薬剤蓄積の測定から計算され得る。当業者は最適用量、投薬方法論、および回復率を簡単に決定できる。最適な用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的有効性に依存して変更され、一般的に*in vitro*および*in vivo*動物モデルにおいて有効であると見出されたEC₅₀に基づいて推定され得る。一般的に、用量は0.01 μg ~ 100 g/kg体重であり、1日、1週間、1ヵ月、または1年に1回以上投与される。本分野の当業者は、体液または組織における前記薬剤の測定滞留時間および濃度に基づいて、投薬の回復率を簡単に推定できる。成功した治療に続いて、患者が病状の再発を予防するための維持治療を受けることが望ましく、前記オリゴヌクレオチドは0.01 μg ~ 100 g/kg体重の範囲で1日、1週間、1ヵ月、または1年に1回以上、維持用量で投与される。二本鎖化合物に対して、前記用量は、前記二本鎖の増加した核酸負荷(2つの分離鎖を有する化合物と同様に)、または付加的核酸長(二本鎖領域を保持する自己相補性一本鎖と同様に)を計上するために計算されなくてはならない。

30

【0205】

本発明はその特定の実施例に従った特異性をもって記載されたが、以下の実施例は本発明を説明するためだけに利用され、同じように限定されることを意図するものではない。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0206】

実施例

概要

実施例において記載した配列は、修飾ヌクレオシドまたはインターヌクレオシド結合がある場所を指示するように注釈が付けられている。全ての注釈のないヌクレオシドは、ホスホジエステルインターヌクレオシド結合によって結合された-D-リボヌクレオシドである。ホスホチオエートインターヌクレオシド結合は、下線によって指示されている。

50

修飾ヌクレオシドはヌクレオシドを指示する大文字の次の下付き文字によって指示されている。特に、下付きの「f」は2-フルオロを指示しており；下付きの「m」は2'-O-メチルを指示しており；下付きの「l」はLNAを指示しており；下付きの「e」は2-O-メトキシエチル(MOE)を指示しており；下付きの「t」は4'-チオを指示している。例えば、 U_m は2-OCH₃基を保持する修飾ウリジンである。'ヌクレオシドの前の「d」は、例えばdTはデオキシチミジンといったように、デオキシヌクレオシドを指示する。5'-リン酸機を保持する鎖のいくつかは「P-」として指定された。太字およびイタリック体「C」は、5-メチルCリボヌクレオシドを意味している。化合物のISIS数の次に記載された「as」はアンチセンス鎖を意味し、「s」は前記標的配列に対して二本鎖のセンス鎖を指定している。

10

【実施例1】

【0207】

ヌクレオシドホスホラミダイトの合成

ヌクレオシドホスホラミダイトの調合は、これに限定されるものではないが米国特許番号第6,426,220号明細書および国際公開公報番号第WO02/36743号などの本分野で広範囲に説明されている手順に従って実行される。

【実施例2】

【0208】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオシド合成

本発明に従って使用されたオリゴマー化合物は、固相合成のよく知られた技術によって都合よくおよびルーティンに製造する。そのような合成のための装置は、例えばApplied Biosystems (Foster City, CA)などを含むいくつかの製造供給元によって販売されている。本分野で既知なそのような合成に対するあらゆる他の手段を、付加的にまたは代替的に利用する。ホスホチオエートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調合するための同様な技術を使用することはよく知られている。

20

【0209】

オリゴヌクレオチド：非置換および置換ホスホジエステル(P=O)オリゴヌクレオチドは、ヨードによって酸化された標準ホスホラミダイト化学を用いて自動DNA合成機(Applied Biosystemsモデル394)上で合成した。

30

【0210】

ホスホチオエート(P=S)は、以下の例外：チオール化(thiation)はリン酸結合の酸化のためにアセトニトリル中で3, H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシドの10% w/v溶液を利用することによって影響を受けることを除いて、ホスホジエステルオリゴヌクレオチドと同様に合成した。チオール化反応工程時間を180秒まで増加し、正常キャッピング工程を先行させた。CPGカラムから切断し、55 (12~16時間)で濃縮アンモニア水酸化物によって非ブロック化した後、前記オリゴヌクレオチドは、1M NH₄OAc溶液からエタノールの3倍以上の容量での沈殿させることで回収した。ホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第5,508,270号明細書に記載されたように調合した。

40

【0211】

アルキルホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第4,469,863号明細書に記載されたように調合した。

【0212】

3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネートオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第5,610,289号、または第5,625,050号に記載されたように調合した。

【0213】

ホスホラミダイトオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第5,256,775号或いは米国特許番号第5,366,878号明細書に開示されたように調合した。

【0214】

50

アルキルホスホノチオエートオリゴヌクレオチドは、国際出願番号第 P C T / U S 9 4 / 0 0 9 0 2 号および第 P C T / U S 9 3 / 0 6 9 7 6 号（それぞれ国際公開公報番号第 W O 9 4 / 1 7 0 9 3 号および第 W O 9 4 / 0 2 4 9 9 号として公開された）に記載されたように調合した。

【 0 2 1 5 】

3' - デオキシ - 3' - アミノホスホラミダイトオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第 5 , 4 7 6 , 9 2 5 号に記載されたように調合した。

【 0 2 1 6 】

ホスホトリエステルオリゴヌクレオチドは、米国特許番号第 5 , 0 2 3 , 2 4 3 号明細書に記載されたように調合した。

【 0 2 1 7 】

ボラノリン酸オリゴヌクレオチドは、米国特許番号第 5 , 1 3 0 , 3 0 2 号明細書及び米国特許番号第 5 , 1 7 7 , 1 9 8 号明細書に記載されたように調合した。

【 0 2 1 8 】

オリゴヌクレオシド：メチレンメチルイミノ結合オリゴヌクレオシド（ M M I 結合オリゴヌクレオシドとしても同定される）、メチレンジメチルヒドロゾ結合オリゴヌクレオシド（ M D H 結合オリゴヌクレオシドとしても同定される）、およびメチレンカルボニルアミノ結合オリゴヌクレオシド（アミド - 3 結合オリゴヌクレオシドとしても同定される）、およびメチレンアミノカルボニル結合オリゴヌクレオシド（アミド - 4 結合オリゴヌクレオシドとしても同定される）、さらには、例えば交互 M M I および P = O または P = S 結合を保持する混合バックボーンオリゴマー化合物は、米国特許番号第 5 , 3 7 8 , 8 2 5 号明細書、第 5 , 3 8 6 , 0 2 3 号明細書、第 5 , 4 8 9 , 6 7 7 号明細書、第 5 , 6 0 2 , 2 4 0 号、及び第 5 , 6 1 0 , 2 8 9 号明細書に記載されたように調合した。

【 0 2 1 9 】

ホルムアセタール及びチオホルムアセタール結合オリゴヌクレオシドは、米国特許番号第 5 , 2 6 4 , 5 6 2 号明細書及び第 5 , 2 6 4 , 5 6 4 号明細書に記載されたように調合される。

【 0 2 2 0 】

エチレンオキシド結合オリゴヌクレオシドは、米国特許番号第 5 , 2 2 3 , 6 1 8 号明細書に記載されたように調合した。

【 実施例 3 】

【 0 2 2 1 】

オリゴヌクレオチド単離

制御孔ガラス固体支持体から切断し、55 で 1 2 ~ 1 6 時間、濃縮アンモニウムヒドロキシドにおいて非ブロック化した後、前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオシドは、1 M NH_4OAc からエタノールの 3 倍以上の容量で沈殿させることによって回収した。合成オリゴヌクレオチドはエレクトロスプレー質量分析（分子量決定）によって、および毛細管下ゲル電気泳動法によって解析し、少なくとも 7 0 % 完全長物質となることを判断した。合成において獲得したホスホロチオエートおよびホスホジエステル結合の相対量は、- 1 6 a m u 産物（+ / - 3 2 + / - 4 8）に対する正確な分子量の割合によって決定した。いくつかの研究に対して、オリゴヌクレオチドは、Chiang et al., J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162 ~ 18171 に記載されたように、HPLC によって精製した。HPLC 精製物質で得られた結果は、非 HPLC 精製物質で得られた結果と同じであった。

【 実施例 4 】

【 0 2 2 2 】

オリゴヌクレオチド合成 - 9 6 ウェルプレート形式

オリゴヌクレオチドは、9 6 ウェル形式において同時に 9 6 配列を構築することができる自動合成機上の固相 P (I I I) ホスホラミダイト化学を介して合成できる。ホスホジエステルインターヌクレオチド結合は、水溶性ヨードでの酸化によって産生した。ホスホ

10

20

30

40

50

ロチオエートインターヌクレオチド結合は、無水アセトニトリル中で3, H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド (Beaucage 試薬) を利用した硫化によって産生した。標準的塩基保護性ベータ-シアノエチル-ジイソ-プロピルホスホラミダイトは商業的製造供給元 (例えば、PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州 Foster City、または Pharmacia、ニュージャージー州 Piscataway) から購入した。非標準的ヌクレオチドは、標準的または特許化された方法のように合成した。それらは塩基保護性ベータ-シアノエチルジイソプロピルホスホラミダイトとして利用した。

【0223】

オリゴヌクレオチドは支持体から切断し、上昇温度 (55 ~ 60) で12 ~ 16時間、濃縮NH₄OHで脱保護化し、放出産物を次に *in vacuo* で乾燥した。乾燥した産物を次に蒸留水に再懸濁し、マスタープレートを作り、全ての解析およびテストプレートサンプルはロボットピペットを利用してそのプレートから希釈した。 10

【実施例5】

【0224】

96ウェルプレート形式を使用したオリゴヌクレオチド解析

各ウェルのオリゴヌクレオチドの濃度はサンプルの希釈およびUV吸収分光法によって推定した。個々の産物の完全長整合性は、96ウェルプレート形式 (Beckman P/A CE (商標) MDQ) において、または商業的CE装置 (例えば、Beckman P/A CE (商標) 5000、ABI 270) などで個々に調合されたサンプルに対して、キャピラリー電気泳動法 (CE) によって評価した。塩基およびバックボーン組成物は、エレクトロスプレー-質量分析法を利用したオリゴマー化合物の質量解析によって確認した。全てのアッセイテストプレートは、単一および複数チャンネルロボットピペットを使用してマスタープレートから希釈した。プレート上の少なくとも85%のオリゴマー化合物が少なくとも85%完全長である条件を満たしているか、プレートを判断した。 20

【実施例6】

【0225】

細胞培養およびオリゴヌクレオチド処理

標的核酸発現に対するオリゴマー化合物の効果は、前記標的核酸が測定可能レベルで存在する場合、あらゆる様々な細胞タイプでテストすることができる。これは例えばPCR またはノーザンブロット解析などを用いてルーティンに決定することができる。複数の組織および種に由来した細胞株はアメリカ培養細胞系統保存機関 (ACTT, バージニア州 Manassas) から入手することができる。 30

【0226】

以下の細胞タイプは説明の目的のために提供されるものであり、前記標的が選択された細胞タイプで発現している場合他の細胞タイプもルーティンに使用される。これは、例えばノーザンブロット解析、リボヌクレアーゼ保護アッセイまたはRT-PCRなどの本分野のルーティンな方法によって容易に決定することができる。

【0227】

T-24細胞: ヒト移行細胞膀胱癌細胞株T-24は、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ACTT) (バージニア州 Manassas) から入手した。T-24細胞は、10% ウシ胎児血清 (FCS) (Invitrogen Corporation, カリフォルニア州 Carlsbad)、ペニシリン100ユニット/mL、およびストレプトマイシン100マイクログラム/mL (Invitrogen Corporation, カリフォルニア州 Carlsbad) を添加した完全Mc'Coys 5A基本培養液 (Invitrogen Corporation, カリフォルニア州 Carlsbad) 中でルーティンに培養した。細胞は90%コンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、7000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート (Falcon-Primaria #353872) に播種した。 40

【0228】

A549細胞：ヒト肺癌細胞株A549は、アメリカ培養細胞系統保存機関（ACTT）（バージニア州Manassas）から入手した。A549細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）、100ユニット/mLのペニシリン、および100マイクログラム/mLのストレプトマイシン（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）を添加した高グルコースDMEM（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）中でルーティンに培養した。細胞は約90%コンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、約5000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート（Falcon-Primaria#3872）に播種した。 10

【0229】

b.END細胞：マウス脳上皮細胞株b.ENDは、Max Planck Institute（Bad Nauheim, Germany）のWerner Risau博士より入手した。b.END細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）を添加した高グルコースDMEM（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）中でルーティンに培養した。細胞は約90%コンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、約3000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート（Falcon-Primaria#353872、BD Biosciences、マサチューセッツ州Bedford）に播種した。 20

【0230】

HeLa細胞：ヒト上皮癌細胞HeLaは、アメリカ培養細胞系統保存機関（ACTT）（バージニア州Manassas）から入手した。HeLa細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）を添加した高グルコースDMEM（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）中でルーティンに培養した。細胞は約90%コンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、50,000細胞/ウェルの密度で24ウェルプレート（Falcon-Primaria#3846、BD Biosciences、マサチューセッツ州Bedford）、または約5,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。 30

【0231】

MH-S細胞：マウス肺胞マクロファージ細胞株は、アメリカ培養細胞系統保存機関（ACTT）（バージニア州Manassas）から入手した。MH-S細胞は、10%ウシ胎児血清（FBS）（Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび10mM HEPES（全ての添加物はInvitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbadより購入）を添加したRPMI培養液1640中で培養した。細胞は約70~80%コンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、6500細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート（Falcon-Primaria#353047、BD Biosciences、マサチューセッツ州Bedford）に播種した。 40

【0232】

U-87MG：ヒトグリア芽細胞種U-87MG細胞株は、アメリカ培養細胞系統保存機関（ACTT）（バージニア州Manassas）から入手した。U-87MG細胞は 50

、10%ウシ胎児血清(FBS)(Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad)および抗生物質を添加したDMEM(Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad)中で培養した。細胞は適切なコンフルエンスに達した場合、トリプシン処理によってルーティンに継代し希釈した。細胞は、これに限定されるものではないが、オリゴマー化合物形質移入実験を含む使用に対して、約10,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート(Falcon-Primaria#3872)に播種した。

【0233】

オリゴマー化合物での細胞の処理に関連する実験は：

細胞が適切なコンフルエンスに達した場合、その細胞を記載されたような形質移入方法を用いてオリゴマー化合物で処理した。 10

【0234】

LIPOFECTIN(商標)

細胞が65~75%のコンフルエンスに達した場合、その細胞をオリゴヌクレオチドで処理した。オリゴヌクレオチドは、Opti-MEM(商標)-1低減血清培養液(Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad)中のLIPOFECTIN(商標)(Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad)と混合し、望ましい濃度のオリゴヌクレオチド、および100nMオリゴヌクレオチド当たり2.5または3µg/mLのLIPOFECTIN(商標)濃度を達成した。この形質移入混合物は室温で約0.5時間インキュベートした。96ウェルプレートにおいて細胞を増殖させる場合、ウェルは100µLのOpti-MEM(商標)-1で一度洗浄し、次に130µLの前記形質移入混合物で処理した。24ウェルプレートまたは他の標準的組織培養プレートで増殖させた細胞は、培養液およびオリゴヌクレオチドの適切な容量を用いて、同様に処理した。細胞を処理し、データは二つ組または三つ組で取得した。37での処理の約4~7時間後、前記形質移入混合物を含有した培養液は新鮮な培養液と交換した。細胞はオリゴヌクレオチド処理後16~24時間で回収した。 20

【0235】

本分野で既知である他の適切な形質移入試薬は、これに限定されるものではないが、CYTOFECTIN(商標)、LIPOFECTAMINE(商標)、OLIGOFECTAMINE(商標)、およびFUGENE(商標)を含む。本分野で既知である他の適切な形質移入方法は、これに限定されるものではないが、電気穿孔法を含む。 30

