

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-501155

(P2015-501155A)

(43) 公表日 平成27年1月15日(2015.1.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G	4 C O 8 4
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-539019 (P2014-539019)	(71) 出願人	595104323 アイシス ファーマシューティカルズ、 インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州9201 0、カールズバッド、ガゼル コート 2 855
(86) (22) 出願日	平成24年10月25日(2012.10.25)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月24日(2014.4.24)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/061984	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(87) 国際公開番号	W02013/063313	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(87) 国際公開日	平成25年5月2日(2013.5.2)		
(31) 優先権主張番号	61/551, 378		
(32) 優先日	平成23年10月25日(2011.10.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G C C R 発現のアンチセンス調整

(57) 【要約】

本明細書中で、動物において G C C R mRNA 及びタンパク質の発現を低下させるための、方法、化合物及び組成物が提供される。このような方法、化合物及び組成物は、代謝性疾患、例えば糖尿病又はその症状を処置するか、予防するか、遅延させるか又は改善するために有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 4 ~ 56 のいずれか 1 つの少なくとも 8 個の連続核酸塩基部分を備える核酸塩基配列を有する 12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 90 % 相補性である、化合物。

【請求項 2】

12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 36、6、7、10、11、33、35、39、42、又は 43 の内のいずれか 1 つの少なくとも 8 個の核酸塩基部分を備える核酸塩基配列を有する 12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が配列番号 1 に対して少なくとも 90 % 相補的である、化合物。

10

【請求項 3】

配列番号 1 の核酸塩基 57825 ~ 57844、59956 ~ 59975、63677 ~ 63696、65938 ~ 65957、65939 ~ 65958、65940 ~ 65959、76224 ~ 76243、76229 ~ 76248、76255 ~ 76274 又は 95513 ~ 95532 の核酸塩基の等長部分に相補的な少なくとも 8 個の核酸塩基部分を備える核酸塩基配列を有する 12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 90 % 相補的である、化合物。

20

【請求項 4】

1 本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる、請求項 1、2、又は 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号 1 と少なくとも 95 % 相補的である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 6】

前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号 1 と少なくとも 96 % 相補的である、請求項 1、2 又は 3 に記載の化合物。

【請求項 7】

前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号 1 と少なくとも 97 % 相補的である、請求項 1、2、又は 3 に記載の化合物。

30

【請求項 8】

前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号 1 と少なくとも 98 % 相補的である、請求項 1、2 又は 3 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 と少なくとも 99 % 相補的である、請求項 1、2、又は 3 に記載の化合物。

【請求項 10】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 と少なくとも 100 % 相補的である、請求項 1、2、又は 3 に記載の化合物。

40

【請求項 11】

少なくとも 1 個のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 12】

各ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

前記修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 個のヌクレオシドが修飾糖を備える、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 14】

50

前記少なくとも1個の修飾糖が二環性糖である、請求項13に記載の化合物。

【請求項15】

前記少なくとも1個の二環性糖のそれぞれが、 $4' - (CH_2) - O - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_2 - O - 2'$ 又は $4' - CH(CH_3) - O - 2'$ 基を備える、請求項14に記載の化合物。

【請求項16】

前記少なくとも1個の二環性糖のそれぞれが、 $4' - CH(CH_3) - O - 2'$ 架橋を備える、請求項14に記載の化合物。

【請求項17】

少なくとも1個の修飾糖が、 $2' - O -$ メトキシエチル基を備える、請求項13に記載の化合物。 10

【請求項18】

少なくとも1個のヌクレオシドが修飾核酸塩基を備える、請求項1～請求項17のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項19】

前記修飾核酸塩基が、5-メチルシトシンである、請求項18に記載の化合物。

【請求項20】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、：

連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと、

連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと、 20

連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと

を備え、

前記ギャップセグメントが、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、修飾糖を備える、

請求項1～19のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項21】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、

10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと、

5個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと、

5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと 30

を備え、

前記ギャップセグメントが、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を備える、

請求項20に記載の化合物。

【請求項22】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、

13個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと、

2個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと、

5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと 40

を備え、

前記ギャップセグメントが、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を備える、

請求項20に記載の化合物。

【請求項23】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、

14個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと、

3個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと、

3個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと

を備え、

前記ギャップセグメントが、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間 50

に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を備える、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 24】

各ウイングセグメントが、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合である、請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 25】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、14 から 25 個の連結ヌクレオシドからなる、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 26】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、17 から 21 個の連結ヌクレオシドからなる、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 27】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、18 から 21 個の連結ヌクレオシドからなる、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 28】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、20 個の連結ヌクレオシドからなる、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 29】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42、又は 43 の核酸塩基配列いずれからなる、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 30】

配列番号 36 の核酸塩基配列を有する 20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、

前記修飾オリゴヌクレオチドが、

10 個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと、

5 個の連結ヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメントと、

5 個の連結ヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメントと

を備え、

前記ギャップセグメントが、5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントとの間に置かれ、

各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、

前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合であり、

前記修飾オリゴヌクレオチドの各シトシン残基が 5-メチルシトシンである、化合物。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 30 に記載の化合物又はその塩のうちのいずれか 1 つの化合物、及び薬学的に許容可能な担体もしくは希釈剤の内の少なくとも 1 つを含む、組成物。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 31 に記載の化合物又は組成物のいずれか 1 つを、動物に投与することを含む方法。

【請求項 33】

前記動物がヒトである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記化合物を投与することが、代謝性疾患又は状態の進行を、予防するか、処置するか、改善するか又は遅延させる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記疾患又は状態が糖尿病である、請求項 34 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 36】
前記疾患又は状態が2型糖尿病である、請求項34に記載の方法。
- 【請求項 37】
動物において血糖値を低下させる方法であって、請求項1に記載の化合物を前記動物に投与することを備える、方法。
- 【請求項 38】
前記動物がヒトである、請求項37に記載の方法。
- 【請求項 39】
前記血糖値が血漿グルコース値又は血清グルコース値である、請求項37に記載の方法
。
- 【請求項 40】
前記動物が糖尿病の動物である、請求項37に記載の方法。
- 【請求項 41】
動物においてGCCRが関連する疾患又は状態の発症を予防、回復又は遅延させる方法であって、治療的又は予防的有効量の請求項1～31のいずれか1項に記載の化合物又は組成物を前記動物に投与することを備える、方法。
- 【請求項 42】
前記動物がヒトである、請求項41に記載の方法。
- 【請求項 43】
前記疾患が代謝性疾患である、請求項41に記載の方法。 20
- 【請求項 44】
前記疾患又は状態が糖尿病である、請求項41に記載の方法。
- 【請求項 45】
前記疾患又は状態が2型糖尿病である、請求項41に記載の方法。
- 【請求項 46】
動物において血糖値上昇を低下させる方法であって、治療的又は予防的有効量の請求項1～31のいずれか1項に記載の化合物又は組成物を前記動物に投与することを備える、方法。
- 【請求項 47】
前記動物がヒトである、請求項46に記載の方法。 30
- 【請求項 48】
前記血糖値が血漿グルコース値又は血清グルコース値である、請求項46に記載の方法
。
- 【請求項 49】
前記動物が糖尿病の動物である、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 50】
前記化合物又は組成物及び第二の薬剤を同時投与することを備える、請求項46に記載の方法。
- 【請求項 51】
前記第二の薬剤が血糖降下剤である、請求項50に記載の方法 40
- 【請求項 52】
前記化合物又は組成物及び前記第二の薬剤が併用投与される、請求項51に記載の方法
。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
配列リスト
本願は、電子化された配列表とともに提出されている。本配列表は、393Kbサイズであり、2012年9月19日作成のBIOL0159WSEQ.txtという名称のファイルとして提供される。本配列表の電子化情報はその全体において参照により本明細 50

書中に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本明細書中で、動物においてGCCR mRNA及びタンパク質の発現を低下させるための、方法、化合物及び組成物が提供される。このような方法、化合物及び組成物は、例えば、代謝性障害と関連する疾患、特に糖尿病と関連する障害を、処置するか、予防するか、遅延させるか又は改善するために有用である。

【背景技術】

【0003】

糖尿病は、インスリン分泌不全及び/又は作用不全により特徴付けられる慢性の代謝性障害である。2型糖尿病(T2DM)では、インスリン抵抗性により、インスリンが糖新生の酵素の活性を制御できなくなり、多くの対象はまた、飢餓状態及び食後状態において不適切なレベルの循環グルカゴン(GC)を示す。グルカゴンは膵島の β -細胞から分泌され、肝臓グルコース産生の調整を通じてグルコースホメオスタシスを制御する(Quesada et al., J. Endocrinol. 2008. 199: 5-19)。

10

【0004】

グルカゴンは、グルココルチコイド受容体(GCCR)の活性化を介して標的組織においてその作用を発揮する。グルココルチコイド受容体は、受容体のクラスB G-タンパク質共役ファミリーのメンバーである62kDaタンパク質である(Brubaker et al., Recept. Channels. 2002. 8: 179-88。GCCR活性化は、Gタンパク質(G_s 及び G_q)によるシグナル伝達へと導き、それにより G_s はアデニル酸シクラーゼを活性化し、これがcAMP産生を引き起こし、その結果、タンパク質キナーゼAのレベルが上昇する。肝臓でのGCCRシグナル伝達の結果、グリコーゲン生成の阻害とともにグリコーゲン分解及び糖新生の誘導によって肝臓グルコース産生が増加する(Jiang and Zhang. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003. 284: E671-E678。GCCRはまた、心臓、腸管平滑筋、腎臓、脳及び脂肪組織を含む肝外の組織でも発現される(Hansen et al., Peptides. 1995. 16: 1163-1166)。

20

30

【0005】

GCCR阻害剤の開発は、視床下部-下垂体-副腎系(HPA)軸の活性化を含む、全身性GCCRの阻害に関連した望ましくない副作用により妨げられている。脳のGCCR活性の阻害は、副腎皮質ステロイドの分泌物のフィードバック制御および結果としての増加により、副腎皮質刺激ホルモンの循環の増加を引き起こす可能性がある(Philibert et al., Front. Horm. Res. 1991. 19: 1-17)。副腎皮質刺激ホルモンの循環の増加は、次いで、無数の慢性ステロイド関連の負の副作用をもたらす。他の研究では、GCCRの特異的不活性化により飢餓状態を延長させると低血糖となることが実証されている(Opherke et al., Mol. Endocrinol. 2004. 18: 1346-1353)。

40

【0006】

前臨床モデルにおいて、以前から、GCCRアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与により、CNSまたは副腎におけるGCCR mRNAのレベルに影響を与えることなく、肝臓および脂肪性組織中での組織に特異的な蓄積ならびにGCCR発現の低減といった結果となることが実証されている(国際公開番号第2005/071080号; 国際公開番号第2007/035759号)。したがって、GCCR mRNA発現のアンチセンス阻害は、HPA軸を活性化することなく、高血糖および高脂血症を改善することが示されてきた。本発明は、GCCR発現を調整する組成物および方法を提供する。GCCR発現を調整するためのアンチセンス化合物は、上述の公開特許公報に開示されている。しかしながら、さらに化合物を改善し続ける必要がある。本明細書に記載した化合物および処

50

置方法は、G C C R 関連障害に現在利用可能な処置の選択に関して有意な利点を提供する。

【0007】

特許、特許出願、論文、書籍及び契約書を含むが限定されない、本願で引用される全文書又は文書の一部は、本明細書中で論じられる文書の一部に対して、ならびにそれらの全体において、参照により明確に本明細書によって組み込まれる。

【発明の概要】

【0008】

本明細書中で、G C C R の発現を調整し、代謝性障害に関連する疾患、特に糖尿病と関連する障害及び/又はその症状を、処置するか、予防するか、遅延させるか又は改善するための、方法、化合物及び組成物が提供される。

10

【発明を実施するための形態】

【0009】

詳細な説明

前述の全般的な説明及び次の詳細な説明は両方とも、例示的及び説明的なものに過ぎず、主張されるとおり、本明細書中に記載の制限となるものではないことを理解されたい。本明細書中で単数形の使用は、別段の具体的な断りがない限り、複数形を含む。本明細書中で使用される場合、「又は」の使用は、別段の断りがない限り、「及び/又は」を意味する。さらに、「含むこと」ならびに他の形態、例えば「含む」及び「含まれる」という用語の使用は限定ではない。また、具体的に別段の断りがない限り、「エレメント」又は「構成要素」などの用語は、1単位を備えるエレメント及び構成要素ならびに複数のサブユニットを備えるエレメント及び構成要素の両方を包含する。

20

【0010】

本明細書中で使用されるセクション見出しは、構成的な目的のためであり、記載される主題を限定するものと解釈されるものではない。特許、特許出願、論文、書籍及び契約書を含むが限定されない、本願で引用される全文書又は文書の一部は、本明細書中で論じられる文書の一部に対して、ならびにそれらの全体において、参照により明確に本明細書によって組み込まれる。

【0011】

定義

具体的な定めが与えられない限り、本明細書に記載の分析化学、合成有機化学及び薬剤及び薬化学に関して使用される命名法及びこれらの手順及び技術は、周知のものであり、当技術分野で一般的に使用されるものである。化学合成及び化学分析に対しては、標準的な技術が使用され得る。認められる場合、全特許、出願文書、公開出願及び他のジャーナル刊行物、GENBANK 受託番号及び National Center for Biotechnology Information (NCBI) などのデータベースを通じて得ることができる関連配列情報及び本明細書中の開示を通じて参照される他のデータを含むが限定されない、本願で引用される全文書又は文書の一部は、本明細書中で論じられる文書の一部に対してならびにそれらの全体において、参照により組み込まれる。

30

【0012】

別段の断りがない限り、次の用語は次の意味を有する：

40

【0013】

「2'-O-メトキシエチル」(2'-MOE 及び 2'-O(CH₂)₂-OCH₃ でもある)は、フロシル環の2'位のO-メトキシ-エチル修飾を指す。2'-O-メトキシエチル修飾糖は修飾糖である。

【0014】

「2'-O-メトキシエチルヌクレオチド」は、2'-O-メトキシエチル修飾糖部分を備えるヌクレオチドを意味する。

【0015】

「3'標的部位」は、特定のアンチセンス化合物の3'-モストヌクレオチドに相補的

50

である標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0016】

「5'標的部位」は、特定のアンチセンス化合物の5'-モストヌクレオチドに相補的である標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0017】

「5-メチルシトシン」は、5'位に連結されるメチル基で修飾されたシトシンを意味する。5-メチルシトシンは修飾核酸塩基である。

【0018】

「約」は、ある値の±10%以内を意味する。例えば、「マーカーが約50%上昇し得る」ことが述べられる場合、そのマーカーが45%から55%上昇し得ることが示唆される。

10

【0019】

「活性医薬剤」は、個体に投与された場合に治療的有益性を提供する医薬組成物中の物質を意味する。例えば、ある一定の実施形態において、GCCRに対して標的化されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、活性医薬剤である。

【0020】

「活性標的領域」又は「標的領域」は、1以上の活性アンチセンス化合物が標的化される領域を意味する。「活性アンチセンス化合物」は、標的核酸レベル又はタンパク質レベルを低下させるアンチセンス化合物を意味する。

【0021】

「脂肪症」又は「肥満」は、肥満しているか又は除脂肪量に対して体脂肪又は脂肪組織が過剰に高い量である状態を指す。体脂肪量は、身体全体の脂肪分布及び脂肪組織沈着の大きさ及び質量の両方に対する関心を含む。体脂肪分布は、皮下脂肪測定、ウエスト・ヒップ周囲比又は超音波、コンピューター断層撮影もしくは磁気共鳴イメージングなどの技術によって推定され得る。米国疾病管理予防センターによれば、ボディ・マス・インデックス(BMI)が30以上である者は肥満とみなされる。「肥満」という用語は、本明細書中で使用される場合、身体における脂肪組織の過剰な蓄積の結果として生理的要求を超えた体脂肪増加がある状態を含む。「肥満」という用語は、次の状態：成人発症肥満；食事性肥満；内因性又は炎症性肥満；内分泌肥満；家族性肥満；過剰インスリン性肥満；過形成-肥厚性肥満；性腺機能低下肥満；甲状腺機能低下症性肥満；終生肥満；病的肥満及び外因性肥満を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0022】

「併用投与される」は、2種類の薬剤療法の薬理学的効果が同時に患者において現れる何らかの方式での2種類の薬剤の同時投与を指す。併用投与は、両薬剤が単一の医薬組成物中で、同じ剤形で、又は同じ投与経路により投与されることを必要としない。両薬剤の効果は、それ自身同時に現れる必要はない。この効果は、しばらく重複することのみ必要であり、同時に存在する必要はない。

【0023】

「投与すること」は、動物に薬剤を提供することを意味し、医療専門家による投与及び自己投与を含むがこれらに限定されない。

40

【0024】

「薬剤」は、動物に投与された場合に治療的有益性を提供し得る活性物質を意味する。「第一の薬剤」は、本明細書中で提供される治療用化合物を意味する。例えば第一の薬剤は、GCCRを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。「第二の薬剤」は、本明細書中に記載の第二の治療用化合物(例えばGCCRを標的とする第二のアンチセンスオリゴヌクレオチド)及び/又は非GCCR治療用化合物を意味する。

【0025】

「改善」は、関連疾患、障害又は状態の少なくとも1つの指標、兆候又は症状の緩和を指す。指標の重症度は当業者にとって公知である自覚的又は他覚的尺度によって決定され得る。

50

【 0 0 2 6 】

「動物」は、ヒト、又は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ及び、サル及びチンパンジーを含むが限定されない非ヒト霊長類を含むが限定されない、非ヒト動物を指す。

【 0 0 2 7 】

「アンチセンス活性」は、アンチセンス化合物のその標的核酸へのハイブリッド形成に起因する何らかの検出可能な又は測定可能な活性を指す。ある一定の実施形態において、アンチセンス活性は、標的核酸又はこのような標的核酸によりコードされるタンパク質の量又は発現の低下である。

【 0 0 2 8 】

「アンチセンス化合物」は、水素結合を通じて標的核酸とハイブリッド形成することが可能なオリゴマー性化合物を意味する。

【 0 0 2 9 】

「アンチセンス阻害」は、アンチセンス化合物の非存在下での標的核酸レベル又は標的タンパク質レベルと比較した、標的核酸に相補的なアンチセンス化合物存在下での標的核酸レベル又は標的タンパク質レベルの低下を意味する。

【 0 0 3 0 】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸の対応する領域又はセグメントに対するハイブリッド形成を可能にする核酸塩基配列を有する 1 本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

【 0 0 3 1 】

「二環性糖」は、2 個の非ジェミナル環原子の架橋によって修飾されたフロシル環を意味する。二環性糖は修飾糖である。

【 0 0 3 2 】

「二環性核酸」又は「BNA」は、ヌクレオシド又はヌクレオチドを指し、ここでヌクレオシド又はヌクレオチドのフラノース部分は、フラノース環上の 2 個の炭素原子を連結し、それによって二環式環系を形成する架橋を含む。

【 0 0 3 3 】

「キャップ構造」又は「末端キャップ部分」は、アンチセンス化合物の何れかの末端で組み込まれている化学修飾を意味する。

【 0 0 3 4 】

「化学的に別個の領域」は、同じアンチセンス化合物の別の領域と何らかの形で化学的に異なるアンチセンス化合物の領域を指す。例えば、2' - O - メトキシエチルヌクレオチドを有する領域は、2' - O - メトキシエチル修飾がないヌクレオチドを有する領域と化学的に別個である。

【 0 0 3 5 】

「キメラアンチセンス化合物」は、少なくとも 2 つの化学的に別個の領域を有するアンチセンス化合物を意味する。

【 0 0 3 6 】

「同時投与」は、個体への 2 以上の薬剤の投与を意味する。この 2 以上の薬剤は、単一医薬組成物中であってもよいし、又は個別の医薬組成物中であってもよい。この 2 以上の薬剤のそれぞれは、同じか又は異なる投与経路を通じて投与され得る。同時投与は、並行又は連続投与を包含する。

【 0 0 3 7 】

「コレステロール」は、全動物組織の細胞膜で見出されるステロール分子である。コレステロールは、動物の血漿中で、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、中密度リポタンパク質 (IDL)、低密度リポタンパク質 (LDL) 及び高密度リポタンパク質 (HDL) を含むリポタンパク質を通じて輸送されなければならない。「血漿コレステロール」は、血漿又は血清中に存在するエステル化及び / 又は非エステル化コレステロールの全リポタンパク質 (VLDL、IDL、LDL、HDL) の合計を指す。