【0236】

使用されたオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株から細胞株で変更した。特定の細胞株に対する最適な折後ヌクレオチド濃度を決定するために、前記細胞株を様々な濃度範囲のポジティブ対照オリゴヌクレオチドで処理した。ヒト細胞に対するポジティブ対照オリゴヌクレオチドは、ヒトH-rasを標的化したISIS13920(T_eC_eC_eGTCATCGCTC_eC_eT_eC_eA_eG_eG_eG_e、配列ID番号:1)、またはヒトJun-N-末端キナーゼ-2(JNK2)を標的化したISIS18078(G_eT_eG_eC_eG_eCGCGAGCCCG_eA_eA_eA_eT_eC_e、配列ID番号:2)から選択した。両対照は、ホスホロチオエートバックボーンを有する2'-O-メトキシエチルギャップマーである。マウスまたはラット細胞に対しては、前記ポジティブ対照オリゴヌクレオチドは、ISIS15770(A_eT_eG_eC_eA_eTTCTGCCCCCA_eA_eG_eG_eA_e、配列ID番号:3)であり、これはマウスおよびラットc-rasの両方を標的化したホスホロチオエートバックボーンを有する2'-O-メトキシエチルギャップマーである。c-H-ras(ISIS13920に対する)、JNK2(ISIS18078に対する)、またはc-ras(ISIS15770に対する)mRNAの80%阻害を生じるポジティブ対照オリゴオリゴヌクレオチドの濃度は次に、その細胞株の一連の実験における新しいオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として使用した。80%阻害が達成されなかった場合、c-H-ras、JNK2、またはc-rasmRNAの 40 50

60%阻害を生じるポジティブ対照オリゴオリゴヌクレオチドの最低濃度を次に、その細胞株の一連の実験におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として使用した。60%阻害が達成されなかった場合、その特定の細胞株はオリゴヌクレオチド形質移入実験に対して不適切であるとみなした。

【実施例7】

【0237】

標的発現のオリゴヌクレオチド阻害の解析

標的発現のアンチセンス調節は、本分野で既知である様々な方法でアッセイすることができる。例えば、標的mRNAレベルは、例えばノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、またはリアルタイムPCRなどによって定量化することができる。リアルタイム定量化PCRは現在望ましい。RNA解析は総細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAで実施することができる。本発明のRNA解析の1つの方法は、本明細書の他の実施例に記載されたような総細胞RNAの使用である。RNA単離の方法は本分野でよく知られている。ノーザンブロット解析も本分野ではルーティンである。リアルタイム定量化(PCR)は商業的に利用可能なABI PRISM(商標)7600、7700、または7900配列検出システム(PE-Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster Cityから利用可能)を用いて都合よく達成することができ、製造業者の取扱い説明書に従って使用した。

10

【0238】

標的のタンパク質レベルは、免疫沈降、ウェスタンブロット解析(免疫ブロッティング)、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、または蛍光標示式細胞分取器(FACS)などの本分野で既知である様々な方法で定量化することができる。標的を検出する抗体は、抗体のMSRSカタログ(Aerie Corporation, Birmingham, MI)などの様々なソースから同定および入手可能である、または本分野では既知であるモノクローナルまたはポリクローナル抗体産生方法を介して調合することができる。ポリクローナル抗血清を調合する方法は、例えばAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 11.12.1~11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997において教示されている。モノクローナル抗体の調合は、例えばAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 11.4.1~11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997において教示されている。

20

30

【0239】

免疫沈降方法は本分野で標準的であり、例えばAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.16.1~10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998に見出され得る。ウェスタンブロット(免疫ブロット)解析は本分野では標準的であり、例えばAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 10.8.1~10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997に見出され得る。酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)は本分野では標準的であり、例えばAusubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, pp. 11.2.1~11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991に見出され得る。

40

【実施例8】

【0240】

標的阻害剤の使用のための表現型アッセイおよびin vivo研究のデザイン
表現型アッセイ

50

標的阻害剤を本明細書で開示された方法によって同定した場合、前記オリゴマー化合物はさらに1若しくはそれ以上の表現型アッセイで検討し、それぞれは特定の病状または状態の治療において有効であると予想する測定可能なエンドポイントを有している。

【0241】

それらの使用に対する表現型アッセイ、キットおよび試薬は、本分野の当業者によく知られており、健康および病気における標的の役割および/または関連性を検討するために本明細書で使用した。代表的な表現型アッセイはいくつかの商業的製造供給元のあらゆる1つから購入することができ、細胞生存能、細胞毒性、増殖または細胞生存 (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, マサチューセッツ州 Boston)、酵素アッセイ (Panvera, LLC, ウィスコンシン州 Madison; BD Biosciences, ニュージャージー州 Franklin Lakes; Oncogene Research Products, カリフォルニア州 San Diego) を含むタンパク質ベースアッセイ、細胞調節、シグナル伝達、炎症、酸化工程およびアポトーシス (Assay Designs Inc., ミシガン州 Ann Arbor)、血管新生アッセイ、管腔形成アッセイ、サイトカインおよびホルモンアッセイおよび代謝アッセイ (Chemicon International Inc., カリフォルニア州 Temecula; Amersham Biosciences, ニュージャージー州 Piscataway) を決定する方法を含む。

10

【0242】

制限のない1実施例において、特定の表現アッセイに対して適切であると決定された細胞 (すなわち、MCF-7細胞は乳癌研究のために選択され; 脂肪細胞は肥満研究のために選択される) は、*in vitro* 研究から同定された標的阻害剤、および上述の方法によって決定された最適な濃度の対照化合物で処理した。処理期間の最後で、処理および未処理細胞を、表現型結果およびエンドポイントを決定するためのアッセイに特異的な1若しくはそれ以上の方法で解析した。

20

【0243】

表現型エンドポイントは、長時間の細胞形態の変化、またはタンパク質、脂質、核酸、ホルモン、糖類、または金属類などの細胞成分のレベルにおける変化と同様に処理用量を含む。pH、細胞周期の段階、細胞による生物学的指標の取り込みまたは排出を含む細胞状態の測定も目的のエンドポイントである。

30

【0244】

処理後における細胞の遺伝子の1若しくはそれ以上の発現の測定は、標的阻害剤の有効性または効力の指標としても使用した。特徴 (ホールマーク) 遺伝子、または特定の病状、状態または表現型に関連すると予想される遺伝子を処理および未処理細胞の両方において測定した。

【0245】

In vivo 研究

本明細書で記載される *in vivo* 研究の個々の対象は、ヒトを含む温血脊椎動物である。

【0246】

個人が不必要なリスクを負わないこと、およびその研究における彼らの役割について完全に通知されていることを確実にするように、治験は厳密に制御されている。

40

【0247】

受ける治療の生物心理学的な効果を明らかにするために、ボランティアはプラセボまたは標的阻害剤をランダムに与えられた。さらに、医師が治療に対する偏見を持たないように、彼らが施す治療が標的阻害剤かプラセボかは通知しなかった。このランダムアプローチを使用して、各ボランティアは新しい治療またはプラセボのどちらかを受ける同じ機会を保持することになった。

【0248】

ボランティアは、指示病状または状態に関連した生物学的パラメーターを最初 (あらゆ

50

る治療前の基準測定)、終了(最後の治療後)、および研究期間に定期的に測定しながら、標的阻害剤またはプラセボを8週間投与した。そのような測定は、治療前レベルと比較した標的をコード化する核酸分子のレベル、または体液、組織または器官における標的タンパク質レベルを含む。他の測定は、これに限定されるものではないが、治療される病状または状態の指標、体重、血圧、病気または毒性の薬理学的指標の血清力価、さらにはADME(吸収、分配、代謝および排出)測定を含む。

【0249】

各患者に対して記録された情報は、年齢(歳)、性別、身長(cm)、病状または状態の家族歴(はい/いいえ)、動機付け評点(少し/中程度/大いに)、および指示病状または状態に対する以前の治療投与計画の数およびタイプを含む。

10

【0250】

この研究に参加したボランティアは、健康な成人(18~65歳)であり、この研究に参加した男女の数はほぼ同数である。特定の特徴を有するボランティアは、プラセボおよび標的阻害剤治療に同等に振り分けられた。一般的に、プラセボで治療されたボランティアは治療に対する反応はほとんどないまたは全くなかったが、標的阻害剤で治療されたボランティアはこの研究の終わりでは、彼らの病状または状態の指標にポジティブ傾向が見られた。

【実施例9】

【0251】

RNA単離

20

ポリ(A)+mRNA単離

ポリ(A)+mRNAは、Miuraら(Clin. Chem., 1996, 42, 1758~1764)に従って単離した。ポリ(A)+mRNA単離のための他の方法は、本分野ではルーティンである。簡潔には、96ウェルでの細胞増殖に対して増殖培養液を細胞から除去し、各ウェルを200 μ L冷PBSで洗浄した。60 μ Lの溶解バッファー(10mM Tris-HCl(pH7.6)、1mM EDTA、0.5M NaCl、0.5% NP-40、20mM バナジル-リボヌクレオシド複合体)を各ウェルに添加し、そのプレートを穏やかに攪拌し、次に5分間室温でインキュベートした。55 μ Lの溶解液をOligo d(T)コーティング96ウェルプレート(AGCT Inc. カリフォルニア州Irvine)へ移した。プレートを60分間室温でインキュベートし、200 μ Lの洗浄バッファー(10mM Tris-HCl(pH7.6)、1mM EDTA、0.3M NaCl)で3回洗浄した。最後の洗浄後、過剰な洗浄バッファーを除去するためにそのプレートをペーパータオルで拭き、次に5分間空気乾燥した。70に予め加熱した60 μ Lの溶出バッファー(5mM Tris-HCl(pH7.6))を各ウェルに添加し、そのプレートを90のホットプレート上で5分間インキュベートし、次に溶出液を新しい96ウェルプレートに移した。

30

【0252】

100mmまたは他の標準的プレート上で増殖した細胞は、適切な用量の全ての溶液を使用して同様に処理した。

【0253】

40

総RNA単離

総RNAは、Qiagen Inc. (カリフォルニア州Valencia)から購入したRNEASY96(商標)キットおよびバッファーを用い、製造者推奨手順に従って単離した。簡潔には、96ウェルで増殖した細胞に対して増殖培養液を細胞から除去し、各ウェルを200 μ L冷PBSで洗浄した。150 μ LのバッファーRLTを各ウェルに添加し、そのプレートを20秒間穏やかに攪拌した。150 μ Lの70%エタノールを各ウェルに添加し、内容物を3回上下にピペティングすることによって混合した。そのサンプルを、廃棄物回収トレイが取り付けられたQIAVAC(商標)マニフォールドに接着され、真空源に接着されたRNEASY96(商標)ウェルプレートへ移した。1分間真空にした。500 μ LのバッファーRW1をRNEASY96(商標)プレートの各ウエ

50

ルに添加し、15分間インキュベートし、再度1分間真空にした。付加的な500 μ LのバッファーRW1をRNEASY96(商標)プレートの各ウェルに添加し、2分間真空にした。1mLのバッファーRPEをRNEASY96(商標)プレートの各ウェルに添加し、90秒間真空にした。バッファーRPE洗浄を繰り返し、付加的に3分間真空にした。そのプレートをQIAVAC(商標)マニフォールドから外し、ペーパータオル上で乾燥させるために拭いた。次にそのプレートを、1.2mL回収チューブを含む回収チューブラックが取り付けられたQIAVAC(商標)マニフォールドに再設置した。RNAを140 μ LのRNaseを含まない水でピペティングし、1分間インキュベートし、3分間真空にすることによって各ウェルへ溶出した。

【0254】

反復ピペティングおよび溶出工程は、QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen Inc. カリフォルニア州Valencia)を用いて自動化された。基本的に、培養プレート上の細胞を溶解した後、そのプレートをピペティング、DNase処理および溶出ステップを実行するロボットデッキへ移した。

【実施例10】

【0255】

二本鎖アンチセンス化合物の設計およびスクリーニング

本発明に従うと、本発明の化合物とそれらの相補鎖を有する一連の核酸二本鎖を設計することができる。前記二本鎖のアンチセンス鎖の核酸塩基配列は、本明細書において記載されたように標的配列を標的化したアンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を有する。前記鎖の末端は、オーバーハングを形成するように1若しくはそれ以上の天然または修飾核酸塩基の付加によって修飾されている。dsRNAのセンス鎖は前記アンチセンス鎖に相補的に設計し合成し、両末端に修飾または付加も含む。例えば、1実施形態においてdsRNA二本鎖の両鎖は中心核酸塩基に対して相補的であり、それぞれは1若しくは両末端にオーバーハングを有する。

【0256】

例えば、配列CGAGAGGCGGACGGGACCG(配列ID番号:20)を持ち、デオキシチミジン(dT)の2核酸塩基オーバーハングを保持するアンチセンス鎖を有する二本鎖は、以下の構造を有するものである。

【0257】

【表2】

cgagagggcggacgggaccgdTdT	アンチセンス鎖	配列ID番号:21
dTdTgctctccgctgccctggc	相補鎖	配列ID番号:22

【0258】

別の実施形態において、同じ配列CGAGAGGCGGACGGGACCG(配列ID番号:20)を有するアンチセンス鎖を有する二本鎖は、以下のような平滑末端(シグナル鎖オーバーハングはない)を用いて調合した。

【0259】

【表3】

cgagagggcggacgggaccg	アンチセンス鎖	配列ID番号:20
gctctccgctgccctggc	相補鎖	配列ID番号:23

【0260】

前記二本鎖のRNA鎖は本明細書で開示された方法によって合成できる、またはDharmacon Research Inc. (コロラド州Lafayette)から購入することができる。合成したら、相補鎖をアニーリングした。一本鎖を一定量化し、50 μ Mの濃度に希釈した。希釈したら、30 μ Lの各鎖を15 μ Lのアニーリングバッファ

10

20

30

40

50

ーの5x溶液と混合した。前記バッファーの最終濃度は100mMアセチル酸カリウム、30mM HEPES-KOH (pH7.4)、および2mM アセチル酸マグネシウムであった。最終用量は75μLであった。この溶液を1分間90 でインキュベートし、15秒間遠心分離した。そのチューブは、dsRNA二本鎖を実験に使用するまで1時間37 で放置した。dsRNA二本鎖の最終濃度は20μMであった。

調合したら、前記二本鎖化合物を、標的mRNAレベルを調節するための能力を評価した。細胞が80%コンフルエンスに達した場合、その細胞を本発明の二本鎖化合物で処理した。96ウェルプレートで増殖した細胞に対してウェルは200μLのOPTI-MEM-1 (商標) 低減血清培養液 (Gibco BRL) で1回洗浄し、5μg/mLのL IPOFECTAMINE 2000 (商標) (Invitrogen Life Te 10
chnologies, カリフォルニア州Carlsbad) および望ましい最終濃度の前記二本鎖アンチセンス化合物を含有した130μLのOPTI-MEM-r (商標) で処理した。処理後約4時間で、前記培養液を新鮮な培養液と交換した。RNAが単離され、標的減少が本明細書に記載されたような定量化リアルタイムPCRによって測定された時点である、処理後16時間で細胞を回収した。