10

20

30

40

50

【0038】

「相補性」は、第一の核酸の核酸塩基と第二の核酸の核酸塩基との間の対形成能を意味する。

【0039】

「連続核酸塩基」は、互いにすぐ隣接する核酸塩基を意味する。

【0040】

「デオキシリボヌクレオチド」は、ヌクレオチドの糖部分の2'位に水素を有するヌクレオチドを意味する。デオキシリボヌクレオチドは、何らかの様々な置換基で修飾され得る。

【0041】

「真性糖尿病」又は「糖尿病」は、病的な代謝及びインスリンレベルが不十分であるか又はインスリン感受性低下の結果起こる、異常に高い血糖（高血糖）を特徴とする症候群である。特徴的な症状は、高血糖値ゆえの過剰な尿産生（多尿）、尿量増加を代償しようとする過剰な喉の渇き及び液体摂取増加（多飲症）、眼の視覚に対する高血糖の影響による視力障害、原因不明の体重減少及び昏睡である。

【0042】

「糖尿病の脂質異常症」又は「脂質異常症のある2型糖尿病」は、2型糖尿病、並びに、一般的にはコレステロールおよびトリグリセリドなどの脂質上昇および低密度リポタンパク質（LDL）などのリポタンパク質、および小型高密度LDL粒子の増加を特徴とする状態を意味する。このような状態は、減少したHDL-Cにより特徴付けられても良い。

【0043】

「希釈剤」は、薬理学的活性を欠くが、医薬的に必要であるか又は所望される、組成物中の成分を意味する。例えば注射される組成物中の希釈剤は液体、例えば食塩水溶液であり得る。

【0044】

「脂質異常症」は、脂質及び/又はリポタンパク質過剰産生又は欠乏を含む脂質及び/又はリポタンパク質代謝の障害を指す。脂質異常症は、コレステロール及びトリグリセリドなどの脂質並びに低密度リポタンパク質（LDL）コレステロールなどのリポタンパク質の上昇により明らかになり得る。

【0045】

「投与単位」は、医薬剤が提供される形態、例えば丸剤、錠剤又は当技術分野で公知の他の投与単位を意味する。ある一定の実施形態において、投与単位は、凍結乾燥アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。ある一定の実施形態において、投与単位は、再構成アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。

【0046】

「用量」は、1回の投与又は指定の時間中に提供される医薬剤の指定の量を意味する。ある一定の実施形態において、1、2以上のボラス、錠剤又は注射において用量が投与され得る。例えば皮下投与が所望されるある一定の実施形態において、所望の用量は、単回注射により容易に対応され得ない体積を必要とし、従って所望の用量を達成するために2回以上の注射が使用され得る。ある一定の実施形態において、長時間にわたるか又は連続的な点滴によって医薬剤が投与される。用量は、時間、日、週又は月あたりの医薬剤の量として表され得る。

【0047】

「有効量」又は「治療的有效量」は、その薬剤を必要とする個体において所望の生理学的結果を達成するのに十分である活性医薬剤の量を意味する。有効量は、処置しようとする個体の健康及び身体状態、処置しようとする個体の分類群、組成物の処方、個体の医学的状态の評価及び他の関連因子に依存して個体間で変動し得る。

【0048】

「完全に相補的」又は「100%相補性」は、第一の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基

10

20

30

40

50

が第二の核酸の第二の核酸塩基配列において相補的核酸塩基を有することを意味する。ある一定の実施形態において、第一の核酸はアンチセンス化合物であり、標的核酸は第二の核酸である。

【0049】

「ギャップマー」は、RNaseH切断をサポートする複数のヌクレオシドを有する内部領域が1以上のヌクレオシドを有する外部領域間に位置するキメラアンチセンス化合物を意味し、ここで内部領域を備えるヌクレオシドは、外部領域を備えるヌクレオシドと化学的に別個である。内部領域は「ギャップセグメント」と呼ばれ得、外部領域は「ウイングセグメント」と呼ばれ得る。

【0050】

「ギャップ拡大」は、キメラアンチセンス化合物が、1から6個のヌクレオシドを有する5'及び3'ウイングセグメント間に置かれ、それらに直接隣接する12以上の連続的な2'-デオキシリボヌクレオシドのギャップセグメントを有することを意味する。

【0051】

「グルココルチコイド受容体」又は「GCCR」は、GCCRの何らかの核酸又はタンパク質を意味する。

【0052】

「GCCR発現」は、GCCRをコードする遺伝子から転写されるmRNAのレベル又はmRNAから翻訳されるタンパク質のレベルを意味する。GCCR発現は、ノザン又はウエスタンブロットなどの当技術分野で公知の方法によって決定され得る。

【0053】

「GCCR核酸」は、GCCRをコードする何らかの核酸を意味する。例えば、ある一定の実施形態において、GCCR核酸は、GCCRをコードするDNA配列、GCCRをコードするDNAから転写されるRNA配列（イントロン及びエクソンを備えるゲノムDNAを含む。）及びGCCRをコードするmRNA配列を含む。「GCCR mRNA」は、GCCRタンパク質をコードするmRNAを意味する。

【0054】

「グルコース」は、エネルギー源及び炎症中間体として細胞により使用される単糖である。「血漿グルコース」は、血漿中に存在するグルコースを指す。

【0055】

「ハイブリッド形成」は、相補的核酸分子のアニリングを意味する。ある一定の実施形態において、相補的核酸分子は、アンチセンス化合物及び標的核酸を含む。

【0056】

「高脂血症」又は「脂質異常症」は、血清脂質又は循環（血漿）脂質の上昇を特徴とする状態である。この状態は、異常に高い濃度の脂肪を示す。循環血液中の脂質分画は、コレステロール、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質及びトリグリセリドである。

【0057】

「高トリグリセリド血症」は、トリグリセリドレベル上昇を特徴とする状態を意味する。

【0058】

「同定する」又は「代謝疾患の動物を選択すること」は、代謝性疾患又は代謝性障害と診断されている対象を同定もしくは選択すること；又はメタボリックシンドローム、高血糖、高トリグリセリド血症、高血圧によるインスリン抵抗性上昇、インスリン感受性低下、正常値を上回る体重及び/又は正常値を上回る体脂肪又はこれらの何らかの組み合わせを含むがこれらに限定されない、代謝性疾患の何らかの症状を有する対象を同定又は選択することを意味する。このような同定は、標準的な臨床検査又は評価、例えば血清又は循環（血漿）血糖を測定すること、血清又は循環（血漿）トリグリセリドを測定すること、血圧を測定すること、体脂肪を測定すること、体重を測定することなどを含むがこれらに限定されない何らかの方法によって遂行され得る。

10

20

30

40

50

【0059】

「直接隣接した」は、直接隣接したエレメント間に介入エレメントがないことを意味する。

【0060】

「個体」、「対象」又は「動物」は、処置又は治療に対して選択されるヒト又は非ヒト動物を意味する。

【0061】

「発現又は活性を阻害する」は、RNA又はタンパク質の発現又は活性の低下又は阻止を指し、必ずしも発現又は活性の全消失を示すものではない。

【0062】

「インスリン抵抗性」は、正常量のインスリンが、脂肪、筋肉及び肝臓細胞からの正常なインスリン応答を生じさせるのに不十分である状態として定義される。脂肪細胞でのインスリン抵抗性の結果、貯蔵トリグリセリドの加水分解が起こり、これが血漿中の遊離脂肪酸を増加させる。筋肉でのインスリン抵抗性は、グルコース取り込みを低下させ、その一方、肝臓でのインスリン抵抗性はグルコース貯蔵を減少させ、両影響とも血糖を上昇させるように働く。インスリン抵抗性によるインスリン及びグルコースの高血漿レベルは、メタボリックシンドローム及び2型糖尿病を誘導することが多い。

【0063】

「インスリン感受性」は、個体がどれだけ効果的にグルコースを処理するかの尺度である。インスリン感受性が高い個体は、効果的にグルコースを処理するが、一方でインスリン感受性が低い個体はグルコースを効果的に処理しない。

【0064】

「ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0065】

「静脈内投与」は、静脈への投与を意味する。

【0066】

「連結ヌクレオシド」は、一緒に結合される隣接するヌクレオシドを意味する。

【0067】

「脂質低下療法」又は「脂質低下剤」は、対象において1以上の脂質を減少させるために対象に提供される治療規制を意味する。ある一定の実施形態において、脂質低下療法は、対象においてApoB、総コレステロール、LDL-C、VLDL-C、IDL-C、非HDL-C、トリグリセリド、小型高密度LDL粒子及びLp(a)の1以上を低下させるために提供される。脂質低下療法の例としては、スタチン、フィブラート及びMTP阻害剤が挙げられる。

【0068】

「主要危険因子」は、特定の疾患又は状態に対するハイリスクに関与する因子を指す。ある一定の実施形態において、冠状動脈性心疾患に対する主要危険因子としては、喫煙、高血圧、低HDL-C、冠状動脈性心疾患の家族歴、年齢及び本明細書中で開示される他の因子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

「代謝性疾患」又は「代謝性障害」は、代謝機能の変化又は異常を特徴とする状態を指す。「代謝性」及び「代謝」は当技術分野で周知の用語であり、一般に生体内で起こる生化学的過程の範囲全体を含む。代謝性疾患又は障害としては、肥満、糖尿病、高血糖、前糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性、糖尿病の脂質異常症もしくは高トリグリセリド血症又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0070】

「メタボリックシンドローム」は、代謝性原因の脂質及び非脂質心血管系危険因子の集積を特徴とする状態を意味する。ある一定の実施形態において、メタボリックシンドロームは、次の因子のうち何れか3つの存在により判定される：胴囲が男性で102cm超又

10

20

30

40

50

は女性で88cm超であること；血清トリグリセリドが少なくとも150mg/dLであること；HDL-Cが男性で40mg/dL未満、女性で50mg/dL未満であること；血圧が少なくとも130/85mmHgであること；及び飢餓状態においてグルコースが少なくとも110mg/dLであること。これらの決定因子は、臨床業務で容易に測定され得る（JAMA, 2001, 285: 2486 - 2497）。

【0071】

「 mismatch 」又は「非相補的核酸塩基」は、第一の核酸の核酸塩基が第二又は標的核酸の対応する核酸塩基と対形成できない場合を指す。

【0072】

「混合型脂質異常症」は、コレステロール上昇及びトリグリセリド上昇を特徴とする状態を意味する。

10

【0073】

「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然のヌクレオシド間結合（即ちホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換又は何らかの変化を指す。

【0074】

「修飾核酸塩基」は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン又はウラシル以外の何らかの核酸塩基を指す。「未修飾核酸塩基」は、プリン塩基アデニン（A）及びグアニン（G）ならびにピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。

【0075】

「修飾ヌクレオシド」は、独立に修飾糖部又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

20

【0076】

「修飾ヌクレオチド」は、独立に修飾糖部、修飾ヌクレオシド間結合又は修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。「修飾ヌクレオシド」は、独立に修飾糖部又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

【0077】

「修飾オリゴヌクレオチド」は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを備えるオリゴヌクレオチドを意味する。

【0078】

「修飾糖」は、天然糖からの置換又は変化を指す。

30

【0079】

「モチーフ」は、アンチセンス化合物における化学的に別個の領域のパターンを意味する。

【0080】

「天然のヌクレオシド間結合」は、3'から5'のホスホジエステル結合を意味する。

【0081】

「天然糖部」は、DNA（2'-H）又はRNA（2'-OH）で見出される糖を意味する。

【0082】

「非アルコール性脂肪肝疾患」又は「NAFLD」は、過剰なアルコール使用（例えば20g/日を超えるアルコール摂取）によるものではない肝臓の脂肪炎症を特徴とする状態を意味する。ある一定の実施形態において、NAFLDは、インスリン抵抗性及びメタボリックシンドロームと関連する。NAFLDは、肝細胞における単純なトリグリセリド蓄積（肝臓脂肪症）から炎症を伴う肝臓脂肪症（脂肪性肝炎）、線維症及び肝硬変の範囲の疾患スペクトラムを包含する。

40

【0083】

「非アルコール性脂肪性肝炎」（NASH）は、トリグリセリド沈着を超えるNAFLDの進行から起こる。壊死、炎症及び線維症を誘導し得る「セカンドヒット」は、NASHの発生に必要とされる。セカンドヒットに対する候補は、広義のカテゴリー：酸化スト

50

レスの増加を引き起こす因子及び炎症誘発サイトカインの発現を促進する因子、に分類され得る。

【0084】

「核酸」は、単量体のヌクレオチドから構成される分子を指す。核酸としては、リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA)、一本鎖核酸、二重鎖核酸、低分子干渉リボ核酸 (siRNA) 及びマイクロRNA (miRNA) が挙げられる。核酸は、単一分子におけるこれらのエレメントの組み合わせも備え得る。

【0085】

「核酸塩基」は、別の核酸の塩基と対形成することができる複素環部を意味する。

【0086】

「核酸塩基配列」は、何らかの糖、結合又は核酸塩基修飾に依存しない、連続核酸塩基の順序を意味する。

【0087】

「ヌクレオシド」は、糖に連結される核酸塩基を意味する。

【0088】

「ヌクレオシド模倣物」は、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環性又は三環性糖模倣物、例えば非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣物など、オリゴマー性化合物の1以上の位置での、糖又は糖及び塩基を置き換えるために使用され、必ずしも結合を置き換えるために使用される訳ではない、構造を含む。

【0089】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分に共有結合されるリン酸基を有するヌクレオシドを意味する。

【0090】

「ヌクレオチド模倣物」は、例えばペプチド核酸又はモルホリノ (-N(H)-C(=O)-O-又は他の非ホスホジエステル結合により連結されるモルホリノ) などのオリゴマー性化合物の1以上の位置でヌクレオシド及び結合を置き換えるために使用される構造を含む。

【0091】

「オリゴマー性化合物」又は「オリゴマー」は、2以上のサブ構造を備え、核酸分子のある領域とハイブリッド形成可能なポリマー構造を指す。ある一定の実施形態において、オリゴマー性化合物は、オリゴヌクレオシドである。ある一定の実施形態において、オリゴマー性化合物は、オリゴヌクレオチドである。ある一定の実施形態において、オリゴマー性化合物は、アンチセンス化合物である。ある一定の実施形態において、オリゴマー性化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。ある一定の実施形態において、オリゴマー性化合物は、キメラオリゴヌクレオチドである。

【0092】

「オリゴヌクレオチド」は、それぞれが、互いに独立に修飾され得るか又は非修飾であり得る、連結ヌクレオシドのポリマーを意味する。

【0093】

「非経口投与」は、注射又は点滴を通じた投与を意味する。非経口投与としては、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与又は頭蓋内投与、例えば、くも膜下腔又は脳室内投与が挙げられる。投与は、連続的、長期的、短期的又は間欠的であり得る。

【0094】

「ペプチド」は、アミド結合により少なくとも2個のアミノ酸を連結することによって形成される分子を意味する。ペプチドはポリペプチド及びタンパク質を指す。

【0095】

「医薬剤」は、個体に投与された場合に治療的有益性を提供する物質を意味する。例えば、ある一定の実施形態において、GCCRに対して標的化されるアンチセンスオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドは医薬剤である。

【0096】

「医薬組成物」は、個体への投与に適切な物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物は、1以上の活性薬剤及び滅菌水溶液を備え得る。

【0097】

「医薬的に許容可能な担体」は、オリゴヌクレオチドの構造を妨害しない媒体又は希釈剤を意味する。ある種のこのような担体は、対象による経口摂取のための、例えば、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ジェル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁液及び薬用キャンディーとして医薬組成物が処方されるようにする。例えば、医薬的に許容可能な担体は滅菌水溶液であり得る。

【0098】

「医薬的に許容可能な誘導体」は、本明細書中に記載の化合物の、医薬的に許容可能な塩、複合物、プロドラッグ又は異性体を包含する。

【0099】

「医薬的に許容可能な塩」は、アンチセンス化合物の生理学的に及び医薬的に許容可能な塩、即ち、親オリゴヌクレオチドの所望の生物学的活性を保持し、それらに望ましくない毒性効果を付与しない塩を意味する。

【0100】

「ホスホロチオエート結合」は、非架橋酸素原子のうち1個を硫黄原子で置き換えることによってホスホジエステル結合が修飾される、ヌクレオシド間の連結を意味する。ホスホロチオエート結合は修飾ヌクレオシド間結合である。

【0101】

「部分」は、核酸の定められた数の連続（即ち連結された）核酸塩基を意味する。ある一定の実施形態において、部分とは、標的核酸の定められた数の連続核酸塩基である。ある一定の実施形態において、部分とは、アンチセンス化合物の定められた数の連続核酸塩基である。

【0102】

「予防する」は、分単位から永久までの時間にわたり、疾患、障害又は状態の発症又は発生を遅延させるか又は防止することを指す。予防する、とは、疾患、障害又は状態の発生リスクを低下させることも意味する。

【0103】

「プロドラッグ」は、内在性酵素、他の化学物質又は条件の作用によって身体又はその細胞内で活性型に変換される、不活性型で調製される治療剤を意味する。

【0104】

「副作用」は、所望の効果以外の、処置に起因する生理学的反応を意味する。ある一定の実施形態において、副作用としては、注射部位の反応、肝臓機能検査異常、腎臓機能異常、肝臓毒性、腎臓毒性、中枢神経系異常、ミオパシー及び不快感が挙げられる。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベル上昇は、肝臓毒性又は肝臓機能異常を示し得る。例えば、ビリルビン上昇は、肝臓毒性又は肝臓機能異常を示し得る。

【0105】

「1本鎖オリゴヌクレオチド」は、相補鎖に対してハイブリッド形成させられていないオリゴヌクレオチドを意味する。

【0106】

「特異的にハイブリッド形成可能な」は、特異的な結合が所望される条件下で、即ちインピボアッセイ及び治療的処置の場合は生理学的条件下で、非標的核酸に対して、最小の影響を示すか又は影響を示さずに、アンチセンス化合物が、所望の効果を誘導するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間で十分な程度の相補性を有することを指す。

【0107】

「スタチン」は、HMG-CoAレダクターゼの活性を阻害する薬剤を意味する。

10

20

30

40

50

【0108】

「皮下投与」は、皮膚のすぐ下への投与を意味する。

【0109】

「～を標的とする」又は「標的化される」は、標的核酸と特異的にハイブリッド形成し、所望の効果を誘導するアンチセンス化合物の設計及び選択の過程を意味する。

【0110】

「標的核酸」、「標的RNA」及び「標的RNA転写産物」は全て、アンチセンス化合物により標的化されることが可能な核酸を指す。

【0111】

「標的セグメント」は、アンチセンス化合物が標的化される、標的核酸のヌクレオチドの配列を意味する。「5'標的部位」は、標的セグメントの5'-モストヌクレオチドを指す。「3'標的部位」は、標的セグメントの3'-モストヌクレオチドを指す。

10

【0112】

「治療的有効量」は、個体に治療的有益性を提供する薬剤の量を意味する。

【0113】

「治療的なライフスタイル変化」は、脂肪/脂肪組織量及び/又はコレステロールを低下させようとする、食事及びライフスタイルの変化を意味する。このような変化は、心疾患発生リスクを低下させ得、1日の総カロリー、総脂肪、飽和脂肪、ポリ不飽和脂肪、単不飽和脂肪、炭水化物、タンパク質、コレステロール、不溶性繊維の食事摂取に関する推奨、ならびに身体活動に対する推奨を含み得る。

20

【0114】

「トリグリセリド」又は「TG」は、3個の脂肪酸分子と組み合わせられたグリセロールからなる脂質又は中性脂肪を意味する。

【0115】

「2型糖尿病」(「2型真性糖尿病」又は「糖尿病、2型」としても知られ、以前は「糖尿病2型」、「非インスリン依存性糖尿病(NIDDM)」、「肥満関連糖尿病」又は「成人発症糖尿病」と呼ばれていた。)は、主にインスリン抵抗性、相対的なインスリン欠乏及び高血糖を特徴とする代謝性疾患である。

【0116】

「処置する」は、疾患、障害又は状態の変化又は改善をもたらすために動物に医薬組成物を投与することを指す。

30

【0117】

「未修飾ヌクレオチド」は、天然の核酸塩基、糖部及びヌクレオシド間結合から構成されるヌクレオチドを意味する。ある一定の実施形態において、未修飾ヌクレオチドは、RNAヌクレオチド(即ち-D-リボヌクレオシド)又はDNAヌクレオチド(即ち-D-デオキシリボヌクレオシド)である。