【実施例11】

【0261】

標的mRNAレベルのリアルタイム定量化PCR解析

標的mRNAレベルの定量化はABI PRISM (商標) 7600、7700、または7900配列検出システム (PE-Applied Biosystems, カリ 20
フォルニア州Foster City) を用いたリアルタイム定量化PCRによって、取扱い説明書に従って達成した。これは密閉チューブで非ゲルベースの蛍光検出システムであり、リアルタイム (同時) でのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物の高処理定量化を可能にする。増幅産物はPCRが終了後に定量する標準的なPCRとは対照的に、リアルタイム定量化PCRにおける産物はそれらが蓄積するのに従って定量する。これはPCR反応において、フォワード (順方向) とリバース (逆方向) PCRプライマーとの間に特異的にアニーリングし、2つの蛍光色素を含有するオリゴヌクレオチドプローブを含むこと 30
によって達成される。レポーター色素 (例えば、FAMまたはJOE、PE-Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster City、Operon Technologies Inc. カリフォルニア州Alameda、またはInt 30
egrated DNA Technologies Inc. アイオワ州Coralvilleから入手) を前記プローブの5'末端に結合し、クエンチャー (消光) 色素 (例えば、TAMRA、PE-Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster City、Operon Technologies Inc. カリフォルニア州Alameda、またはInt 30
egrated DNA Technologies Inc. アイオワ州Coralvilleから入手) を前記プローブの3'末端に結合した。記プローブと色素が無傷である場合、レポーター色素発光は近接した3'クエンチャー色素によって消光された。増幅中、前記プローブの標的配列へのアニーリングによ 40
って、Taqポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性によって切断され得る基質が作られた。PCR増幅サイクルの伸長相の間、前記Taqポリメラーゼによる前記プローブの切断によ 40
って、前記プローブの残部から (そしてクエンチャー部位から) のレポーター色素が放出され、配列特異的蛍光シグナルを生成した。各サイクルにおいて、付加的なレポーター色素分子がそれぞれのプローブから切断され、ABI PRISM (商標) 配列検出システムに組み込まれたレーザー光学によって蛍光輝度を定期的にモニタリングした。各アッセイにおいて、未処理対照サンプルからの、mRNAの連続的な希釈を含む一連の平行反応によって、テストサンプルのアンチセンスオリゴヌクレオチド処理後のパーセント阻害を定量化するために使用される標準曲線を算出した。

【0262】

定量化PCR解析の前に、測定される標的遺伝子に特異的なプライマー-プローブセットは、GAPDH増殖反応と「多重化」となる能力を評価した。多重化において、前記標 50

的遺伝子および内部標準遺伝子 GAPDH の両方を単一なサンプルにおいて同時に増幅した。この解析において、未処理細胞から単離された mRNA を連続的に希釈した。各希釈溶液を GAPDH にのみ特異的な、標的遺伝子にのみ（「一重化」）特異的な、または両方（多重化）に特異的なプライマー - プロブセットの存在下で増幅した。PCR 増幅の後、希釈の機能としての GAPDH および標的 mRNA シグナルの標準曲線は、一重化および多重化サンプルの両方から産出した。多重化サンプルから産出された GAPDH および標的シグナルの勾配および相関係数は、一重化サンプルから産出された相対値の 10% 範囲内に収まり、前記標的に特異的なプライマー - プロブセットは多重化とみなした。PCR の他の方法も本分野で知られている。

【0263】

RT および PCR 試薬は Invitrogen Life Technologies (カリフォルニア州 Carlsbad) から購入した。RT、リアルタイム PCR は、30 μ L 総 RNA 溶液 (20 ~ 200 ng) を含有する 20 μ L の PCR カクテル (2.5 x PCR バッファー (MgCl₂ なし)、6.6 mM MgCl₂、375 μ M の各 dATP, dCTP、dCTP および dGTP、375 nM の各フォワードプライマーおよびリバースプライマー、125 nM のプロブ、4 ユニット RNAse 阻害剤、1.25 ユニット PLATINUM (登録商標) Taq、5 ユニット MuLV 逆転写酵素、および 2.5 x の ROX 色素) を 96 ウェルプレートへ添加することによって実行した。RT 反応を 30 分間 48 °C でインキュベーションすることで実行した。PLATINUM (登録商標) Taq を活性化するために 10 分間 95 °C でインキュベートした後、2 ステップ; 95 °C で 15 秒 (変性) の後、60 °C で 1.5 分 (アニーリング/伸長) という PCR プロトコールを 40 サイクル行った。

【0264】

RT、リアルタイム PCR によって得られた遺伝子標的量は、定常的に発現している遺伝子である GAPDH の発現レベルを用いて、または RIBOGREEN (商標) (Molecular Probes, Inc. オレゴン州 Eugene) を用いた総 RNA を定量化することによって規準化した。GAPDH 発現は、標的と同時にまたは別々に供することによってリアルタイム RT - PCR を用いて定量化した。総 RNA は、RiboGreen (商標) RNA 定量試薬 (Molecular Probes, Inc. オレゴン州 Eugene) を用いて定量した。RIBOGREEN (商標) による RNA 定量化の方法は、Jones, L. J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368 ~ 374) において教示されていた。

【0265】

このアッセイにおいて、170 μ L の RIBOGREEN (商標) 作動試薬 (RIBOGREEN (商標) 試薬は 10 mM Tris - HCl、1 mM EDTA (pH 7.5) と 1 : 350 で希釈された) を、30 μ L 精製細胞 RNA 含有の 96 ウェルプレートへピペティングした。そのプレートは 485 nm の励起および 530 nm の発光を示す CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) を用いて解読した。

【実施例 12】

【0266】

標的特異的プライマーおよびプロブ

プロブおよびプライマーは、公開された配列情報を用いて標的配列にハイブリダイズするように設計した。

【0267】

例えば、ヒト PTEN に対しては以下のプライマー - プロブセットを公開された配列情報 (GENBANK (商標) アクセション番号 U92436.1、配列 ID 番号: 4) を用いて設計した。

フォワードプライマー: AATGGCTAAGTGAAAGATGACAAATCAT (配列 ID 番号: 5)

10

20

30

40

50

リバースプライマー：T G C A C A T A T C A T T A C A C C C A G T T C G T (配列 I D 番号：6)

そしてPCRプローブは、

F A M - T T G C A G C A A T T C A C T G T A A A G C T G G A A A G G - T A M R A (配列 I D 番号：7)であり、ここにおいてF A Mは蛍光色素でT A M R Aはクエンチャー色素である。

【0268】

例えば、ヒトサバイビンに対しては以下のプライマー - プローブセットを公開された配列情報 (G E N B A N K (商標) アクセション番号 N M _ 0 0 1 1 6 8 . 1、配列 I D 番号：8)を用いて設計した。

フォワードプライマー：C A C C A C T T C C A G G G T T T A T T C C (配列 I D 番号：9)

リバースプライマー：T G A T C T C C T T T C C T A A G A C A T T G C T (配列 I D 番号：10)

そしてPCRプローブは、

F A M - A C C A G C C T T C C T G T G G G C C C C T - T A M R A (配列 I D 番号：11)であり、ここにおいてF A Mは蛍光色素でT A M R Aはクエンチャー色素である。

【0269】

例えば、ヒト e I F 4 E に対しては以下のプライマー - プローブセットを公開された配列情報 (G E N B A N K (商標) アクセション番号 N M _ 0 0 1 1 6 8 . 1、配列 I D 番号：12)を用いて設計した。

フォワードプライマー：T G G C G A C T G T C G A A C C G (配列 I D 番号：13)

リバースプライマー：A G A T T C C G T T T T C T C C T C T T C T G T A G (配列 I D 番号：14)

そしてPCRプローブは、

F A M - A A A C C A C C C C T A C T C C T A A T C C C C C G - T A M R A (配列 I D 番号：15)であり、ここにおいてF A Mは蛍光色素でT A M R Aはクエンチャー色素である。

【0270】

例えば、マウス e I F 4 E に対しては以下のプライマー - プローブセットを公開された配列情報 (G E N B A N K (商標) アクセション番号 N M _ 0 0 7 9 1 7 . 2、配列 I D 番号：16)を用いて設計した。

フォワードプライマー：A G G A C G G T G G C T G A T C A C A (配列 I D 番号：17)

リバースプライマー：T C T C T A G C C A G A A G C G A T C G A (配列 I D 番号：18)

更にPCRプローブは、

F A M - T G A A C A A G C A G C A G A G A C G G A G T G A - T A M R A (配列 I D 番号：19)であり、ここにおいてF A Mは蛍光色素でT A M R Aはクエンチャー色素である。

【実施例13】

【0271】

標的 mRNA レベルのノーザンプロット解析

アンチセンス処理後18時間で、細胞単層を冷PBSで2回洗浄し、1mLのRNAzol (商標) (TEL-TESTB灯Inc. テキサス州 Friendswood) で溶解した。総RNAは製造者推薦プロトコールに従って調合した。20マイクログラムの総RNAは、MOPSバッファーシステム (AMRESCO, Inc. オハイオ州 Solon) を用いて、1.1%ホルムアルデヒドを含有した1.2%アガロースゲルを介した電気泳動によって分画した。RNAは、ノーザン/サザントランスファーバッファーシステ

10

20

30

40

50

ム (TEL-TEST B 灯 Inc. テキサス州 Friendswood) を用いたオーバナイトキャピラリートランスファーによって、ゲルから HYBOND (商標) - N + ナイロン膜 (Amersham Pharmacia Biotech, ニュージャージー州 Piscataway) へ移した。RNA トランスファーは UV 可視化によって確認した。膜は、STRATALINKER (商標) UV クロスリンカー 2400 (Stratagene, Inc, カリフォルニア州 La Jolla) も用いた UV クロスリングによって固定し、QUICKHYB (商標) ハイブリダイゼーション溶液 (Stratagene, カリフォルニア州 La Jolla) を用いて、厳密な条件での製造者推薦に従ってプローブ化した。

【0272】

10

ヒト標的を検出するために、ヒト標的の特異的プライマー - プローブセットを PCR によって調合した。添加液およびトランスファー効率の差異を規準化するために、膜を帯状にし、ヒトグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (GAPDH) RNA (Clontech, カリフォルニア州 Palo Alto) でプローブ化した。

【0273】

ハイブリダイズされた膜は PHOSPHORIMAGER (商標) および IMAGEQUANT (商標) ソフトウェア V3.3 (Molecular Dynamics, カリフォルニア州 Sunnyvale) を用いて可視化し定量化した。データは未処理対照の GAPDH レベルで規準化した。

【実施例14】

20

【0274】

標的タンパク質レベルのウエスタンブロット解析

ウエスタンブロット解析 (免疫ブロット解析) は、標準的な方法を用いて実行した。細胞はオリゴヌクレオチドヌクレオチド処理後 16 ~ 20 時間で回収し、PBS で 1 回洗浄し、Laemmli バッファー (100 μ l / ウェル) に懸濁し、5 分間煮沸し、16% SDS-PAGE ゲルに添加した。ゲルを 150 V で 1.5 時間流し、ウエスタンブロットティング用の膜へ移した。標的に対して適切な一次抗体、さらに一次抗体に対する放射線標識または蛍光標識した二次抗体と共に使用した。バンドは PHOSPHORIMAGER (商標) (Molecular Dynamics, カリフォルニア州 Sunnyvale) を用いて可視化した。

30

【実施例15】

【0275】

選択された、異なって修飾された siRNA の In vitro アッセイ

公開された配列情報を用いてヒトサイピンを標的化するように設計した、異なって修飾された siRNA 二本鎖を調合し、以下に記載したようにアッセイした。アンチセンス鎖は 4' - チオギャプト鎖として一定にし、3 つの異なるセンス鎖を比較した。前記ヌクレオチドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。

【0276】

【表4】

配列ID番号. /ISIS番号.	組成物 (5' から 3')	特徴
24/353537 (as)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	4'-S ウィング (3/13/3)
25/352512 (s)	G _m G _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A _m	2'-OCH ₃ 完全
25/352513 (s)	GG _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A	2'-OCH ₃ ブロック (1/17/1)
25/352514 (s)	GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A	MOE 交互

10

【0277】

異なって修飾された siRNA 二本鎖は、HeLa 細胞における標的 mRNA レベルを阻害する能力に対してアッセイした。HeLa 細胞に使用した培養方法は ATCC から利用可能であり、例えば www.atcc.org で見ることが出来る。96 ウェルプレートで増殖させた細胞に対して、ウェルを 200 μL の OPTI-MEM-1 低減血清培養液で 1 回洗浄し、12 μg/mL の LIPOFECTIN (商標) (Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州 Carlsbad) および望ましい濃度の dsRNA を含有した 130 μL の OPTI-MEM-1 で処理した。処理の約 5 時間後、培養液は新鮮な培養液と交換した。細胞は、RNA を単離し、以前に記載したように RT-PCR によって標的減少が測定された時点である処理後 16 時間で回収した。用量-反応データは以下に記載した各ペアに対する IC50 を決定するために使用した (アンチセンス: センス)。

20

【0278】

【表5】

コンストラクト	アッセイ/種	標的	IC50 (nM)
353537:352512	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.60192
353537:352513	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.71193
353537:352514	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.48819.

30

【実施例16】

【0279】

MOE 修飾センスおよび 4-チオ (4'-チオ / 2'-OCH₃) ギャップマーアンチセンス鎖を保持する、異なって修飾された siRNA の In vitro アッセイ

本発明に従うと、一連のオリゴマー化合物を合成し、未修飾化合物と比較して、用量の範囲に亘って標的発現を減少させる能力をテストした。テストした前記化合物は、全体にホスホロチオエートインターヌクレオシド結合を保持する、長さ 19 ヌクレオチドであった。

40

【0280】

HeLa 細胞は、本明細書に記載した方法を用いて、0、0.15、1.5、15、および 150 nM の濃度の以下に示したような (前記二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖) 二本鎖オリゴマー化合物 (siRNA コンストラクト) で処理した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。ヒト PTEN の発現レベルは、定量化リアルタイム PCR で決定し、本明細書の他の実施例に記載されたように RIBOGREEN (商標) で規準化した。結果生じる用量-反応曲線は、各ペアに対する IC50 を決定するために使用した。未処理対照のパーセンテージ (% UTC) とし

50

て標的 mRNA レベルに対する各二本鎖の影響も示した。

【 0 2 8 1 】

【 表 6 】

配列ID番号.	組成物 (5' から 3')	IC50	%UTC	
/ISIS 番号.				
26/xxxxxx (as)	<u>UUGUCUCUGGUCCUACUU</u>	0.94	13	
27/xxxxxx (s)	<u>AAGUAAGGACCAGAGACAA</u>			
26/xxxxxx (as)	<u>UUGUCUCUGGUCCUACUU</u>	.055	13	10
27/359351 (s)	<u>A_eA_eG_eUAAGGACCAGAGAC_eA_eA_e</u>			
26/359347 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUACU_tU_t</u>	2.2	25	
27/359551 (s)	<u>A_eA_eG_eUAAGGACCAGAGAC_eA_eA_e</u>			
26/359346 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUAC_mU_mU_m</u>	0.18	11	
27/359351 (s)	<u>A_eA_eG_eUAAGGACCAGAGAC_eA_eA_e</u>			
26/359345 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUACU_tU_t</u>	5.3	18	
27/xxxxxx (s)	<u>AAGUAAGGACCAGAGACAA</u>			
26/359346 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUAC_mU_mU_m</u>	0.73	15	20
27/xxxxxx (s)	<u>AAGUAAGGACCAGAGACAA</u>			
26/359345 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUACU_tU_t</u>	0.49	14	
27/xxxxxx (s)	<u>AA_eGU_eAA_eGG_eAC_eCA_eGA_eGA_eCA_eA</u>			
26/359345 (as)	<u>U_tU_tGUCUCUGGUCCUACU_tU_t</u>	0.55	15	
27/359351 (s)	<u>A_eA_eG_eUAAGGACCAGAGAC_eA_eA_e</u>			

【 0 2 8 2 】

これらのデータから、RNA センス鎖 (5 . 3 の IC 5 0 を保持する 3 5 9 3 4 5 _ 3 4 1 4 0 1) と対をなすアンチセンス鎖における 4 ' - チオギャップマー RNA を含有する二本鎖コンストラクトの活性は、2 ' MOE 修飾を末端上のセンス鎖へ、または RNA との交互立体配置において組み込むことによって改善され得るとということが明らかであった。さらに、交互モチーフを用いることによって、未修飾純粋 RNA コンストラクト (3 4 1 3 9 1 _ 3 4 1 4 0 1 ; 0 . 9 4 の IC 5 0 値を保持する両鎖における RNA) において IC 5 0 値の改善が見られることも明らかであった。

【 実施例 1 7 】

【 0 2 8 3 】

選択された、異なって修飾された siRNA の In vitro アッセイ

選択された siRNA (前記二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖の順で以下に示した) を調合し、様々な用量の前記選択された siRNA で本明細書に記載されたように処理した HeLa 細胞において評価した。mRNA レベルは、本明細書に記載したようにリアルタイム PCR を用いて定量化し、未処理対照レベル (% UTC) と比較した。その IC 5 0 は、使用した濃度の対数に対して規準化した mRNA レベルをプロットすることによって算出された直線回帰方程式を用いて計算した。

【 0 2 8 4 】

【表7】

配列ID番号. 組成物 (5' から 3')	IC50	%UTC	
/ISIS 番号.			
26/359346 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	1.9	10	
27/367287 (s) AAGU _t AAGGAC _t C _t AGAGAC _t AA			
26/359345 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUACU _t U _t	1.7	20	
27/367287 (s) AAGU _t AAGGAC _t C _t AGAGAC _t AA			
26/359345 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUACU _t U _t	0.2	10	10
27/367288 (s) A _t A _t GUAAGGACCAGAGACA _t A _t			
26/359346 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	< 0.1	10	
27/367288 (s) A _t A _t GUAAGGACCAGAGACA _t A _t			
26/359345 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUACU _t U _t	0.5	15	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/359346 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	0.2	11	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/359995 (as)U _m U _t G _m U _t C _m U _t C _m U _t G _m G _t U _m C _t C _m U _t U _m A _t C _m U _t U _m	0.4	17	20
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/359345 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUACU _t U _t	0.2	13	
27/359996 (s) A _m A _t G _m U _t A _m A _t G _m G _t A _m C _t C _m A _t G _m A _t G _m A _t C _m A _t A _m			
26/359346 (as)U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	0.2	13	
27/359996 (s) A _m A _t G _m U _t A _m A _t G _m G _t A _m C _t C _m A _t G _m A _t G _m A _t C _m A _t A _m			
26/361203 (as)UUG _m UCUCU _m GGUCC _m UUACU _m U	<0.1	--	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/361209 (as)UUGU _m CUCUG _m GUCCU _m UACU _m U _m	1.5	--	30
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/361204 (as)UUGU _e CUCUGG _e UCCUUACU _e U	1.5	--	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/361205 (as)UUGUC _e UCUGGUC _e CUUAC _e U _e U _e	2.5	--	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/361206 (as)UUGUC _e U _e CUGGU _e C _e CUUACU _e U _e	--	--	
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/361207 (as)UUGUCU _e C _e UGG _e U _e CCUUAC _e U _e U _e	10.1	--	40
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e			
26/341391 (as)UUGUCUCUGGUCCUUACUU	0.1	--	

【 0 2 8 5 】

【表 8】

27/341401 (s) AAGUAAGGACCAGAGACAA		
26/359979 (as)UUGUC _m UCU _m GGU _m CCU _m UAC _m U _m U _m	--	--
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e		
26/359980 (as)UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCU _m UAC _m U _m U _m	0.2	--
27/359351 (s) A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e		
26/359980 (as)UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCU _m UAC _m U _m U _m	0.1	--
27/361221 (s) A _m A _m G _m UAAGGACCAGAGAC _m A _m A _m		

10

【実施例 18】

【0286】

ヒトサイバインを標的化した修飾 siRNA の In vitro アッセイ

本発明に従うと、一連のオリゴマー化合物を合成し、用量の範囲に亘って標的発現を減少させる能力をテストした。HeLa細胞は、0.0006 nM、0.084 nM、0.16 nM、0.8 nM、4 nM または 20 nM の濃度の以下に示した（二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖）二本鎖オリゴマー化合物（siRNA コンストラクト）で、本明細書に記載した方法を用いて処理した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。ヒトサイバインの発現レベルは本明細書に記載したようにリアルタイムPCRを用いて定量化した。サイバイン mRNA レベルに対する 20 nM 用量の効果は以下のものである。結果は未処理対照 mRNA レベルのパーセンテージとして示した。

20

【0287】

【表9】

配列ID番号, 組成物 (5' から 3')	%UTC	
/ISIS 番号.		
24/343867 (as)UUUGAAAAUGUUGAUCUCC	3	
25/343868 (s) GGAGAUCAACAUUUCAA		
24/352506 (as)UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	2	
25/371314 (s) G _e G _e A _e G _e A _e UCAACAUUUU _e C _e A _e A _e		
24/352506 (as)UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	3	10
25/371316 (s) G _m G _m A _m GAUCAACAUUUUC _m A _m A _m		
24/352506 (as)UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	2	
25/371313 (s) G _e G _e A _e GAUCAACAUUUUC _e A _e A _e		
24/353537 (as)U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	5	
25/371313 (s) G _e G _e A _e GAUCAACAUUUUC _e A _e A _e		
24/353537 (as)U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	5	
25/352514 (s) GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A		
24/353537 (as)U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	6	20
25/371314 (s) G _e G _e A _e G _e A _e UCAACAUUUU _e C _e A _e A _e		
24/353537 (as)U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	5	
25/371315 (s) G _e G _e A _e GAUCAAC _e A _e UUUUC _e A _e A _e		
24/353537 (as)U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	5	
25/371316 (s) G _m G _m A _m GAUCAACAUUUUC _m A _m A _m		
24/353540 (as)U _m U _m U _m GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	3	
25/371313 (s) G _e G _e A _e GAUCAACAUUUUC _e A _e A _e		
24/353540 (as)U _m U _m U _m GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	2	30
25/352514 (s) GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A		
24/353540 (as)U _m U _m U _m GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	3	
25/371314 (s) G _e G _e A _e G _e A _e UCAACAUUUU _e C _e A _e A _e		
24/353540 (as)U _m U _m U _m GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	3	
25/371315 (s) G _e G _e A _e GAUCAAC _e A _e UUUUC _e A _e A _e		
24/353540 (as)U _m U _m U _m GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i	3	
25/371316 (s) G _m G _m A _m GAUCAACAUUUUC _m A _m A _m		
24/368679 (as)U _m U _f U _m G _f A _m A _f A _m A _f U _m G _f U _m U _f G _m A _f U _m C _f U _m C _f C _m	2	40
25/371313 (s) G _e G _e A _e GAUCAACAUUUUC _e A _e A _e		
24/368679 (as)U _m U _f U _m G _f A _m A _f A _m A _f U _m G _f U _m U _f G _m A _f U _m C _f U _m C _f C _m	3	

【 0 2 8 8 】

【表 10】

25/371314 (s) G _e G _e A _e G _e A _e UCAACAUUUUU _e C _e A _e A _e A _e	
24/368679 (as)U _m U _f U _m G _f A _m A _f A _m A _f U _m G _f U _m U _f G _m A _f U _m C _f U _m C _f C _m	3
25/371316 (s) G _m G _m A _m GAUCAACAUUUUUCA _m A _m A _m	
24/352506 (as)UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	12
25/352514 (s) GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e JU _e UC _e AA _e A	
24/368679 (as)U _m U _f U _m G _f A _m A _f A _m A _f U _m G _f U _m U _f G _m A _f U _m C _f U _m C _f C _m	8
25/371315 (s) G _e G _e A _e GAUCAAC _e A _e UUUUCA _e A _e A _e	

10

【実施例 19】

【0289】

ヒト eIF4E を標的化した選択された、異なって修飾された siRNA の In vitro アッセイ

本発明に従うと、一連のオリゴマー化合物を合成し、用量の範囲に亘って eIF4E 発現を減少させる能力をテストした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。HeLa 細胞は、0.0006 nM、0.032 nM、0.16 nM、0.8 nM、4 nM または 20 nM の濃度の以下に示した（二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖）二本鎖オリゴマー化合物（siRNA コンストラクト）で、本明細書に記載した方法を用いて処理した。ヒト eIF4E の発現レベルは本明細書に記載したようにリアルタイム PCR を用いて定量化した。結果生じた用量 - 反応曲線は以下に示したように各ペアに対する IC50 を決定するために使用した。

20

【0290】

【表 1 1】

配列ID番号. 組成物 (5' から 3')	IC50
/ISIS 番号.	
30/371286 (as)UUUAGCUCUAACAUAUAACA	0.440
31/371280 (s) UGUUAAUGUUAGAGCUAAA	
30/371287 (as)UUUAGC _m U _m CUA _m A _m CAUUAA _m C _m A _m	0.356
31/371280 (s) UGUUAAUGUUAGAGCUAAA	
30/371287 (as)UUUAGC _m U _m CUA _m A _m CAUUAA _m C _m A _m	2.520
31/371284 (s) U _e G _e U _e UAAUGUUAGAGCUA _e A _e A _e	
32/371297 (as)UUACUAGACAACUGGAUUAU	0.381
33/371291 (s) AUAUCCAGUUGUCUAGUAA	
32/371298 (as)UUACUA _m G _m ACA _m A _m CUGGAU _m A _m U _m	0.260
33/371291 (s) AUAUCCAGUUGUCUAGUAA	
32/371298 (as)UUACUA _m G _m ACA _m A _m CUGGAU _m A _m U _m	0.260
33/371295 (s) A _e U _e A _e UCCAGUUGUCUAGU _e A _e A _e	
32/379960 (as)U _m U _f A _m C _f U _m A _f G _m A _f C _m A _f A _m C _f U _m G _f G _m A _f U _m A _f U _m	0.260
33/371295 (s) A _e U _e A _e UCCAGUUGUCUAGU _e A _e A _e	
34/371308 (as)UUAAAAAGUGAGUAGUCAC	0.126
35/371302 (s) GUGACUACUCACUUUUUAA	
34/371309 (as)UUAAAA _m A _m GUG _m A _m GUAGUC _m A _m C _m	0.168
35/371302 (s) GUGACUACUCACUUUUUAA	
34/371309 (as)UUAAAA _m A _m GUG _m A _m GUAGUC _m A _m C _m	0.040
35/371306 (s) G _e U _e G _e ACUACUCACUUUUU _e A _e A _e	
34/371309 (as)UUAAAA _m A _m GUG _m A _m GUAGUC _m A _m C _m	0.017
35/379965 (s) G _m U _f G _m A _f C _m U _f A _m C _f U _m C _f A _m C _f U _m U _f U _m U _f U _m A _f A _m	

10

20

30

【実施例 2 0】

【0 2 9 1】

マウス e I F 4 E を標的化した選択された、異なって修飾された s i R N A の I n v i t r o アッセイ

40

本発明に従うと、一連のオリゴマー化合物を合成し、用量の範囲に亘って e I F 4 E 発現を減少させる能力をテストした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。b . E N D 細胞は、0 . 0 6 2 5 n M、0 . 2 5 n M、1 n M、または 4 n M の濃度の以下に示した (二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖) 二本鎖オリゴマー化合物 (s i R N A コンストラクト) で、本明細書に記載した方法を用いて処理した。マウス e I F 4 E の発現レベルは本明細書に記載したようにリアルタイム P C R を用いて定量化した。結果生じた用量 - 反応曲線は以下に示したように各ペアに対する I C 5 0 を決定するために使用した。

【0 2 9 2】

【表 1 2】

配列ID番号. 組成物 (5' から 3')	IC50
/ISIS 番号.	
30/371286 (as)UUUAGCUCUAACAUAACA	0.2055
31/371280 (s) UGUUAAUGUUAGAGCUAAA	
30/371287 (as)UUUAGC _m U _m CUA _m A _m CAUUAA _m C _m A _m	0.238
31/371280 (s) UGUUAAUGUUAGAGCUAAA	
30/371287 (as)UUUAGC _m U _m CUA _m A _m CAUUAA _m C _m A _m	9.496
31/371284 (s) U _e G _e U _e UAAUGUUAGAGCUA _e A _e A _e	
30/371286 (as)UUUAGCUCUAACAUAACA	1.193
31/371284 (s) U _e G _e U _e UAAUGUUAGAGCUA _e A _e A _e	
32/371297 (as)UUACUAGACAACUGGAUUAU	0.1859
33/371291 (s) AUAUCCAGUUGUCUAGUAA	
32/371298 (as)UUACUA _m G _m ACA _m A _m CUGGAU _m A _m U _m	0.1946
33/371291 (s) AUAUCCAGUUGUCUAGUAA	
32/371297 (as)UUACUAGACAACUGGAUUAU	0.0936
33/371295 (s) A _e U _e A _e UCCAGUUGUCUAGU _e A _e A _e	
32/371298 (as)UUACUA _m G _m ACA _m A _m CUGGAU _m A _m U _m	0.1151
33/371295 (s) A _e U _e A _e UCCAGUUGUCUAGU _e A _e A _e	
34/371308 (as)UUAAAAAGUGAGUAGUCAC	0.2926
35/371302 (s) GUGACUACUCACUUUUUAA	
34/371309 (as)UUAAAA _m A _m GUG _m A _m GUAGUC _m A _m C _m	0.1626
35/371302 (s) GUGACUACUCACUUUUUAA	
34/371308 (as)UUAAAAAGUGAGUAGUCAC	0.0632
35/371306 (s) G _e U _e G _e ACUACUCACUUUUU _e A _e A _e	
34/371309 (as)UUAAAA _m A _m GUG _m A _m GUAGUC _m A _m C _m	0.0061
35/371306 (s) G _e U _e G _e ACUACUCACUUUUU _e A _e A _e .	

10

20

30

40

50

【実施例 2 1】

【0 2 9 3】

未処理対照に対する P T E N mRNA レベルをアッセイした s i R N A のアンチセンス鎖における 5 つの 2' - O - メチル修飾ヌクレオシドのブロックマーウオーク

以下に記載したアンチセンス (A S) 鎖はヒト P T E N を標的化するように設計し、それぞれは同じセンス鎖 (I S I S 2 7 1 7 9 0 、以下に示した) を有する二本鎖であった。前記二本鎖は、本明細書に記載された方法を用いて 5 つの修飾の相対位置的効果を決定するために、用量の範囲に亘って P T E N 発現を減少する能力をテストした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。P T E N の発現レベルは本明細書に記載したようなリアルタイム P C R 方法を用いて決定し、未処理対照に対して決定されたレベルと比較した。

【 0 2 9 4 】

【 表 1 3 】

配列ID番号:/ISIS 番号	配列 5'-3'
36/271790 (S)	CAAAUCCAGAGGCUAGCAGdTdT
37/271071(AS)	C _m U _m G _m C _m U _m AGCCUCUGGAUUUGdTdT
37/271072(AS)	CU _m G _m C _m U _m A _m GCCUCUGGAUUUGdTdT
37/271073(AS)	CUG _m C _m U _m A _m G _m CCUCUGGAUUUGdTdT
37/271074(AS)	CUGC _m U _m A _m G _m C _m CUCUGGAUUUGdTdT
37/271075(AS)	CUGCU _m A _m G _m C _m C _m UCUGGAUUUGdTdT

10

【 0 2 9 5 】

前記アンチセンス鎖の 5 末端から除去された、少なくとも 2 位に 5 つの 2' - O - メチル基を保持する s i R N A から除去された、少なくとも 2 位に 2 - O - メチル基を保持する s i R N A は P T E N mRNA レベルを未処理対照の 25 ~ 35 % まで減少した。' 残りの 2 つのコンストラクトは、未処理対照以上に P T E N mRNA レベルを増加した。

【 実施例 2 2 】

20

【 0 2 9 6 】

未処理対照に対する P T E N mRNA レベルをアッセイした s i R N A のアンチセンス鎖における 2' - O - メチル修飾ヌクレオシドの固体ブロック

以下に記載したアンチセンス (A S) 鎖はヒト P T E N を標的化するように設計し、それぞれは同じセンス鎖 2 7 1 7 9 0 を有する二本鎖であった。前記二本鎖は、結果生じた s i R N A の 3' 末端に 9 または 1 4 の 2' - O - メチル修飾ヌクレオシドを付加する相対的な効果を決定するために、用量の範囲に亘って P T E N 発現を減少する能力をテストした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。P T E N の発現レベルは本明細書に記載したようなリアルタイム P C R 方法を用いて決定し、未処理対照に対して決定されたレベルと比較した。