【0118】

ある一定の実施形態

ある一定の実施形態は、GCCR発現を阻害するための、方法、化合物及び組成物を提供する。

40

【0119】

ある一定の実施形態は、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物を提供する。ある一定の実施形態において、GCCR核酸配列は、ヒトの配列である。ある一定の実施形態において、GCCR核酸は、ヌクレオチド3818000~3980000から短縮されたGENBANK受託番号NT__029289.10(本明細書中で配列番号1として組み込まれる)に相補的である。ある一定の実施形態において、GCCR核酸は、アカゲザルの配列である。ある特定の実施形態において、GCCR核酸配列は、ヌクレオチド1334000~1491000から短縮されたGENBANK受託番号NW__001120987.1(本明細書中で配列番号2として組み込まれる)に相補的である。

【0120】

50

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、またはその両方の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する 12 から 30 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0121】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 4 から 56 の何れかの少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0122】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 および 43 の何れかの少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0123】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、ISIS 番号 420470、420476、426130、426183、426261、426262、426115、426168、426246、426172、426325 および 426267 であるか又はこれを備える。

【0124】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、12 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0125】

ある一定の実施形態において、本化合物又は組成物は、ISIS 番号 426115 であるか又はこれを備える。

【0126】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、又はその両方の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する 15 から 30 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0127】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、15 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 4 から 56 の何れかの少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0128】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、15 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 および 43 の何れかの少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0129】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、ISIS 番号 420470、420476、426130、426183、426261、426262、426115、426168、426246、426172、426325 および 426267 であるか又はこれを備える。

【0130】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、15 から 30 個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

10

20

30

40

50

【0131】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、I S I S 番号426115であるか又はこれを備える。

【0132】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1もしくは2、またはその両方の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する16から21個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0133】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、16から21個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、配列番号4から56の何れかの少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

10

【0134】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、16から21個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42および43の何れかの少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0135】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、16から21個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

20

【0136】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1および2の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する17から35個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0137】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、配列番号4から56の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

30

【0138】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42および43の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

【0139】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から35個の連結ヌクレオチドからなり、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する。

40

【0140】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1もしくは2、または両方と等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する17から30個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0141】

ある一定の実施形態において、本明細書中に提供される化合物又は組成物は、17から30個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号4から56

50

の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0142】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 30 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 および 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0143】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 30 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

10

【0144】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、またはその両方の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する 17 から 25 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0145】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 25 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 4 ~ 56 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

20

【0146】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 25 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 および 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0147】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 25 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

30

【0148】

ある一定の実施形態において、本明細書に記載の化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、または両方の等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する 17 から 24 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0149】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 24 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 4 ~ 56 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

40

【0150】

ある一定の実施形態において、本明細書中に提供される化合物又は組成物は、17 から 24 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 及び 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0151】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から

50

24個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0152】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1もしくは2、またはその両方と等長の部分に相補的な核酸塩基配列を有する17から23個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0153】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から23個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号4～56の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

10

【0154】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から23個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42及び43の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0155】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から23個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

20

【0156】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物または組成物は、配列番号1もしくは2、またはその両方と等長の部分と相補的な核酸塩基配列を有する17から22個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0157】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から22個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号4～56の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

30

【0158】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から22個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42及び43の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0159】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から22個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

40

【0160】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1もしくは2、またはその両方と等長の部分と相補的な核酸塩基配列を有する17から21個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0161】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17から21個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号4から56

50

の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0162】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 21 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 及び 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0163】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、17 から 21 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

10

【0164】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、または両方と等長の部分と相補的な核酸塩基配列を有する 20 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0165】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 4 ~ 56 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

20

【0166】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 及び 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0167】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 36 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

30

【0168】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号 1 もしくは 2、またはその両方の等長部分に相補的な核酸塩基配列を有する 20 個のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0169】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 4 ~ 56 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

40

【0170】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、20 個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 6、7、10、11、33、35、36、39、42 及び 43 の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 20 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0171】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物または組成物は、20 個

50

の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号36の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0172】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、修飾オリゴヌクレオチドの塩を備える。

【0173】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤をさらに備える。

【0174】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、本修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定した場合、配列番号1および2の何れか1つに対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%相補的である。

【0175】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、本修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定した場合、配列番号4から56の何れか1つに対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有する。

【0176】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、本修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定した場合、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、および43の何れか1つに対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有する。

【0177】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、本修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定した場合、配列番号36に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有する。

【0178】

ある一定の実施形態において、アンチセンス化合物又は修飾オリゴヌクレオチドは、GCCR核酸の領域を標的とする。ある一定の実施形態において、GCCR核酸の領域に対して標的化されるような化合物又はオリゴヌクレオチドは、その領域の等長の核酸塩基部分に相補的である連続核酸部分を有する。例えば、この部分は、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の連続核酸塩基であり得る。このような部分は、本明細書中で挙げられる領域の等長部分に相補的である。ある一定の実施形態において、このような化合物又はオリゴヌクレオチドは、以下の配列番号1のヌクレオチド領域を標的とする：33116~33135、33296~33315、33673~33692、33716~33755、33716~33751、33716~33735、33732~33755、33732~33755、33732~33755、33736~33755、37217~37236、51878~51898、51878~51897、51879~51898、57825~57846、57825~57844、57827~57846、59951~59978、59951~59975、59951~59974、59951~59971、59951~59970、59952~59978、59952~59975、59952~59974、59952~59971、59955~59978、59955~59975、59955~59974、59956~59978、59956~59975、59959~59978、60935~60958、60935~60956、60935~60955、60935~60954、60936~60958、60936~60956、60936~60955、6093

10

20

30

40

50

7 ~ 60958、60937 ~ 60956、60939 ~ 60958、63677 ~ 63698、63677 ~ 63697、63677 ~ 63696、63678 ~ 63698、63678 ~ 63697、63679 ~ 63698、65938 ~ 65961、65938 ~ 65960、65938 ~ 65959、65938 ~ 65958、65938 ~ 65957、65939 ~ 65961、65939 ~ 65960、65939 ~ 65959、65939 ~ 65958、65940 ~ 65961、65940 ~ 65960、65940 ~ 65959、65941 ~ 65961、65941 ~ 65960、65942 ~ 65961、76224 ~ 76248、76224 ~ 76247、76224 ~ 76246、76224 ~ 76244、76224 ~ 76243、76225 ~ 76248、76225 ~ 76247、76225 ~ 76246、76225 ~ 76244、76227 ~ 76248、76227 ~ 76247、76227 ~ 76246、76228 ~ 76248、76228 ~ 76247、76229 ~ 76248、95513 ~ 95538、95513 ~ 95537、95513 ~ 95532、95518 ~ 95538、95518 ~ 95537、95519 ~ 95538、104247 ~ 104266、109346 ~ 109368、109346 ~ 109366、109346 ~ 109365、109347 ~ 109368、109347 ~ 109366、109349 ~ 109368、109473 ~ 109492、112218 ~ 112242、112218 ~ 112241、112218 ~ 112240、112218 ~ 112239、112218 ~ 112238、112218 ~ 112237、112219 ~ 112242、112219 ~ 112241、112219 ~ 112240、112219 ~ 112239、112219 ~ 112238、112219 ~ 112237、112220 ~ 112242、112220 ~ 112241、112220 ~ 112239、112220 ~ 112238、112221 ~ 112242、112221 ~ 112241、112221 ~ 112240、112222 ~ 112242、112222 ~ 112241、112223 ~ 112242、114154 ~ 114178、114154 ~ 114177、114154 ~ 114176、114154 ~ 114175、114154 ~ 114174、114154 ~ 114173、114155 ~ 114178、114155 ~ 114177、114155 ~ 114176、114155 ~ 114175、114155 ~ 114174、114156 ~ 114178、114156 ~ 114177、114156 ~ 114176、114156 ~ 114175、114157 ~ 114178、114157 ~ 114177、114157 ~ 114176、114158 ~ 114178、114158 ~ 114177、114159 ~ 114178、114587 ~ 114610、114587 ~ 114609、114587 ~ 114608、114587 ~ 114606、114589 ~ 114610、114589 ~ 114609、114589 ~ 114608、114590 ~ 114610、114590 ~ 114609、114591 ~ 114610、139287 ~ 139306、143259 ~ 143280、143259 ~ 143279、143259 ~ 143278、143260 ~ 143280、143260 ~ 143279、143261 ~ 143280、143737 ~ 143757、143737 ~ 143756、および143738 ~ 143757。

【0179】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物又は修飾オリゴヌクレオチドは、GCCR核酸の領域を標的とする。ある特定の実施形態において、GCCR核酸の領域に対して標的化されるような化合物又はオリゴヌクレオチドは、この領域の等長の核酸塩基部分に対して相補的である連続核酸塩基部分を有する。例えば、この部分は、本明細書中で挙げられる領域の等長の部分に相補的な少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個の連続核酸塩基部分であり得る。ある特定の実施形態において、このような化合物又はオリゴヌクレオチドは、以下の配列番号1のヌクレオチド領域を標的とする：57825 ~ 57844、59956 ~ 59975、63677 ~ 63696、65938 ~ 65959、65938 ~ 65958、65938 ~ 65957、65939 ~ 65959、65939 ~ 65958、65940 ~ 65959、76224 ~ 76243、76225 ~ 76244、76229 ~ 76248、

および 95513 ~ 95532。

【0180】

ある一定の実施形態において、アンチセンス化合物又は修飾オリゴヌクレオチドは、GCCR 核酸の領域を標的とする。ある一定の実施形態において、GCCR 核酸の領域に対して標的化されるような化合物又はオリゴヌクレオチドは、この領域の等長の核酸塩基部分に相補的である連続核酸塩基部分を有する。例えば、この部分は、本明細書中で挙げられる領域の等長部分に相補的な、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の連続核酸塩基部分であり得る。ある一定の実施形態において、このような化合物又はオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 の次の核酸領域を標的とする：65940 ~ 65959。

10

【0181】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒト GCCR をコードする核酸である配列番号 1 の領域を標的とし、GCCR 発現の少なくとも 55% の阻害を示す：ISIS 番号 361137、361141、361151、361155、361156、377131、414641、414648、414681、420450、420470、420476、420479、420488、420493、420522、420599、420634、420644、420764、426110、426115、426116、426117、426128、426136、426142、426143、426161、426172、426177、426183、426187、426189、426246、426255、426261、426262、426263、426264、426325、及び 426345。

20

【0182】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒト GCCR をコードする核酸である配列番号 1 の領域を標的とし、GCCR 発現の少なくとも 60% の阻害を示す：ISIS 番号 361137、361141、361151、361155、361156、377131、414641、414648、414681、420450、420470、420476、420479、420488、420493、420522、420599、420634、420644、420764、426110、426115、426116、426117、426128、426143、426177、426183、426187、426246、426255、426261、及び 426262

30

【0183】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒト GCCR をコードする核酸である配列番号 1 の領域を標的とし、GCCR 発現の少なくとも 65% の阻害を示す：ISIS 番号 361137、361141、361151、361155、361156、377131、414641、414648、414681、420450、420470、420476、420479、420488、420493、420522、420599、420634、420644、420764、426110、426115、426117、426128、426143、426177、426183、426187、426246、426255、及び 426261。

40

【0184】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒト GCCR をコードする核酸である配列番号 1 の領域を標的とし、GCCR 発現の少なくとも 70% の阻害を示す：ISIS 番号 361137、361155、361156、377131、414641、414648、414681、420450、420470、420476、420479、420488、420493、420522、420599、420634、420644、420764、426115、426117、426128、426183、及び 426261。

【0185】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒト GCCR をコード

50

する核酸である配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも75%の阻害を示す：ISIS番号361137、361155、377131、414641、414681、420450、420470、420476、420488、420493、420522、420599、420634、420644、及び420764。

【0186】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも80%の阻害を示す：ISIS番号377131、414641、414681、420450、420476、および420634。

【0187】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも85%の阻害を示す：ISIS番号414681、420450、420476、及び420634。

【0188】

ある一定の実施形態において、以下のアンチセンス化合物は、配列番号1の領域、ヒトGCCRをコードする核酸を標的とし、形質移入用のエレクトロポレーションを使用して3 μ M未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号377131、414641、414681、420450、420470、420476、420493、420522、420599、420644、426110、426115、426116、426117、426119、426124、426128、426130、426131、426136、426137、426142、426143、426144、426150、426157、426161、426168、426171、426172、426177、426183、426185、426187、426189、426199、426203、426229、426246、426255、426261、426262、426263、426264、426267、426281、426301、426302、426306、426323、426324、426325、426343、426345、426346、426347、426401、426403、426404、および426405。

【0189】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入用のエレクトロポレーションを使用して2 μ M未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号377131、414641、414681、420450、420470、420476、420493、420522、420599、420644、426110、426115、426116、426117、426119、426128、426130、426136、426137、426142、426143、426144、426150、426157、426168、426171、426172、426183、426185、426189、426203、426246、426261、426262、426263、426264、426267、426281、426301、426324、426325、426345、及び426347。

【0190】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入用のエレクトロポレーションを使用して1 μ M未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号426115、426128、426172、426261、及び426325。

【0191】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入剤としてのリポフェクチンを使用して50nM未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号377131、414641、414648、414681、420450、420470、420488、420493、42

10

20

30

40

50

0522、420599、420644、426110、426115、426116、
 426117、426119、426124、426128、426130、42613
 1、426136、426137、426142、426143、426144、426
 150、426157、426161、426168、426171、426172、4
 26177、426183、426185、426187、426189、426199
 、426203、426216、426229、426246、426255、4262
 61、426262、426263、426264、426267、426276、42
 6281、426293、426301、426302、426306、426323、
 426324、426325、426331、426334、426336、42633
 7、426343、426344、426345、426347、426390、426 10
 401、426402、426403、426404、及び426405。

【0192】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする
 核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入剤としてのリポフェクチンを使用して
 40nM未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号377131、414641、4146
 81、420450、420493、420522、420599、420644、42
 6110、426115、426116、426117、426119、426124、
 426128、426130、426131、426142、426143、42615
 7、426168、426171、426172、426177、426183、426
 185、426187、426189、426199、426203、426216、4 20
 26246、426255、426261、426262、426263、426264
 、426267、426276、426281、426293、426301、4263
 02、426306、426324、426331、426336、426337、42
 6343、426344、426345、426347、426401、426402、
 426403、426404、及び426405。

【0193】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする
 核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入剤としてのリポフェクチンを使用して
 30nM未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号414641、420493、4205
 99、426110、426115、426116、426117、426130、42 30
 6131、426168、426171、426172、426177、426183、
 426185、426187、426189、426246、426255、42626
 1、426262、426263、426264、426324、426344、426
 345、及び426402。

【0194】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする
 核酸である配列番号1の領域を標的とし、形質移入剤としてのリポフェクチンを使用して
 20nM未満のIC₅₀値を示す：ISIS番号414641、426110、4261
 15、426116、426117、426172、426177、426183、42
 6187、426255、426262、及び426263。 40

【0195】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド57825～57844、5995
 6～59975、63677～63696、65938～65959、65938～65
 958、65938～65957、65939～65959、65939～65958、
 65940～65959、76224～76243、76225～76244、7622
 9～76248、及び95513～95532から選択される領域内の等長の核酸塩基部
 分に相補的である少なくとも8個の連続核酸塩基部分を備える、20個の連結ヌクレオシ
 ドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0196】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチ 50

ド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内の等長の部分に相補的である、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、又は少なくとも 19 個の連続核酸塩基部分を有する。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、ヒト G C C R をコードする核酸、例えば配列番号 1 に対して 90%、95%、99% 又は 100% 相補的である。

10

【0197】

ある一定の実施形態は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内で 60% 相補的である少なくとも 20 個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0198】

ある一定の実施形態は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内で 70% 相補的である少なくとも 20 個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

20

【0199】

ある一定の実施形態は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内で 80% 相補的である少なくとも 20 個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

30

【0200】

ある一定の実施形態は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内で 90% 相補的である少なくとも 20 個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

40

【0201】

ある一定の実施形態は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 9、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 から選択される領域内で 95% 相補的である少なくとも 20 個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

50

【0202】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド57825～57844、59956～59975、63677～63696、65938～65959、65938～65958、65938～65957、65939～65959、65939～65958、65940～65959、76224～76243、76225～76244、76229～76248、及び95513～95532から選択される領域内で99%相補的である少なくとも20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0203】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド57825～57844、59956～59975、63677～63696、65938～65959、65938～65958、65938～65957、65939～65959、65939～65958、65940～65959、76224～76243、76225～76244、76229～76248、及び95513～95532から選択される領域内で100%相補的である少なくとも20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

10

【0204】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で60%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

20

【0205】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で70%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0206】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で80%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0207】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で90%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

30

【0208】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で95%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0209】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で99%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

40

【0210】

ある一定の実施形態は、配列番号1のヌクレオチド65940～65959内で100%相補的な20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を提供する。

【0211】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸の領域に対して標的化されるこのような化合物又はオリゴヌクレオチドは、配列番号1の65940～65959の等長の核酸塩基部分に相補的である連続核酸塩基部分を有する。

【0212】

ある一定の実施形態において、配列番号1の次のヌクレオチド領域は、アンチセンス化

50

合物又はオリゴヌクレオチドにより標的とされる場合、少なくとも65%阻害を示す：57825～57844、59956～59975、63677～63696、65938～65959、65938～65958、65938～65957、65939～65959、65939～65958、65940～65959、76224～76243、76225～76244、76229～76248、及び95513～95532。

【0213】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも55%の阻害を示す：ISIS番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、30、31、35、36、37、38、42、43、45、48、54、及び56。

10

【0214】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも60%の阻害を示す：ISIS番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、31、35、36、37、38、及び45。

【0215】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも65%の阻害を示す：ISIS番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、31、36、38、及び45。

20

【0216】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも70%の阻害を示す：ISIS番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、20、21、22、23、24、36、及び38。

【0217】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも75%の阻害を示す：ISIS番号4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、16、17、20、及び22。

30

【0218】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも80%の阻害を示す：ISIS番号4、5、7、13、16、及び22

【0219】

ある一定の実施形態において、次のアンチセンス化合物は、ヒトGCCRをコードする核酸である、配列番号1の領域を標的とし、GCCR発現の少なくとも85%の阻害を示す：ISIS番号5、7、13、及び16。

40

【0220】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物は、ISIS番号361137、361141、361151、361156、377131、361143、及び361155（参照により本明細書中に組み込まれる国際特許公開公報第2007/035759号で開示される。）よりも大きい治療可能性を有する。ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物は、ISIS番号361137、361141、361151、361156、377131、361143、及び361155を上回る、より良好なインビボ阻害を有する。ある一定の実施形態において、本明細書で提供される化合物は、ISIS番号361137、361141、361151、361156、377131、361143、及び361155を上回るより良好なインビボ阻害を有す

50

る。ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物は、I S I S 番号 3 6 1 1 3 7、3 6 1 1 4 1、3 6 1 1 5 1、3 6 1 1 5 6、3 7 7 1 3 1、3 6 1 1 4 3、及び 3 6 1 1 5 5 よりも良好な忍容性プロファイルを有する。

【0221】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物は、1本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる。

【0222】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34又は35個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、21個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、20個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、19個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、18個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、20個の連結ヌクレオチドからなる。ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、16個の連結ヌクレオチドからなる。

10

【0223】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1個のヌクレオチド間結合は修飾ヌクレオチド間結合である。ある一定の実施形態において、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

20

【0224】

ある一定の実施形態において、前記修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1個のヌクレオチドは修飾核酸塩基を備える。ある一定の実施形態において、修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

【0225】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、a) 連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b) 連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；c) 連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは修飾糖を備える。

30

【0226】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、20個の連結ヌクレオチド、10個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメント、5個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメント、5個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントからなり、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5-メチルシトシンである。

【0227】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、20個の連結ヌクレオチド、14個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメント、3個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメント、3個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントからなり、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5-メチルシトシンである。

40

【0228】

ある一定の実施形態において、本修飾オリゴヌクレオチドは、20個の連結ヌクレオチド、13個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメント、2個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメント、5個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントからなり、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエ

50

チル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5 - メチルシトシンである。

【0229】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1および2の何れかの等長の部分に相補的な少なくとも8個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a) 10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；b) 5個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと；c) 5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5 - メチルシトシンである。