30

【 0 2 9 7 】

【 表 1 4 】

配列ID番号:/ISIS 番号	配列 5'-3'
36/271790 (S)	CAAAUCCAGAGGCUAGCAGdTdT
37/271079(AS)	CUGCUAGCCUCUG _m G _m A _m U _m U _m G _m U _m U _m
37/271081(AS)	CUGCUAGC _m C _m U _m C _m U _m G _m G _m A _m U _m U _m U _m G _m U _m U _m

【 0 2 9 8 】

9 の 2' - O - メチルヌクレオシドを保持する s i R N A は、未処理対照の約 40 % まで P T E N mRNA レベルを減少したが、1 4 の 2' - O - メチルヌクレオシドを保持するコンストラクトは、対照の約 98 % まで P T E N mRNA レベルを減少した。

40

【 実施例 2 3 】

【 0 2 9 9 】

2' - O - メチルブロックマー (s i R N A 対 a s R N A)

一連のブロックマーは、一本鎖アンチセンス RNA (a s R N A) として調合した。以下に記載した前記アンチセンス (A S) 鎖は、P T E N を標的化するように設計し、それぞれは、同じセンス鎖 (I S I S 3 0 8 7 4 6 、 以下に示した) を有する二本鎖の一部として P T E N 発現レベルを減少する能力をアッセイした。T 2 4 細胞は、本明細書に記載された方法を用いて、以下に示したアンチセンス化合物で産生した一本鎖または二本鎖オ

50

リゴマー化合物で処理した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。ヒト P T E N の発現レベルは本明細書に記載したようなリアルタイム P C R 方法を用いて決定し、未処理対照に対して決定されたレベルと比較した。

【 0 3 0 0 】

【 表 1 5 】

配列ID番号:/ISIS 番号	配列 5'-3'
39/308746 (S)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA
40/303912 (AS)	P-UUUGUCUCUGGUCCUUACUU
40/316449 (AS)	P-UUUGUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m
40/335223 (AS)	P-UUUGUCUCUGGUCCU _m U _m A _m CUU
40/335224 (AS)	P-UUUGUCUCUGGU _m C _m C _m UUACUU
40/335225 (AS)	P-UUUGUCUCU _m G _m G _m UCCUUACUU
40/335226 (AS)	P-UUUGUC _m U _m C _m UGGUCCUUACUU
40/335227 (AS)	P-UUU _m G _m U _m CUCUGGUCCUUACUU
40/335228 (AS)	P-U _m U _m U _m GUCUCUGGUCCUUACUU

10

【 0 3 0 1 】

全ての a s R N A および s i R N A は活性を示し、a s R N A はそれぞれの場合における対応二本鎖よりも優れた活性を保持する。全ての s i R N A コンストラクト (2 0 、 4 0 、 8 0 、 および 1 5 0 n m 用量) で明らかな用量反応が見られた。5 0 、 1 0 0 、 および 2 0 0 n m 用量の a s R N A では用量 - 反応効果も観察された。一般に前記 s i R N A は、このシステムにおいて a s R N A よりも低い用量で活性化され、1 5 0 n m 用量では未処理対照の 1 5 ~ 4 0 % まで P T E N m R N A レベルを減少することができた。非修飾 3 0 3 9 1 2 を含有する二本鎖は、P T E N m R N A レベルを未処理対照の約 1 9 % まで減少した。

20

【 実施例 2 4 】

【 0 3 0 2 】

s i R N A ヘミマーコンストラクト

3 つの s i R N A ヘミマーコンストラクトを調合し、P T E N 発現レベルを減少する能力をテストした。前記ヘミマーコンストラクトは 3 末端に 7 つの 2 ' - O - メチルヌクレオシドを保持していた。前記ヘミマーはセンス鎖のみ、アンチセンス鎖のみ、および両鎖に挿入し、効果を比較した。細胞は、以下に示した (二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖) 二本鎖オリゴマー化合物 (s i R N A コンストラクト) で、本明細書に記載した方法を用いて処理した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。P T E N の発現レベルは本明細書に記載したようなリアルタイム P C R 方法を用いて決定し、未処理対照に対して決定されたレベルと比較した。

30

【 0 3 0 3 】

40

【表 1 6】

配列ID番号:/ISIS 番号	コンストラクト(オーバーハング) 5'-3'
38/XXXXXX (AS)	<u>CUGCUAGCCUCUGGA</u> _m U _m U _m U _m G _m U _m U _m
41/271068 (S)	CAA <u>AUCCAGAGGCUA</u> _m G _m C _m A _m G _m U _m U _m
38/XXXXXX (AS)	<u>CUGCUAGCCUCUGGAUUUGUU</u>
41/271068 (S)	CAA <u>AUCCAGAGGCUA</u> _m G _m C _m A _m G _m U _m U _m
38/XXXXXX (AS)	<u>CUGCUAGCCUCUGGA</u> _m U _m U _m U _m G _m U _m U _m
41/XXXXXX (S)	CAA <u>AUCCAGAGGCUAGCAGUU</u>

10

【0304】

7つの2'-O-メチルヌクレオシドをアンチセンス鎖中のみに保持するコンストラクトは、PTEN mRNAレベルを未処理対照の約23%まで減少した。7つの2'-O-メチルヌクレオシドを両鎖中に保持するコンストラクトは、PTEN mRNAレベルを未処理対照の約25%まで減少した。7つの2'-O-メチルヌクレオシドをアンチセンス鎖中のみに保持する場合、PTEN mRNAレベルは未処理対照の約31%まで減少した。

【実施例 2 5】

【0305】

20

2'-O-Meギャップマーを保持する、調合された代表的な siRNA

以下のPTENを標的化した選択された siRNA二本鎖のアンチセンス鎖は、それらの相補的完全ホスホジエステルセンス鎖とハイブリダイズさせた。本明細書に記載された方法を用いて活性を測定した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。

【0306】

【表 1 7】

配列ID番号:	配列 (5'-3')
42/300852	CUGC _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300853	P-CUGC _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300854	C _m U _m G _m C _m UAGCCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300855	P-CUGC _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300856	C _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300858	<u>CUGC</u> _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300859	P-CUGC _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
42/300860	C _m U _m A _m G _m CCUCUGGAU _m U _m G _m A _m
43/303913	G _m U _m C _m U _m <u>CUGGUCCUUA</u> _m C _m U _m U _m
44/303915	U _m U _m U _m U _m GUCUCUGGUC _m C _m U _m U _m
45/303917	C _m U _m G _m G _m <u>UCCUUA</u> CUUC _m C _m C _m C _m
46/308743	P-U _m U _m U _m GUCUCUGGUC <u>CUUA</u> C _m U _m U _m
47/308744	P-U _m C _m U _m C _m U _m <u>GGUCCUUA</u> CUUC _m C _m C _m C _m
46/328795	P-UUUG _m U _m C _m U _m <u>CUGGUCCUUA</u> _m C _m U _m U _m

30

40

【実施例 2 6】

50

【 0 3 0 7 】

2' - F 修飾ヌクレオシドおよび様々な構造モチーフを有する調合された代表的な s i R N A

以下の P T E N を標的化した s i R N A 二本鎖のアンチセンス鎖は、一本鎖単独としてテストした、またはそれらの相補的完全ホスホジエステルセンス鎖とハイブリダイズし二本鎖でテストした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。太字およびイタリック体「C」は、5 - メチルCリボヌクレオシドを意味している。

【 0 3 0 8 】

【表 1 8】

10

配列ID番号:/ISIS 番号 配列 5'-3'

40/319022	AS	<u>U_fU_fU_fG_fU_fC_fU_fC_fU_fG_fG_fU_fC_fC_fU_fU_fA_fC_fU_fU_f</u>	
40/333749	AS	<u>UUUGUCUCUGGUCCU_fU_fA_fCUU</u>	
40/333750	AS	<u>UUUGUCUCUGGU_fC_fC_fUUACUU</u>	
40/333751	AS	<u>UUUGUCUCUGGU_fC_fC_fJUACUU</u>	
40/333752	AS	<u>UUUGUC_fU_fC_fUGGUCCUUACUU</u>	
40/333753	AS	<u>UUU_fG_fU_fCUCUGGUCCUUACUU</u>	20
40/333754	AS	<u>U_fU_fU_fGUCUCUGGUCCUUACUU</u>	
40/333756	AS	<u>UUUGUCUCUGGUCCUUAC_fU_fU_f</u>	
40/334253	AS	<u>UUUGUCUCU_fG_fG_fJCCUUACUU</u>	
40/334254	AS	<u>UUUGUCUCUGGUCCUU_fA_fC_fU_fU_f</u>	
40/334255	AS	<u>UUU_fG_fU_fCUCUGGUCCUUACUU</u>	
40/334256	AS	<u>UUU_fG_fU_fCUCUGGU_fC_fC_fUUACUU</u>	
40/334257	AS	<u>U_fU_fU_fGUCUCUGGUCCUUACUU</u>	30
40/317466	AS	<u>U_fU_fU_fGUCUCUGGUCCUUAC_fU_fU</u>	
40/317468	AS	<u>U_fU_fU_fGUCUCUGGUCCUUAC_fU_fU</u>	
40/317502	AS	<u>U_fU_fU_fGU_fC_fU_fCUGGUCC_fU_fU_fAC_fU_fU</u>	

【 0 3 0 9 】

細胞は、本明細書に記載された方法を用いて、上に示された一本鎖または二本鎖オリゴマー化合物の指示された濃度で処理した。P T E N の発現レベルは本明細書に記載したようなリアルタイム P C R 方法を用いて決定し、未処理対照に対して決定されたレベルと比較した。

40

【 0 3 1 0 】

【表 19】

		% 未処理対照 mRNA		
コンストラクト		100 nM asRNA	100 nM siRNA	
303912	35		18	
317466	--		28	
317408	--		18	
317502	--		21	10
334254	--		33	
333756	42		19	
334257	34		23	
334255	44		21	
333752	42		18	
334253	38		15	
333750	43		21	20
333749	34		21	

【0311】

2' - F 修飾ヌクレオシドを有する更なる siRNA は、以下に掲載する。

【0312】

【表 20】

37/279471	AS	C _f U _f G _f C _f U _f A _f G _f C _f C _f U _f C _f U _f G _f G _f A _f U _f U _f U _f G _f dTdT	
36/279467	S	C _f A _f A _f A _f U _f C _f C _f A _f G _f A _f G _f G _f C _f U _f A _f G _f C _f A _f G _f dTdT	30
40/319018	AS	U _f U _f U _f G _f U _f C _f U _f C _f U _f G _f G _f U _f C _f C _f U _f U _f A _f C _f U _f U _f	
39/319019	S	A _f A _f G _f U _f A _f A _f G _f G _f A _f C _f C _f A _f G _f A _f G _f A _f C _f A _f A _f	

【実施例 27】

【0313】

完全に修飾されたアンチセンス鎖 (2' - F および 2' - Me) で調合された代表的な siRNA

P TEN を標的化した siRNA コンストラクトを調合し、ここにおいて以下のセンス鎖およびアンチセンス鎖をハイブリダイズした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。 40

【0314】

【表 21】

配列ID番号:/ISIS 番号	配列 5'-3'
48/283546 (as)	C _f U _f G _m C _f U _f A _m G _m C _f C _f U _f C _f U _f G _m G _m A _m U _f U _f U _f G _m U _m dT
40/336240 (s)	<u>UUUGUCUC_fU_fGGU_fC_fCUUAC_mU_mU_m</u>

【実施例 28】

【0315】

2' - MOE 修飾ヌクレオシドを保持する、調合された代表的な siRNA は未処理対照に対して PTEN mRNA レベルをアッセイした

PTEN を標的化した siRNA コンストラクトを調合し、ここにおいて以下のセンス鎖を相補的完全ホスホジエステルセンス鎖とハイブリダイズした。

【0316】

以下の siRNA のアンチセンス鎖は相補的完全ホスホジエステルセンス鎖とハイブリダイズした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。結合はホスホロチオエートである。細胞は本明細書に記載された方法を用いて二本鎖で処理した。100 nM 二本鎖を用いて得られた結果は、未処理対照 PTEN mRNA レベルのパーセンテージとして示した。

10

【0317】

【表22】

配列ID番号. /ISIS 番号.	組成物 (5' から 3')	PTEN mRNA レベル (%UTC) 100 nM
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUCCUGGUCUCUGUUU</u>	--
49/xxxxx (as)	<u>U_eU_eC_eAUCCUGGUCUCUGUUU</u>	50
49/xxxxx (as)	<u>UUCA_eU_eU_eCCUGGUCUCUGUUU</u>	--
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUUC_eC_eU_eGGUCUCUGUUU</u>	43
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUCCUG_eG_eU_eCUCUGUUU</u>	42
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUCCUGGUC_eU_eC_eUGUUU</u>	47
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUCCUGGUCUCU_eG_eU_eUU</u>	63
49/xxxxx (as)	<u>UUCAUCCUGGUCUCUGU_eU_eU_e</u>	106

20

【実施例29】

【0318】

4' - チオおよび 2' - OCH₃ キメラオリゴマー化合物

以下に示した二本鎖コンストラクト(二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖)を調合した。アンチセンス(as)の名称の後の「P」は標的がPTENであることを示し、「S」は標的がサバイピンであることを示している。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。

30

【0319】

【表 2 3】

配列ID番号.	組成物 (5' から 3')
/ISIS 番号.	
40/308743 (as-P)	<u>U_mU_mU_mGUCUCUGGUCCUAC_mU_mU_m</u>
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA
24/353537 (as-S)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i
25/343868 (s-S)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA
24/353537 (as-S)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i
25/352512 (s)	G _m G _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A _m
24/353537 (as-S)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i
25/352513 (s)	GG _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A
24/353537 (as-S)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i
25/352514 (s)	GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e JU _e JC _e AA _e A

10

【0320】

指示された標的に対して設計されたコンストラクトは、本明細書に記載されたアッセイに従ってテストした。二本鎖オリゴマー化合物を HeLa 細胞 (アメリカ培養細胞系統保存機関、バージニア州 Manassas) において評価した。HeLa 細胞に対して使用した培養方法は ATCC から利用可能であり、例えば <http://www.atcc.org> で見つけることができる。96 ウェルプレートで増殖した細胞に対して、ウェルを 200 μL の OPTI-MEM-1 低減血清培養液で 1 回洗浄し、12 μg/mL の LIPOFECTIN (商標) (Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州 Carlsbad) および望ましい濃度の dsRNA を含有した 130 μL の OPTI-MEM-1 で処理した。処理の約 5 時間後、培養液は新鮮な培養液と交換した。細胞は、RNA を単離し、以前の実施例に記載したように定量化リアルタイム RT-PCR によって標的減少が測定された時点である処理後 16 時間で回収した。結果生じる用量-反応データは各コンストラクトに対する IC50 を決定するために使用した。

20

30

【0321】

【表 2 4】

コンストラクト	アッセイ/種	標的	IC50 (nM)
308743:308746	容量反応性/ヒト	PTEN	0.0275
353537:343868	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.067284
353537:343868	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.17776
353537:343868	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.598
353537:343868	容量反応性/ヒト	サバイビン	4.23
353537:352512	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.60192
353537:352513	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.71193
353537:352514	容量反応性/ヒト	サバイビン	0.48819

40

【実施例 30】

【0322】

50

eIF4Eおよびサバイビン標的に対して調合しテストした選択されたsiRNAコンストラクト

選択されたsiRNAコンストラクトを調合し、定量化リアルタイムPCRによって測定されたようなより低い標的RNAに対する能力をテストした。前記二本鎖は以下に示した(二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖)。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。