10

【0230】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号2の何れかの等長の部分と相補的な少なくとも8個の連続核酸塩基を備える配列を有する20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a) 10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；b) 5個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと；c) 5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5 - メチルシトシンである。

20

【0231】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、及び43の少なくとも19個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する、20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a) 10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；b) 5個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと；c) 5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5 - メチルシトシンである。

30

【0232】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号36の少なくとも19個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a) 10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；b) 5個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと；c) 5個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5 - メチルシトシンである。

40

【0233】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号36の少なくとも19個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する、20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a) 10個の連結デオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；b) 4個の連結ヌクレオシドからなる5'ウイングセグメントと；c) 4個の連結ヌクレオシドからなる3

50

5'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

【0234】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1および2の等長部分に相補的な少なくとも8個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する20個の連結核酸塩基からなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは：a)14個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b)3個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；c)3個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

10

【0235】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号1のいずれかの等長部分に相補的な少なくとも8個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する20個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、この修飾オリゴヌクレオチドは、a)13個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b)2個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；c)5個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

20

【0236】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42及び43の少なくとも19個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する20個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは：a)10個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b)5個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；c)5個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

30

【0237】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号36の少なくとも19個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する20個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは、a)10個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b)5個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；c)5個の連結ヌクレオチドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

40

【0238】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、配列番号36の核酸塩基を有する20個の連結ヌクレオチドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備え、この修飾オリゴヌクレオチドは：a)10個の連結デオキシヌクレオチドからなるギャップセグメントと；b)5個の連結ヌクレオチドからなる5'ウイングセグメントと；

50

c) 6個の連結ヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントと、を備える。ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間に置かれ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾糖を備え、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

【0239】

ある一定の実施形態は、GCCR発現を阻害するための方法、化合物及び組成物を提供する。

【0240】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のような化合物を動物に投与することを備える、動物においてGCCR発現を低下させる方法を提供する。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される12から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される15から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される18から21連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から35連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から25連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から24連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から23ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から22連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される17から21連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。

【0241】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のような化合物を動物に投与することを備える、動物において代謝性疾患を予防するか、改善するか又は処置する方法を提供する。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される12から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。代謝性疾患又は障害の例としては、糖尿病、高血糖、前糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性、糖尿病の脂質異常症もしくは高トリグリセリド血症又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0242】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のような化合物を動物に投与することを備える、動物において肥満を予防するか、改善するか又は処置する方法を提供する。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される12から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される21連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物又は組成物は、ISIS番号420470、420476、426130、426183、426261、426262、426115、426168、426246、426172、426325、及び426267の化合物を備える。ある一定の実施形態

10

20

30

40

50

において、本化合物又は組成物は、I S I S 番号 4 2 6 6 1 5 の化合物を備える。

【0243】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のような化合物を動物に投与することを備える、動物において体重を減少させる方法を提供する。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される12から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、代謝性疾患を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、糖尿病を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、肥満を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、メタボリックシンドロームを予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、インスリン抵抗性を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、高血糖を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、NAFLDを予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物における体重の減少は、糖尿病の脂質異常症を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、グルコース値は、少なくとも5%、10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%低下する。

10

20

【0244】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のような化合物を動物に投与することを備える、動物においてグルコース値を低下させる方法を提供する。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される12から30連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、本化合物は、GCCRに対して標的化される20連結ヌクレオシド長の修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、代謝性疾患を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、糖尿病を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、肥満を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、メタボリックシンドロームを予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、インスリン抵抗性を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、高血糖を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、NAFLDを予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、動物におけるグルコース値の低下は、糖尿病の脂質異常症を予防するか、改善するか又は処置する。ある一定の実施形態において、グルコース値は、少なくとも5%、10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%低下する。

30

40

【0245】

ある一定の実施形態において、GCCRは、GENBANK受託番号：ヌクレオチド3818000-3980000から短縮されたGENBANK受託番号NT__029289.10に相補的であるようないずれかのヒト配列を有する（本明細書中で配列番号1として組み込まれる。）。ある一定の実施形態において、GCCRは、ヌクレオチド1334000-1491000から短縮されたGENBANK受託番号NW__001120987.1に相補的なアカゲザル配列を有する（本明細書中で配列番号2として組み込まれる。）。

【0246】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、その塩及

50

び医薬的に許容可能な担体又は希釈剤を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、17から35個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、及び43で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、20から25個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、および43で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する、修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、20個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、および43で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。

10

20

30

40

50

【0247】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供される化合物又は組成物は、その塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、17から35個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号36で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、17から25個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号36で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。ある一定の実施形態において、本組成物は、20個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号36で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩と、医薬的に許容可能な担体又は希釈剤と、を備える。

【0248】

ある一定の実施形態は、a) G C C R 関連疾患又は状態がある動物を同定し、b) 12から30個の連結ヌクレオシドからなり、修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定される場合、配列番号1及び2の何れかに少なくとも90%相補的な核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物の治療的有効量を前記動物に投与することを備える、G C C R 関連疾患又は状態がある動物を処置するための方法を提供する。ある一定の実施形態において、動物に対して投与される化合物の治療的有効量は、動物において、G C C R 関連疾患もしくは状態又はその症状を処置するか又は軽減する。ある一定の実施形態において、G C C R 関連疾患又は状態は肥満である。ある一定の実施形態において、G C C R 関連疾患又は状態は糖尿病である。

【0249】

ある一定の実施形態は、a) G C C R 関連疾患又は状態がある動物を同定し、b) 20個の連結ヌクレオシドからなり、修飾オリゴヌクレオチドの全体にわたり測定される場合、配列番号1及び2の何れかに少なくとも100%相補的な核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物の治療的有効量を前記動物に投与することを備える、G C C R 関連疾患又は状態がある動物を処置するための方法を提供する。ある一定の実施形態において、動物に対して投与される化合物の治療的有効量は、動物において、G C C R 関連疾患もしくは状態又はその症状を処置するか又は軽減する。ある一定の実施形態において、G C C R 関連疾患又は状態は肥満である。ある一定の実施形態において、G C C R 関連疾患又は状態は糖尿病である。

【0250】

ある一定の実施形態は、代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善する方法を提供する。ある一定の実施形態において、代謝性疾患は、肥満、糖尿病、高血糖、前糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患 (N A F L D)、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗

性、糖尿病の脂質異常症もしくは高トリグリセリド血症又はこれらの組み合わせである。

【0251】

ある一定の実施形態は、動物に本明細書中に記載のような化合物を投与することを備える方法を提供する。ある一定の実施形態において、本方法は、17から35個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、及び43で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを動物に投与することを備える。

【0252】

ある一定の実施形態は、動物に本明細書中に記載のような化合物を投与することを備える方法を提供する。ある一定の実施形態において、本方法は、17から35個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号6、7、10、11、33、35、36、39、42、及び43で挙げられる核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを動物に投与することを備える。

10

【0253】

ある一定の実施形態は、動物に本明細書中に記載のような化合物を投与することを備える方法を提供する。ある一定の実施形態において、本方法は、17から35個の連結ヌクレオシドからなり、配列番号36で挙げられる核酸塩基配列の間から選択される核酸塩基配列の少なくとも20個の連続核酸塩基を備える核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを動物に投与することを備える。

【0254】

ある一定の実施形態において、動物はヒトである。

20

【0255】

ある一定の実施形態において、投与することは、本明細書中に記載のように、代謝性疾患の進行を、予防するか、処置するか、改善するか又は遅延させる。

【0256】

ある一定の実施形態において、投与することは、本明細書中に記載のように、肥満の進行を、予防するか、処置するか、改善するか又は遅延させる。

【0257】

ある一定の実施形態において、投与することは、本明細書中に記載のように、糖尿病の進行を、予防するか、処置するか、改善するか又は遅延させる。

30

【0258】

ある一定の実施形態において、本化合物は、第二の薬剤と同時投与される。

【0259】

ある一定の実施形態において、本化合物及び第二の薬剤は併用投与される。

【0260】

ある一定の実施形態において、投与することは非経口投与である。

【0261】

ある一定の実施形態は、動物においてGCCRM RNA又はタンパク質発現を低下させるために本明細書中に記載のような化合物又は組成物を動物に投与することを備える、動物において、GCCRM RNA又はタンパク質発現を低下させるための方法をさらに提供する。ある一定の実施形態において、動物はヒトである。ある一定の実施形態において、GCCRM RNA又はタンパク質発現を低下させることは、代謝性疾患の進行を、予防するか、処置するか、改善するか又は遅延させる。ある一定の実施形態において、代謝性疾患又は状態は糖尿病である。ある一定の実施形態において、代謝性疾患又は状態は肥満である。

40

【0262】

ある一定の実施形態は、代謝性疾患があるヒトを同定し、治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をそのヒトに投与することを備える、代謝性疾患があるヒトを処置するための方法を提供する。ある一定の実施形態において、本処置は、メタボリックシンドローム、高血糖、高トリグリセリド血症、高血圧、グルコース値上昇、インス

50

リン抵抗性上昇、インスリン感受性低下、正常値を上回る体重及び/又は正常値を上回る体脂肪又はこれらの何らかの組み合わせからなる群から選択される症状を軽減させる。

【0263】

ある一定の実施形態は、肥満であるヒトを同定し、治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をそのヒトに投与することを備える、肥満であるヒトを処置するための方法を提供する。ある一定の実施形態において、本処置は、メタボリックシンドローム、高血糖、高トリグリセリド血症、高血圧、グルコース値上昇、インスリン抵抗性上昇、インスリン感受性低下、正常値を上回る体重及び/又は正常値を上回る体脂肪又はこれらの何らかの組み合わせからなる群から選択される症状を軽減する。

【0264】

ある一定の実施形態は、糖尿病があるヒトを同定し、治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をそのヒトに投与することを備える、糖尿病があるヒトを処置するための方法を提供する。ある一定の実施形態において、本処置は、メタボリックシンドローム、高血糖、高トリグリセリド血症、高血圧、グルコース値上昇、インスリン抵抗性上昇、インスリン感受性低下、正常値を上回る体重及び/又は正常値を上回る体脂肪又はこれらの何らかの組み合わせからなる群から選択される症状を軽減する。

【0265】

治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をヒトに投与し、それによって代謝性疾患を軽減するか又は予防することを備える、代謝性疾患を軽減するか又は予防するための方法がさらに提供される。