【0323】

【表25】

配列ID番号. /ISIS 番号.	組成物 (5'から3') eIF4Eを標的化
50/349894 (as)	U _f G _f U _f C _f A _f UAUCCUGGAU _m C _m C _m U _m U _m
51/338935 (s)	AAGGAUCCAGGAAUAUGACA
52/349895 (as)	U _f C _f C _f U _f G _f GAUCCUUCACC _m A _m A _m U _m G _m
53/338939 (s)	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA
54/349896 (as)	U _f C _f U _f U _f A _f UCACCUUUAGC _m U _m C _m U _m A _m
55/338943 (s)	UAGAGCUAAAGGUGAUAAGA
56/349897 (as)	A _f U _f A _f C _f U _f CAGAAGGUGUC _m U _m U _m C _m U _m
57/338952 (s)	AGAAGACACCUUCUGAGUAU
58/352827 (as)	U _s C _s U _s UAUCACCUUUAGCU _m C _m U _m
59/342764 (s)	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA
58/354604 (as)	U _s C _s U _s U _f A _f U _f C _f A _f C _f C _f U _f U _f U _f A _f G _f C _f U _m C _m U _m
59/342764 (s)	AGAGCUAAAGGUGAUAAGA

10

20

【0324】

【表26】

配列ID番号. /ISIS 番号.	組成物 (5'から3') サバイビンを標的化
24/355710 (as)	U _f U _f U _f G _f A _f AAAUGUUGAU _m C _m U _m C _m C _m
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA
24/353540 (as)	U _s U _s U _s GAAAAUGUUGAUCU _m C _m C _m
45/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA

40

【0325】

上のコンストラクトは、本明細書に記載されたような形質移入手順およびリアルタイムPCRを用いて、HeLa細胞、MH-S細胞またはU-87MG細胞においてテストした。結果生じた二本鎖に対するIC50を計算し、以下に示した。

【0326】

【表 27】

コンストラクト	種/細胞株	遺伝子	IC ₅₀	
349894:338935	ヒト/HeLa	eIF4E	0.165	
349895:338939	ヒト/HeLa	eIF4E	0.655	
349896:338943	ヒト/HeLa	eIF4E	0.277	
349896:338943	マウス/MH-S	eIF4E	0.05771	
349897:338952	ヒト/HeLa	eIF4E	0.471	10
352827:342764	ヒト/HeLa	eIF4E	2.033	
352827:342764	マウス/MH-S	eIF4E	0.34081	
354604:342764	ヒト/HeLa	eIF4E	2.5765	
355710:343868	ヒト/HeLa	サバイビン	0.048717	
353540:343868	ヒト/HeLa	サバイビン	0.11276	
353540:343868	ヒト/U-87 MG	サバイビン	0.0921	20

【実施例 31】

【0327】

位置的に修飾された組成物

以下の表は、本発明に従って調合された例示的な位置的に修飾された組成物を示したものである。標的の標示は：P = PTEN；S = サバイビン；E = eIF4Eであり、以下のアンチセンス鎖名称の次に示されている。

【0328】

【表 2 8 - 1】

配列ID番号. /ISIS 番号.	組成物 (5' から 3')	
52/345838 (as-P)	UCCUGG _m AUCCUU _m CAC _m CAA _m U _m G _m	
53/338939 (s)	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	
60/345839 (as-E)	CCUGG _m A _m UCC _m U _m UCACCAA _m U _m G _m	
53/338939 (s)	CAUUGGUGAAGGAUCCAGGA	
56/345853 (as-E)	AUACUC _m A _m GAA _m G _m GUGUCUU _m C _m U _m	10
57/338952 (s)	AGAAGACACCUUCUGAGUAU	
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/346287 (s)	<u>GGAGAUCAACAUUUUCAAA</u>	
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	20
25/346287 (s)	<u>GGAGAUCAACAUUUUCAAA</u>	
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	
25/352511 (s)	GG _m AG _m AU _m CA _m AC _m AU _m UU _m UC _m AA _m A	
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	
25/352513 (s)	GG _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/352511 (s)	GG _m AG _m AU _m CA _m AC _m AU _m UU _m UC _m AA _m A	30
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	
25/352514 (s)	GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/352514 (s)	GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A	
24/352505 (as-S)	UUUGA _m AAA _m UGU _m UGA _m UCU _m C _m C _m	
25/352512 (s)	G _m G _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A _m	
56/345853 (as-E)	AUACUC _m A _m GAA _m G _m GUGUCUU _m C _m U _m	40

【 0 3 2 9 】

【表 2 8 - 2】

57/345857 (s)	AG _m A _m A _m G _m A _m C _m A _m C _m C _m U _m U _m C _m U _m G _m A _m G _m U _m A _m U	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/352512 (s)	G _m G _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A _m	
24/352506 (as-S)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m	
25/352513 (s)	GG _m A _m G _m A _m U _m C _m A _m A _m C _m A _m U _m U _m U _m C _m A _m A _m A	
40/335225 (as-P)	<u>UUUGUCUCU_mG_mG_mUCCU_mACU_m</u>	10
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/335226 (as-P)	<u>UUUGUC_mU_mC_mUGGUCCU_mACU_m</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/345711 (as-P)	UUUG ₁ UCUCUG ₁ GUCCU ₁ ACU ₁ U	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/345712 (as-P)	UUU ₁ G ₁ UCUCUG ₁ G ₁ UCCU ₁ A ₁ C ₁ UU	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/347348 (as-P)	U ₁ U ₁ U ₁ GUC ₁ UCU ₁ GGU ₁ CCU ₁ UAC ₁ U ₁ U ₁	20
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/348467 (as-P)	<u>U₁U₁U₁GUC₁UCU₁GGU₁CCU₁UAC₁U₁U₁</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
24/355715 (as-S)	UUUG ₁ AAAAU ₁ GUUGAUCUC ₁ C	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAAA	
40/331426 (as-P)	<u>UUUGUCUCU₁G₁G₁UCCU₁ACU₁</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/331695 (as-P)	<u>UUUGUCUCUGGUCCU₁AC₁U₁U₁</u>	30
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/332231 (as-P)	<u>UUUGUCUCUGGUCCU₁ACU₁U</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
24/355712 (as-S)	UUUGA ₁ AAA ₁ UGU ₁ UGA ₁ UCU _m C _m C _m	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAAA	
24/353538 (as-S)	UUU ₁ GAAAAU ₁ GUU ₁ GAUCU ₁ C ₁ Cs	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAAA	
40/336671 (as-P)	UUUGUCUCUGGUCCU ₁ AC ₁ U ₁ Us	40
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336674 (as-P)	UUUGUCUCUGGUCCU ₁ AC ₁ U ₁ Us	

【 0 3 3 0 】

【表 2 8 - 3】

39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336675 (as-P)	UUUGUCUCUGGUCCUACUUs	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336672 (as-P)	UUUGUCUCUGGUC _i C _i U _i UACUU	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336673 (as-P)	UUUGUCUCUGGU _i C _i C _i UACUU	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336676 (as-P)	UUUGUCU _i C _i U _i GGUCCUACUU	10
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/336678 (as-P)	U _i U _i U _i GUCUCUGGUCCUACUU	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
24/352515 (as-S)	UUUGAAAAUGUUGAU _m C _m U _m C _m C _m	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA	
61/330919 (as-P)	<u>UUT_eG_eT_eCUCUGGUCCUACUU</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
62/330997 (as-P)	<u>T_eT_eT_eGTCUCUGGUCCUACUU</u>	20
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/333749 (as-P)	<u>UUUGUCUCUGGUCCU_fU_fA_fCUU</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/333750 (as-P)	<u>UUUGUCUCUGGU_fC_fC_fUACUU</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/333752 (as-P)	UUUGUC _f U _f C _f UGGUCCUACUU	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/333756 (as-P)	<u>UUUGUCUCUGGUCCUAC_fU_fU_f</u>	30
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
40/334253 (as-P)	<u>UUUGUCUCU_fG_fG_fUCCUACUU</u>	
39/308746 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAAA	
24/353539 (as-S)	U _i U _i U _i GAAAAU _i GUU _i GAUCU _m C _m C _m	
25/343868 (s)	GGAGAUCAACAUUUUCAAA	

【0331】

上のコンストラクトは、本明細書で記載されたような形質移入手順およびリアルタイム PCR を用いて、HeLa 細胞、MH-S 細胞または U-87MG 細胞においてテストした。結果生じた IC50 を計算し、以下に示した。前記化合物が標的化している種およびアッセイされた細胞株も示してある。

【0332】

【表 29 - 1】

コンストラクト	種/細胞株	遺伝子	IC50	
345838:338939	マウス/MH-S	eIF4E	0.022859	
345839:338939	マウス/MH-S	eIF4E	0.01205	
345853:338952	マウス/MH-S	eIF4E	0.075517	
352505:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.17024	
352506:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.055386	
352506:346287	ヒト/HeLA	サバイビン	0.11222	10
352505:346287	ヒト/HeLA	サバイビン	0.96445	
352505:352511	ヒト/HeLA	サバイビン	0.21527	
352505:352513	ヒト/HeLA	サバイビン	0.12453	
352506:352511	ヒト/HeLA	サバイビン	0.045167	
352505:352514	ヒト/HeLA	サバイビン	0.47593	
352506:352514	ヒト/HeLA	サバイビン	0.11759	
352506:352514	ヒト/HeLA	サバイビン	0.376	20
352506:352514	ヒト/U-87 MG	サバイビン	0.261	
352505:352512	ヒト/HeLA	サバイビン	0.075608	
345853:345857	マウス/MH-S	eIF4E	0.025677	
352506:352512	ヒト/HeLA	サバイビン	0.11093	
352506:352513	ヒト/HeLA	サバイビン	0.24503	
335225:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.809	
335226:308746	ヒト/HeLA	PTEN	1.57	30
308746:345711	ヒト/HeLA	PTEN	1.13	
308746:345712	ヒト/HeLA	PTEN	0.371	
308746:347348	ヒト/HeLA	PTEN	0.769	
308746:348467	ヒト/HeLA	PTEN	18.4	
355715:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.020825	
331426:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.5627	
331695:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.27688	40
332231:308746	ヒト/HeLA	PTEN	5.58	

【 0 3 3 3 】

【表 29 - 2】

355712:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.022046
353538:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.491
353538:343868	ヒト/U87-MG	サバイビン	0.46
336671:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.273
336674:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.363
336675:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.131
336672:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.428
336673:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.122
336676:308746	ヒト/HeLA	PTEN	7.08
336678:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.144
352515:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.031541
330919:308746	ヒト/HeLA	PTEN	29.4
330997:308746	ヒト/HeLA	PTEN	3.39
333749:308746	ヒト/HeLA	PTEN	1.3
333750:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.30815
333752:308746	ヒト/HeLA	PTEN	1.5416
333756:308746	ヒト/HeLA	PTEN	1.0933
334253:308746	ヒト/HeLA	PTEN	0.68552
353539:343868	ヒト/HeLA	サバイビン	0.13216

10

20

【実施例 32】

30

【0334】

本発明の適切な位置的組成物

以下の表は本発明のいくつかの適切な位置的組成物を記載したものである。記載されたコンストラクトにおいて、センス鎖の5末端ヌクレオシド(上段)は、アンチセンス鎖の3'末端ヌクレオシド(下段)とハイブリダイズした。

【0335】

【表 3 0】

化合物 (センス/アンチセンス)	コンストラクト(センス 5'→3' / アンチセンス)
センス RNA アンチセンスに分散した 4'チオ (太字)	5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3' 3'-XXX ₁₇ XXXX ₁₂ XXX ₉ XXXXXXXX ₃ X ₂ X ₁ -5'
センス RNA アンチセンスに分散した 2'- OMe (italic)/ 4'-thio (bold)	5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3' 3'-X ₁₉ X ₁₈ X ₁₇ XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
センス RNA キメラ 2'-OMe (イタリック体)/2'- フルオロ(太字イタリック体) アン チセンス	5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3' 3'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5'
交互 MOE(下線)/OH センス キメラ OMe (イタリック体) / OH アンチセンス	5'- <u>XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX</u> -3' 3'-X ₂₀ X ₁₉ X ₁₈ XXXXXXXXX ₁₁ X ₁₀ XXX ₇ X ₆ XXXXX-5'
OMe ギャップマーセンス/ キメラ OMe (イタリック体) / OH アンチセンス	5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3' 3'-X ₂₀ X ₁₉ X ₁₈ XXX ₁₅ XXX ₁₂ XXXXXXXX ₆ XXXXX-5'
センス RNA キメラ OMe/OH アンチセンス	5'-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3' 3'-XXX ₁₇ XXX ₁₄ XXX ₁₁ XXX ₈ XXX ₅ XXXX-5'

10

20

30

【実施例 3 3】

【0 3 3 6】

T-24 細胞において PTEN を標的化した交互 2'-O-メチル / 2'-F 20 m
er siRNA

用量反応実験は、交互 2'-O-メチル / 2'-F siRNA の位置的効果を検討す
るために PTEN システムにおいて実行した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明
のように化学修飾に関して注釈をつけた。

【0 3 3 7】

【表 3 1】

配列ID番号.	組成物 (5' から 3')
/ISIS 番号.	
40/303912 (as)	<u>UUUGUCUCUGGUCCUUACUU</u>
39/308746 (s)	P-AAGUAAGGACCAGAGACAAA
40/340569 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/340573 (s)	P-A _f A _m G _f U _m A _f A _m G _f G _m A _f C _m C _f A _m G _f A _m G _f A _m C _f A _m A _f A _m
40/340569 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/340574 (s)	P-A _m A _f G _m U _f A _m A _f G _m G _f A _m C _f C _m A _f G _m A _f G _m A _f C _m A _f A _m A _f
40/340569 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/308746 (s)	P-AAGUAAGGACCAGAGACAAA
40/340570 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/340573 (s)	P-A _f A _m G _f U _m A _f A _m G _f G _m A _f C _m C _f A _m G _f A _m G _f A _m C _f A _m A _f A _m
40/340570 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/340574 (s)	P-A _m A _f G _m U _f A _m A _f G _m G _f A _m C _f C _m A _f G _m A _f G _m A _f C _m A _f A _m A _f
40/340570 (as)	P-U _f U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
39/308746 (s)	P-AAGUAAGGACCAGAGACAAA

10

20

【0338】

完全交互 2' - O - メチル / 2' - F アンチセンス鎖 (PO または PS) の効果を決定するために上の siRNA コンストラクトをアッセイし、ここにおいて前記アンチセンス鎖の 5' 末端は残りの位置が交互である 2' - F 修飾ヌクレオシドである。前記センス鎖は、前記センス鎖の 3' 末端で開始した 2' - O - メチル修飾ヌクレオシドでテストした各 siRNA に対して、別の同一 siRNA を前記センス鎖の 3' 末端で開始した 2' - F 修飾ヌクレオシドで調合されるように、両配向における前記修飾ヌクレオシドの位置を有するように調合した。これら 2 つの siRNA 間の違いを記載する別の方法としては、前記センス鎖の記載が、一定な 1 つの配向での前記アンチセンス鎖の記載と共に両方の可能な配向内であるというものである。前記コンストラクトの活性 (150 nM での) は、未処理対照のパーセンテージとして以下に示した。

30

【0339】

【表 3 2】

siRNA コンストラクト	活性 (% 未処理対照 150 nM)	
	センス	アンチセンス
308746/303912	28% PO 非修飾 RNA	PS 非修飾 RNA
340574/340569	46% PO (2'-F, 3'-O)	PO (2'-F, 5'-O)
340574/340570	62% PO (2'-F, 3'-O)	PS (2'-F, 5'-O)
340573/340569	84% PO (2'-O-メチル, 3'-O)	PO (2'-F, 5'-O)
340573/340570	23% PO (2'-O-メチル, 3'-O)	PS (2'-F, 5'-O)
308746/340569	23% PO 非修飾 RNA	PO (2'-F, 5'-O)
308746/340570	38% PO 非修飾 RNA	PS (2'-F, 5'-O)

10

【0340】

このアッセイに対する交互モチーフ内で、前記アンチセンス鎖は 5' 末端ヌクレオシドでの 2' - F 基で開始して調合した。前記センス鎖は 2' - F 修飾ヌクレオシドまたは 2' - O - メチル修飾ヌクレオシドで 3' 末端ヌクレオシドから開始した交互モチーフで調合した。前記 siRNA コンストラクトは、完全ホスホジエステルとしてのセンス鎖に対するインターヌクレオシド結合、および完全ホスホジエステルまたはホスホロチオエートとしてのアンチセンス鎖に対するインターヌクレオシド結合で調合した。

20

【実施例 3 4】

【0341】

eIF4E を標的化した交互 2' - O - メチル / 2' - F siRNA に対する修飾リン酸部位の効果

用量反応は、活性に対する選択された末端基の効果を決定するために、HeLa 細胞において eIF4E を標的化して実行した。より具体的には、交互 2' - O - メチル / 2' - F 修飾を含む 19 - 塩基対 siRNA による HeLa 細胞における eIF4E mRNA の減少が、この実施例において示された。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。5' - P (S) は 5' - チオリン酸基 (5 - O - P (= S) (OH) OH) であり、5' - P (H) は 5' - H - リン酸基 (5' - O - P (= O) (H) OH) であり、5' - P (CH₃) はメチルホスホネート基 (5' - O - P (= O) (CH₃) OH) である。このアッセイにおける全てのコンストラクトは完全なホスホジエステル結合されている。

30

【0342】

HeLa 細胞を 4000 / ウェルで播種し、LIPOFECTIN (商標) (6 μL / mL OPTI - MEM) の存在下の siRNA で形質移入し、約 4 時間処理し、再度添加し、次の日に溶解し、本明細書に記載されたようにリアルタイム PCR 方法を用いて解析した。最大 % 減少とは、最大濃度 (100 nM) での未処理対照細胞と比較した mRNA 減少の量であり、IC50 は 50 % 減少が達成される補間濃度を意味している。

40

【0343】

【表 3 3】

配列ID番号	eIF4E を標的化した配列 5'-3'	
ISIS 番号		
26/341391 (as)	UUGUCUCUGGUCCUUACUU	
27/341401 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAA	
58/342744 (as)	UCUUAUCACCUUUAGCUCU	
59/342764 (s)	AGAGCUAAAAGGUGAUAAGA	10
58/351831 (as)	U _m C _f U _m U _f A _m U _f C _m A _f C _m C _f U _m U _f U _m A _f G _m C _f U _m C _f U _m	
59/351832 (s)	A _f G _m A _f G _m C _f U _m A _f A _m A _f G _m G _f U _m G _f A _m U _f A _m A _f G _m A _f	
58/368681 (as)	P-U _m C _f U _m U _f A _m U _f C _m A _f C _m C _f U _m U _f U _m A _f G _m C _f U _m C _f U _m	
59/351832 (s)	A _f G _m A _f G _m C _f U _m A _f A _m A _f G _m G _f U _m G _f A _m U _f A _m A _f G _m A _f	
58/379225 (as)	P(S)-U _m C _f U _m U _f A _m U _f C _m A _f C _m C _f U _m U _f U _m A _f G _m C _f U _m C _f U _m	
59/351832 (s)	A _f G _m A _f G _m C _f U _m A _f A _m A _f G _m G _f U _m G _f A _m U _f A _m A _f G _m A _f	
58/379712 (as)	P(H)-U _m C _f U _m U _f A _m U _f C _m A _f C _m C _f U _m U _f U _m A _f G _m C _f U _m C _f U _m	20
59/351832 (s)	A _f G _m A _f G _m C _f U _m A _f A _m A _f G _m G _f U _m G _f A _m U _f A _m A _f G _m A _f	
58/379226 (as)	P(CH ₃)-U _m C _f U _m U _f A _m U _f C _m A _f C _m C _f U _m U _f U _m A _f G _m C _f U _m C _f U _m	
59/351832 (s)	A _f G _m A _f G _m C _f U _m A _f A _m A _f G _m G _f U _m G _f A _m U _f A _m A _f G _m A _f	

【0 3 4 4】

【表 3 4】

二本鎖コンストラクト			活性		
アンチセンス	センス		% 対照(100 nM)	IC50 (nM)	
341401	341391	103	n/a (ネガティブコントロール)		30
342764	342744	11.0	1.26		
351832	351831	3.5	0.66		
351832	368681	3.6	0.14		
351832	379225	2.8	0.20		
351832	379712	8.0	2.01		
351832	379226	18.1	8.24		40

【実施例 3 5】

【0 3 4 5】

P T E N を標的化した選択された s i R N A のアッセイ

以下に記載したコンストラクトは、未処理対照レベルに対する、H e L a 細胞におけるヒト P T E N mRNA のレベルを測定することによって活性をアッセイした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。「P (S) -」はチオリン酸基 (- O - P (= S) (O H) O H) を意味している。

【0 3 4 6】

【表 3 5 - 1】

配列ID番号	PTEN を標的化した配列 5'-3'	
/ISIS 番号		
26/371789 (as)	P-UUGUCUCUGGUCCUUACUU	
27/341401 (s)	P-AAGUAAGGACCAGAGACAA	
26/383498 (as)	<u>U_mU_tG_mU_tC_mU_tC_mU_tG_mG_tU_mC_tC_mU_tU_mA_tC_mU_tU_m</u>	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/381671 (as)	P- <u>U_mU_tG_mU_tC_mU_tC_mU_tG_mG_tU_mC_tC_mU_tU_mA_tC_mU_tU_m</u>	10
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/382716 (as)	P(S)- <u>U_mU_tG_mU_tC_mU_tC_mU_tG_mG_tU_mC_tC_mU_tU_mA_tC_mU_tU_m</u>	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/381672 (as)	P- <u>U_mU_tG_mU_tC_mU_tC_mU_tG_mG_tU_mC_tC_mU_tU_mA_tC_mU_tU_m</u>	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384758 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384759 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	20
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384760 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384761 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/359455 (as)	<u>UUGUCUCUGGUCCUUACUU</u>	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384754 (as)	P(S)-UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	30
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384755 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384756 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/384757 (as)	U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e	
26/359455 (as)	<u>UUGUCUCUGGUCCUUACUU</u>	40
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384754 (as)	P(S)-UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	

【 0 3 4 7 】

【表 3 5 - 2】

27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384755 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384756 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384757 (as)	U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	10
26/383498 (as)	<u>U_mU_fG_mU_fC_mU_fC_mU_fG_mG_fU_mC_fC_mU_fU_mA_fC_mU_fU_m</u>	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/381671 (as)	P- <u>U_mU_fG_mU_fC_mU_fC_mU_fG_mG_fU_mC_fC_mU_fU_mA_fC_mU_fU_m</u>	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/382716 (as)	P(S)- <u>U_mU_fG_mU_fC_mU_fC_mU_fG_mG_fU_mC_fC_mU_fU_mA_fC_mU_fU_m</u>	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/381672 (as)	P- <u>U_mU_fG_mU_fC_mU_fC_mU_fG_mG_fU_mC_fC_mU_fU_mA_fC_mU_fU_m</u>	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	20
26/384758 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384759 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384760 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	
26/384761 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t	30
26/384758 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/366023 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>	
26/384759 (as)	P(S)-U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/366023 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>	
26/384760 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/366023 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>	
26/384761 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/366023 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>	40
26/384754 (as)	P(S)-UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m	
27/359351 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>	
26/384755 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUUAC _m U _m U _m	

【表 3 5 - 3】

27/359351 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>
26/384756 (as)	P(S)-U _t U _t GUCUCUGGUCCUAC _m U _m U _m
27/359351 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>
26/384757 (as)	U _t U _t GUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m
27/359351 (s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>
26/359345 (as)	U _t U _t GUCUCUGGUCCUACU _t U _t
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t
26/381671 (as)	U _t U _t GUCUCUGGUCCUAC _m U _m U _m
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t
26/352820 (as)	P-U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
27/384762 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _t A _t A _t
26/352820 (as)	P-U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m
27/359351 (s)	A _e A _e G _e UAAGGACCAGAGAC _e A _e A _e
26/384754 (as)	P(S)-UUGUCU _m C _m UGG _m U _m CCUUAC _m U _m U _m
27/359351(s)	<u>A_fA_mG_fU_mA_fA_mG_fG_mA_fC_mC_fA_mG_fA_mG_fA_mC_fA_mA_f</u>

10

20

【 0 3 4 9 】

【表 3 6】

二本鎖コンストラクト		活性	
アンチセンス	センス	IC50 (nM)	
341391	341401	0.152	
359980	359351	0.042	
384758	359351	0.095	
384759	359351	0.08	10
384760	359351	0.133	
384761	359351	0.13	
384754	359351	0.203	
384757	359351	0.073	
352820	359351	0.214	
359980	384762	0.16	
384754	384762	0.245	20
384755	384762	0.484	
384756	384762	0.577	
384757	384762	0.131	
384758	384762	0.361	
384759	384762	0.332	
384760	384762	0.566	
384761	384762	0.362	30
359345	384762	0.155	
359346	384762	0.355	
352820	384762	0.474	

【実施例 3 6】

【0350】

P T E N を標的化した交互 2' - M O E / 2' - O H s i R N A

以下に記載した P T E N を標的化したコンストラクトは示したように（二本鎖のアンチセンス鎖の次にセンス鎖）二本鎖であり、本明細書に記載された方法を用いて活性をアッセイした。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。

【0351】

【表 3 7】

配列ID番号	PTEN を標的化した配列 5'-3'	IC50 (nM)
/ISIS 番号		
27/355771 (s)	P-AA _c GU _c AA _c GG _c AC _c CA _c GA _c GA _c CA _c A	273
40/357276 (as)	P-UUUG _c UCUC _c UGGUCCUU _c ACUU	
27/355771 (s)	P-AA _c GU _c AA _c GG _c AC _c CA _c GA _c GA _c CA _c A	5.5
40/357276 (as)	P-UUUG _c UCUCUGG _c UCCUUACU _c U	

10

【実施例 3 7】

【0 3 5 2】

PTEN を標的化した化学的に修飾された siRNA : in vivo 研究
 6 ~ 7 週齢 Balb / c マウス (Jackson Laboratory , メイン州 Bar Harbor) に、PTEN を標的化した一本鎖および二本鎖組成物を注射した。前記ヌクレオシドは、実施例の最初の説明のように化学修飾に関して注釈をつけた。各処理群は 4 匹の動物から成る。動物は腹腔内注射を介して 1 日 2 回 4 . 5 日間、動物当たり全 9 回投与した。生理食塩水注射動物をネガティブコントロールとした。動物は最後の用量が投与された後 6 時間で屠殺し、血漿サンプルおよび組織を回収した。肝臓における標的減少も本研究の終了時に測定した。

20

【0 3 5 3】

【表 3 8】

配列ID番号	eIF4E を標的化した配 5'-3'	
/ISIS 番号		
63/116847	<u>C_cT_cG_cC_cT_cAGCCTCTGGAT_cT_cT_cG_cA_c</u>	一本鎖
26/341391 (as)	UUGUCUCUGGUCCUUACUU	
27/341401 (s)	AAGUAAGGACCAGAGACAA	
26/359995 (as)	U _m U _f G _m U _f C _m U _f C _m U _f G _m G _f U _m C _f C _m U _f U _m A _f C _m U _f U _m	
27/359996 (s)	A _f A _m G _f U _m A _f A _m G _f G _m A _f C _m C _f A _m G _f A _m G _f A _m C _f A _m A _f	

30

【0 3 5 4】

各処理の 2 つの異なる用量でテストした。ISIS 116847 での処理では、12 . 5 mg / kg の用量を 1 日 2 回、または 6 . 25 mg / kg を 1 日 2 回投与した。

【0 3 5 5】

上記の siRNA コンストラクト (非修飾 341391 / 341401、359995 / 359996 両鎖は修飾されている) は、25 mg / kg で 1 日 2 回または 6 . 25 mg / kg で 1 日 2 回投与した。各 siRNA は以前の実施例のようにアンチセンス鎖および相補的センス鎖で構成されており、前記アンチセンス鎖はマウス PTEN を標的化している。ISIS 116847 および本実験の全ての siRNA も、ヒト PTEN に対して完全な相補性を有している。

40

【0 3 5 6】

肝臓における PTEN mRNA レベルは、以前の実施例に教示されたようにリアルタイム PCR および RIBOGREEN (商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes , Inc . オレゴン州 Eugene) を用いて、本研究の最後に測定した。結果は生理食塩水注射対照で規準化された、各処理群に対する mRNA 発現の平均 % 阻害として以下の表に示した。

【0 3 5 7】

50

【表 3 9】

マウス肝臓における PTEN を標的化した修飾 siRNA による標的減少

処理	用量 (mg/kg, 2x/日で投与)	% 阻害	
		リボグリン	GAPDH
ISIS 116847	12.5	92	95
	6.25	92	95
ISIS 341391/341401	25	12	21
	6.25	2	9
ISIS 359995/359996	25	6	13
	6.25	5	13

10

【0358】

上の表に示されたように、PTEN を標的化した全てのオリゴヌクレオチドは生理食塩水処理対照と比較して、mRNA レベルにおける減少を生じた。ISIS 341391 / 341401 二本鎖に対して測定された mRNA レベルも用量依存性の阻害を示唆するものであった。

【0359】

血漿グルコースレベルに対する RNA 二本鎖での処理の効果は上記のように処理したマウスにおいて評価した。グルコースレベルはルーティンな臨床解析機（例えば Ascencia Glucometer Elite XL, ニューヨーク州 Bayer, Tarrytown）を用いて測定した。おおよその平均血漿グルコースは各処理群に対して以下の表に示した。

20

【0360】

【表 4 0】

正常マウスにおける PTEN を標的化した修飾 siRNA の
血漿グルコースレベルに対する影響

処理	用量 (mg/kg, 2x/日で投与)	血漿グルコース (mg/dL)
生理食塩水	該当なし	186
ISIS 116847	12.5	169
	6.25	166
ISIS 341391/341401	25	159
	6.25	182
ISIS 359996/359995	25	182
	6.25	169

30

40

【0361】

PTEN mRNA を標的化した In vivo siRNA に起因する生理学的効果を推定するために、前記マウスの血漿トリグリセリド、血漿コレステロール、および血漿トランスアミナーゼレベルを処理期間の最後に評価した。血漿トリグリセリド、コレステロール、およびトランスアミナーゼレベルを測定するためにルーティンな臨床解析機（例えば Olympus Clinical Analyzer, ニューヨーク州 Melville）を使用した。ISIS 116847 のいずれかの用量で処理した動物からの血漿コレステロールレベルは、生理食塩水処理動物で測定されたレベルを約 20% 以上増加した

50

。反対に、ISIS341391/341401二本鎖の25 mg/kgまたは6.25 mg/kgで処理した動物で測定したコレステロールレベルは、生理食塩水処理対照と比較して約12%減少した。ISIS359996/359995二本鎖は、コレステロールレベルにおいて有意な変化を生じなかった。全ての治療群は治療用量に関係なく、生理食塩水処理対照と比較して、血漿トリグリセリドの減少を示した。

【0362】

トランスアミナーゼALTおよびASTにおける増加は肝毒性を意味することが出来る。siRNA二本鎖で処理したマウスで測定されたトランスアミナーゼレベルは、生理食塩水処理対照と比較して、肝毒性を示すレベルにまで上昇しなかった。ISIS116847の12.5 mg/kg用量での処理は、ALTおよびASTレベルにおいてそれぞれ約7倍と3倍の増加を引き起こした。ISIS116847のより低い用量(6.25 mg/kg)での処理は、ALTおよびASTレベルにおいてそれぞれ約4倍と2倍の増加を引き起こした。

10

【0363】

研究の最後で、肝臓、白色脂肪組織(WAT)、脾臓および腎臓を、前記オリゴマー化合物で処理した動物から回収し、全体の器官変化を推定するために重量を測定した。各治療群に対するおおよその平均組織重量は以下の表に示した。

【0364】

【表41】

正常マウスにおけるPTENを標的化した
化学的修飾siRNAの組織重量への影響

20

処理	用量(mg/kg, 2x/日で投与)	肝臓	WAT	脾臓	腎臓
		組織重量(g)			
生理食塩水	該当なし	1.0	0.5	0.1	0.3
ISIS 116847	12.5	1.1	0.4	0.1	0.3
	6.25	1.1	0.4	0.1	0.3
ISIS 341391/341401	25	1.0	0.3	0.1	0.3
	6.25	0.9	0.4	0.1	0.3
ISIS 359996/359995	25	1.1	0.4	0.1	0.3
	6.25	1.0	0.3	0.1	0.4

30

【0365】

示されたように、PTENを標的化したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNA二本鎖での処理では、生理食塩水のみで処理したマウスの器官重量と比較して、正常マウスにおける肝臓、WAT、脾臓または腎臓重量は実質的に変化しなかった。

【実施例38】

【0366】

PTENを標的化した化学的に修飾されたsiRNA: *in vivo* 研究
6~7週齢Balb/cマウス(Jackson Laboratory, メイン州Bar Harbor)に、PTENを標的化した化合物を注射した。各処理群は4匹の動物から成る。動物は腹腔内注射を介して1日2回4.5日間、動物当たり全9回投与した。生理食塩水注射動物をネガティブコントロールとした。動物は最後の用量が投与された後6時間で屠殺し、血漿サンプルおよび組織を回収した。肝臓における標的減少も本研究の終了時に測定した。

40

【0367】

各処理の2つの用量をテストした。5'-10-5ギャップマーであるISIS116847(5'-CTGCTAGCCTCTGGATTTGA-3'、配列ID番号:63)

50

での処理では、12.5 mg/kgの用量を1日2回、または6.25 mg/kgを1日2回投与した。以下に記載されたsiRNAコンストラクトは、25 mg/kgで1日2回または6.25 mg/kgで1日2回投与した。各siRNAは以前の実施例のようにアンチセンス鎖および相補的センス鎖で構成されており、前記アンチセンス鎖はマウスPTENを標的化している。ISIS116847および本実験の全てのsiRNAも、ヒトPTENに対して完全な相補性を有している。

【0368】

PTENを標的化したsiRNA二本鎖は、アンチセンス鎖ISIS341391(5'-UUGUCUCUGGUCUACUU-3'、配列ID番号:26)およびセンス鎖ISIS341401(5'-AAGUAAGGACCAGAGACAA-3'、配列ID番号:27)から成る。ISIS341391/ISIS341401二本鎖の両鎖は、ホスホジエステルインターヌクレオシド結合を有するリボヌクレオシドから成る。

10

【0369】

ヒトPTENを標的化した別のsiRNA二本鎖は、アンチセンス鎖ISIS342851(5'-UUUGUCUCUGGUCUACUU-S'、配列ID番号:40)およびセンス鎖ISIS308746(5'-AAGUAAGGACCAGAGACAAA-3'、配列ID番号:39)から成る。前記アンチセンス鎖ISIS342851は、太字で示されたように、1、2、3、5、16、18、19および20位で4'-チオリボースヌクレオシドを有する中心RNA領域から成る。センス鎖ISIS308746はリボヌクレオシドから成り、ISIS342851/308746二本鎖の両鎖は全体

20

【0370】

肝臓におけるPTEN mRNAレベルは、以前の実施例に教示されたようにリアルタイムPCRおよびRIBOGREEN(商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. オレゴン州 Eugene)を用いて、本研究の最後に測定した。PTEN mRNAレベルは、生理食塩水処理対照で規準化する前に、総RNAまたはGAPDH発現に対して決定した。結果は生理食塩水注射対照で規準化された、各処理群に対するmRNA発現の平均%阻害として以下の表に示した。

【0371】

【表42】

30

マウス肝臓におけるPTENを標的化した
化学的修飾siRNAによる標的減少

処理	用量 (mg/kg, 2x/日で投与)	% 阻害	
		リボグリン	GAPDH
ISIS 116847	12.5	92	95
	6.25	92	95
ISIS 342851/308746	25	11	18
	6.25	7	15
ISIS 341391/341401	25	12	21
	6.25	2	9

40

【0372】

上の表に示されたように、PTENを標的化したオリゴヌクレオチドは生理食塩水処理対照と比較して、mRNAレベルにおける減少を生じた。ISIS341391/341401二本鎖に対して測定されたmRNAレベルも用量依存性阻害を示唆するものであった。

【0373】

50

血漿グルコースレベルに対するRNA二本鎖での処理の効果は上記のように処理したマウスにおいて評価した。グルコースレベルはルーティンな臨床解析機（例えばAscencia Glucometer Elite XL, ニューヨーク州Bayer, Tarrytown）を用いて測定した。おおよその平均血漿グルコースは各処理群に対して以下の表に示した。

【0374】

【表43】

正常マウスにおけるPTENを標的化した化学的修飾siRNAの

血漿グルコースレベルに対する影響

処理	用量 (mg/kg, 2x/日で投与)	血漿グルコース (mg/dL)
生理食塩水	該当なし	186
ISIS 116847	12.5	169
	6.25	166
ISIS 342851/308746	25	167
	6.25	173
ISIS 341391/341401	25	159
	6.25	182

10

20

【0375】

PTEN mRNAを標的化したIn vivo siRNAに起因する生理学的効果を推定するために、前記マウスの血漿トリグリセリド、血漿コレステロール、および血漿トランスアミナーゼレベルを処理期間の最後に評価した。血漿トリグリセリド、コレステロール、およびトランスアミナーゼレベルを測定するためにルーティンな臨床解析機（例えばOlympus Clinical Analyzer, ニューヨーク州Melville）を使用した。ISIS 116847のいずれかの用量で処理した動物からの血漿コレステロールレベルは、生理食塩水処理動物で測定されたレベルの約20%以上増加した。反対に、ISIS 341391/341401二本鎖の25 mg/kgまたは6.25 mg/kgで処理した動物で測定したコレステロールレベルは、生理食塩水処理対照と比較して約12%減少した。他の処理では、コレステロールレベルにおいて実質的な変化を引き起こさなかった。全ての治療群は治療用量に関係なく、生理食塩水処理対照と比較して、血漿トリグリセリドの減少を示した。

30

【0376】

トランスアミナーゼALTおよびASTにおける増加は肝毒性を意味することが出来る。siRNA二本鎖で処理したマウスで測定されたトランスアミナーゼレベルは、生理食塩水処理対照と比較して、肝毒性を示すレベルにまで上昇しなかった。ISIS 116847の12.5 mg/kg用量での処理は、ALTおよびASTレベルにおいてそれぞれ約7倍と3倍の増加を引き起こした。ISIS 116847のより低い用量（6.25 mg/kg）での処理は、ALTおよびASTレベルにおいてそれぞれ約4倍と2倍の増加を引き起こした。

40

【0377】

研究の最後で、肝臓、白色脂肪組織（WAT）、脾臓および腎臓を、前記オリゴマー化合物で処理した動物から回収し、全体の器官変化を推定するために重量を測定した。各治療群に対するおおよその平均組織重量は以下の表に示した。

【0378】

50

【表 4 4】

正常マウスにおける PTEN を標的化した化学的修飾 siRNA の
組織重量に対する影響

処理	用量 (mg/kg, 2x/日で投与)	肝臓	WAT	脾臓	腎臓
		組織重量 (g)			
生理食塩水	該当なし	1.0	0.5	0.1	0.3
ISIS 116847	12.5	1.1	0.4	0.1	0.3
	6.25	1.1	0.4	0.1	0.3
ISIS 342851/308746	25	1.0	0.3	0.1	0.3
	6.25	0.9	0.4	0.1	0.3
ISIS 341391/341401	25	1.0	0.3	0.1	0.3
	6.25	0.9	0.4	0.1	0.3

10

【0379】

示されたように、PTENを標的化したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは siRNA 二本鎖での処理では、生理食塩水のみで処理したマウスの器官重量と比較して、正常マウスにおける肝臓、WAT、脾臓または腎臓重量は実質的に変化しなかった。

20

【実施例 39】

【0380】

マウス血漿中の交互 2' - O - メチル / 2' - フルオロ siRNA コンストラクトの安定性

無傷二本鎖 RNA は、以前に記載された方法 (Leeds et al., Anal. Biochem., 1996, 235, 36-43; Geary, Anal. Biochem., 1999, 274, 241~248) と同様な抽出およびキャピラリー電気泳動方法を用いて、希釈マウス血漿から解析した。3~6月齢メス Balb/c (Charles River Labs) からのマウスヘパリン-処理マウス血漿は、-80 から解凍し、25% (v/v) までリン酸緩衝生理食塩水 (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM リン酸カリウム, 10 mM リン酸ナトリウム) で希釈した。約 10 n mol のプレアニーリング siRNA を 100 μM の濃度で、25% 血漿に添加し、37 で 0、15、30、45、60、120、180、240、360、および 420 分間インキュベートした。一定量を指示された時間に取り、最終濃度の 2 mM まで EDTA で処理し、キャピラリーゲル電気泳動 (eCap DNA キャピラリーチューブを有する Beckman P/ACE MDQ-UV) で解析するまで氷上に放置した。siRNA 二本鎖ピークの領域を測定し、残りの無傷 siRNA のパーセントを計算するために使用した。アデノシントリリン酸 (ATP) を、内部キャリブレーション標準として各注射に対して 2.5 mM の濃度で添加した。ゼロ時点は、キャピラリー電気泳動の後のリン酸緩衝生理食塩水で siRNA を希釈する時点とする。パーセント無傷 siRNA は時間に対してプロットし、これによって仮性一次半減期の計算を可能となる。結果は以下の表に示した。ISIS 338918 (UCUUAUCACCUUUAGCUCUA 配列 ID 番号: 54) および ISIS 338943 は全体にホスホジエステル結合を有する非修飾 RNA 鎖である。本明細書の他の例において、ISIS 351831 は $U_m C_f U_m U_f A_m U_f C_m A_f C_m C_f U_m U_f U_m A_f G_m C_f U_m C_f U_m$ として、ISIS 351832 は $A_f G_m A_f G_m C_f U_m A_f A_m A_f G_m G_f U_m G_f A_m U_f A_m A_f G_m A_f$ として注釈をつけた。

30

40

【0381】

【表 4 5】
マウス血漿における交互 2'-O-メチル/2'-フルオロ siRNA コンストラクトの安定性

コンストラクト	配列 ID 番号	% 無傷 siRNA								
		時間 (分)								
		0	15	30	45	60	120	180	240	360
338918_338943	54 及び 55	76.98	71.33	49.77	40.85	27.86	22.53	14.86	4.18	0
351831_351832	58 及び 59	82.42	81.05	79.56	77.64	75.54	75.55	75.56	75.55	75

【 0 3 8 2 】

親 (非修飾) コンストラクトは、30 分後に約 50 % 分解され、4 時間後にはほぼなくなった (6 時間で完全になくなった)。反対に、交互 2'-O-メチル/2'-フルオロ コンストラクトは比較的变化せずに残り、6 時間後でも 75 % 残っていた。

【 実施例 4 0 】

【 0 3 8 3 】

ヒトグリア芽細胞腫異種移植腫瘍モデルにおけるサバイピン発現の *In vivo* 阻害
U-87MG ヒトグリア芽細胞腫異種移植腫瘍モデル (Kiaris et al., 2000, May-Jun; 2(3): 242~50) は、本発明の選択された組成物の抗腫瘍活性を示すために使用した。全 8 CD1nu/nu (Charles River) マウスを各群に対して使用した。移植のために、腫瘍細胞をトリプシン処理し、PBS で洗浄し、DMEM 中 4×10^6 細胞/mL で PBS へ再懸濁した。移植の直前に、動物を照射 (450 TBI) し、細胞をマトリゲルと混合した (1:1)。0.2 mL 容量の全 4×10^6 腫瘍細胞を各マウスの左背面側面において皮下 (s.c.) に注射した。選択された二本鎖組成物 (0.9% NaCl に溶解、注射段階)、または溶媒 (0.9% NaCl) での処理は、腫瘍細胞移植後 4 日で開始した。前記組成物は、1 日目は 8 時間おいて、2 日目は 4 時間おいて、0.2 mL 容量で静脈内 (i.v.) に投与した。組織 (腫瘍、肝臓、腎臓、血漿) を最後の投与後 2 時間で回収した。各群の 8 匹の動物からの腫瘍はウエスタン評価のためにホモジナイズした。サバイピンレベルを決定し、生理食塩水対照と比較した。

【 0 3 8 4 】

【 表 4 6 】

配列 ID 番号/ISIS 番号	配列 5'-3'
24/343868 (as)	UUUGAAAAUGUUGAUCUCC
25/343867 (s)	GGAGAUCACAUAUUUCAA
24/355713 (as)	U _m U _f U _m G _f A _m A _f A _m A _f U _m G _f U _m U _f G _m A _f U _m C _f U _m C _f C _m
25/355714 (s)	G _f G _m A _f G _m A _f U _m C _f A _m A _f C _m A _f U _m U _f U _m U _f C _m A _f A _m A _f
24/353537 (as)	U _i U _i U _i GAAAAUGUUGAUCU _i C _i C _i
25/343868 (s)	GGAGAUCACAUAUUUCAA
24/352506 (as)	UUUGAA _m A _m AUG _m U _m UGAUCU _m C _m C _m
25/352514 (s)	GG _e AG _e AU _e CA _e AC _e AU _e UU _e UC _e AA _e A

【 0 3 8 5 】

10

20

30

40

【表 4 7】

二本鎖コンストラクト		活性
アンチセンス	センス	サバイビンの阻害%
343868	343867	なし
355713	355714	60
353537	343868	48
352506	352514	44

10

【0386】

このデータは、修飾化学は、非修飾コンストラクトでは見られない活性化を生じるコンストラクトを安定化するために使用され得ることを示している。

【0387】

本明細書で記載されたものに加えて本発明の様々な修正は、前述の記載から本分野の当業者に理解されるであろう。そのような修正は添付された請求項の観点内であることも意図している。本明細書で引用された各参考文献（これに限定されるものではないが、雑誌記事、米国および非米国特許、特許明細書、国際出願明細書、遺伝子バンクアクセス番号、およびそれらと同等なものを含む）の全体は、この参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【配列表】

[2008501693000001.xml](#)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 C 1 2 N 15/00 A

(31) 優先権主張番号 60/584,045
 (32) 優先日 平成16年6月29日(2004.6.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/607,927
 (32) 優先日 平成16年9月7日(2004.9.7)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 10/946,147
 (32) 優先日 平成16年9月20日(2004.9.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

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

(72) 発明者 ブラカッシュ、ターザ、ピー。
 アメリカ合衆国、9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールスバッド、ペアー ツリー ドライブ 6 9 2 8
 (72) 発明者 ダンデ、ブラサッド
 アメリカ合衆国、9 2 0 0 8 カリフォルニア州、カールスバッド、アパートメント エー 1 3、
 パイン アベニュー 3 4 8
 (72) 発明者 アラーソン、チャールズ
 アメリカ合衆国、9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールスバッド、ビーチ クレスト コート 9 7 1
 (72) 発明者 グリッフィー、リチャード
 アメリカ合衆国、9 2 0 8 4 カリフォルニア州、ピスタ、バースビー ストリート 3 6 0
 (72) 発明者 スウェイジ、エリック、イー。
 アメリカ合衆国、9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールスバッド、パレンキー ストリート 7 7 8 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA05 CA06 DA03 HA14
 4B063 QA01 QA08 QQ08 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34
 4C057 AA17 AA18 BB02 BB03 DD01 MM02 MM04 MM09
 4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZB21 ZC41