【0266】

治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をヒトに投与し、それによって肥満を軽減するか又は予防することを備える、糖尿病を軽減するか又は予防するための方法がさらに提供される。

【0267】

治療的有効量の本明細書中に記載のような化合物又は組成物をヒトに投与し、それによって糖尿病を軽減するか又は予防することを備える、糖尿病を軽減するか又は予防するための方法がさらに提供される。

【0268】

代謝性疾患の症状を改善することを必要とするヒトに17から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状を改善する、代謝性疾患の症状を改善するための方法がさらに提供される。

【0269】

糖尿病の症状を改善することを必要とするヒトに17から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状を改善する、糖尿病の症状を改善するための方法がさらに提供される。

【0270】

代謝性疾患の症状を改善することを必要とするヒトに12から30個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状を改善する、代謝性疾患の症状を改善するための方法がさらに提供される。

【0271】

糖尿病の症状を改善することを必要とするヒトに12から30個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状を改善する、糖尿病の症状を改善するための方法がさらに提供される。

10

20

30

40

50

【0272】

代謝性疾患の症状を改善することを必要とするヒトに20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状を改善する、代謝性疾患の症状を改善するための方法がさらに提供される。

【0273】

糖尿病の症状を改善することを必要とするヒトに20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状を改善する、糖尿病の症状を改善するための方法がさらに提供される。

10

【0274】

代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに20から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状の進行速度を低下させる、代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

【0275】

糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに17から35個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状の進行速度を低下させる、糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

20

【0276】

代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに12から30個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状の進行速度を低下させる、代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

【0277】

糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに12から30個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状の進行速度を低下させる、糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

30

【0278】

代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて代謝性疾患の症状の進行速度を低下させる、代謝性疾患に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

40

【0279】

糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させることを必要とするヒトに20個の連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを備え、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号1又は2と特異的にハイブリッド形成し、それによってヒトにおいて糖尿病の症状の進行速度を低下させる、糖尿病に付随する症状の進行速度を低下させるための方法がさらに提供される。

【0280】

代謝性疾患の処置、予防又は改善のための医薬の調製のための方法及び化合物も提供される。

50

【0281】

肥満の処置、予防又は改善のための医薬の調製のための方法及び化合物も提供される。

【0282】

糖尿病の処置、予防又は改善のための医薬の調製のための方法及び化合物も提供される。

【0283】

メタボリックシンドロームの処置、予防又は改善のための医薬の調製のための方法及び化合物も提供される。

【0284】

ある一定の実施形態は、代謝性疾患を処置するか、改善するか又は予防するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

10

【0285】

ある一定の実施形態は、肥満を処置するか、改善するか又は予防するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

【0286】

ある一定の実施形態は、糖尿病を処置するか、改善するか又は予防するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

【0287】

ある一定の実施形態は、メタボリックシンドロームを処置するか、改善するか又は予防するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

20

【0288】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のような代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善することにおける使用のための、本明細書中に記載のような化合物を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

【0289】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のように糖尿病を処置するか、予防するか又は改善することにおける使用のための、本明細書中に記載のような化合物を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

30

【0290】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のように代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

【0291】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のように肥満を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

40

【0292】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のように糖尿病を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

【0293】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療との併用療法により本明細書中に記載のように糖尿病を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。薬剤又は治療は、同時投与されるか又は併用投与され得る。

50

【0294】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療を連続して投与される患者において、本明細書中に記載のように代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

【0295】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療を連続して投与される患者において、本明細書中に記載のように肥満を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

【0296】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療を連続して投与される患者において、本明細書中に記載のように糖尿病を処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

10

【0297】

ある一定の実施形態は、本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療を連続して投与される患者において、本明細書中に記載のようにメタボリックシンドロームを処置するか、予防するか又は改善するための医薬の製造における、本明細書中に記載のような化合物の使用を提供する。

【0298】

ある一定の実施形態は、
 (i) 本明細書中に記載のような化合物；及びあるいは
 (ii) 本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療
 を備える、本明細書中に記載のように代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善するためのキットを提供する。

20

【0299】

ある一定の実施形態は、
 (i) 本明細書中に記載のような化合物；及びあるいは
 (ii) 本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療
 を備える、本明細書中に記載のように肥満を処置するか、予防するか又は改善するためのキットを提供する。

30

【0300】

ある一定の実施形態は、
 (i) 本明細書中に記載のような化合物；及びあるいは
 (ii) 本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療
 を備える、本明細書中に記載のように糖尿病を処置するか、予防するか又は改善するためのキットを提供する。

【0301】

ある一定の実施形態は、
 (i) 本明細書中に記載のような化合物；及びあるいは
 (ii) 本明細書中に記載のようなさらなる薬剤又は治療
 を備える、本明細書中に記載のようにメタボリックシンドロームを処置するか、予防するか又は改善するためのキットを提供する。

40

【0302】

本明細書中に記載のようなキットは、本明細書中に記載のような併用療法によって本明細書中に記載のように代謝性疾患を処置するか、予防するか又は改善するために本キットを使用するための説明書をさらに含み得る。ある一定の実施形態において、代謝性疾患は肥満である。ある一定の実施形態において、代謝性疾患は糖尿病である。

【0303】

アンチセンス化合物

50

オリゴマー性化合物としては、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣物、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド及び siRNA が挙げられるが、これらに限定されない。オリゴマー性化合物は、標的核酸に対する「アンチセンス」であり得、つまり、水素結合を通じて標的核酸とハイブリッド形成できることを意味する。

【0304】

ある一定の実施形態において、アンチセンス化合物は、5' から 3' 方向で書かれる場合、それが標的化される標的核酸の標的セグメントの逆相補鎖を備える核酸塩基配列を有する。ある一定のこのような実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5' から 3' 方向で書かれる場合、それが標的化される標的核酸の標的セグメントの逆相補鎖を備える核酸塩基配列を有する。

10

【0305】

ある一定の実施形態において、GCCR 核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は 10 から 30 ヌクレオチド長である。言い換えると、アンチセンス化合物は、10 から 30 個の連結核酸塩基である。その他の実施形態において、本アンチセンス化合物は、8 から 80、10 から 50、15 から 30、18 から 21、20 から 80、20 から 35、20 から 30、20 から 29、20 から 28、20 から 27、20 から 26、20 から 25、20 から 24、20 から 23、20 から 22、20 から 21 又は 20 個の連結核酸塩基からなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。ある一定のこのような実施形態において、本アンチセンス化合物は、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 もしくは 80 個の連結核酸塩基長又は上記の値の何れか 2 つにより定められる範囲からなる修飾オリゴヌクレオチドを備える。

20

【0306】

ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、短縮形又は短縮化修飾オリゴヌクレオチドを備える。短縮形又は短縮化修飾オリゴヌクレオチドは、1 個のヌクレオシドが 5' 末端から (5' 短縮化) 又はあるいは 3' 末端から (3' 短縮化) 除去されているものであり得る。短縮形又は短縮化オリゴヌクレオチドは、2 個のヌクレオシドが 5' 末端から除去されているものであり得るか、あるいは 2 個のサブユニットが 3' 末端から除去されているものであり得る。あるいは、除去されるヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチド全体に分散させられ得、例えばアンチセンス化合物において、1 個のヌクレオシドが 5' 末端から除去されており、1 個のヌクレオシドが 3' 末端から除去されている。

30

【0307】

延長されたオリゴヌクレオチドにおいて 1 個のさらなるヌクレオシドが存在する場合、このさらなるヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの 5' 又は 3' 末端に置かれ得る。2 以上のさらなるヌクレオシドが存在する場合、付加されるヌクレオシドは互いに隣接し得、例えばオリゴヌクレオチドにおいて、2 個のヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの 5' 末端に付加されるか (5' 付加) 又はあるいは 3' 末端に付加される (3' 付加)。あるいは、付加されるヌクレオシドは、本アンチセンス化合物全体に分散させられ得、例えばオリゴヌクレオチドにおいて、1 個のヌクレオシドが 5' 末端に付加され、1 個のサブユニットが 3' 末端に付加される。

40

【0308】

活性を失うことなく、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンス化合物の長さを増減させることができ及び / 又は mismatches を導入することができる。例えば Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7305-7309, 1992) において、卵細胞注入モデルにおいて標的 RNA の切断を誘

50

導する能力について、13から25核酸塩基長の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端付近に8又は11個のミスマッチ塩基がある25核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含有しなかったアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも小さいが、標的mRNAの特異的な切断を支配することができた。同様に、1又は3個のミスマッチがあるものを含め、13個の核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて標的的特異的な切断が達成された。

【0309】

Gautschi et al. (J. Natl. Cancer Inst. 93: 463-471, March 2001) は、bcl-2 mRNAに対して100%相補性を有し、bcl-xL mRNAに対して3個のミスマッチを有するオリゴヌクレオチドがインピトコ及びインピボでbcl-2及びbcl-xLの両者の発現を低下させる能力を明らかにした。さらに、このオリゴヌクレオチドは、インピボで強力な抗腫瘍活性を示した。

10

【0310】

Maher及びDolnick (Nuc. Acid. Res. 16: 3341-3358, 1988) は、ウサギ網状赤血球アッセイにおいてヒトDHFRの翻訳を停止させるその能力について、一連のタンデムな14個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドならびに、それぞれ2又は3個のタンデムアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列から構成される28及び42個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。3種類の14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドのそれぞれは単独で、28又は42核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低いレベルではあるものの、翻訳を阻害することができた。

20

【0311】

アンチセンス化合物モチーフ

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、阻害活性の促進、標的核酸に対する結合親和性の向上又はインピボでのヌクレアーゼによる分解に対する耐性など、アンチセンス化合物特性を付与するためのパターンで編成される化学的に修飾されたサブユニット又はモチーフを有する。

【0312】

キメラアンチセンス化合物は、一般的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性向上、細胞取り込みの増加、標的核酸に対する結合親和性の向上及び/又は阻害活性向上を付与するために修飾される少なくとも1つの領域を含有する。キメラアンチセンス化合物の第二の領域は、場合によっては、RNA:DNA二本鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼRNase Hに対する基質となり得る。

30

【0313】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、キメラアンチセンス化合物とみなされる。ギャップマーにおいて、RNase H切断を支持する複数のヌクレオチドを有する内部領域は、内部領域のヌクレオチドと化学的に別個である複数のヌクレオチドを有する外部領域間に位置する。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは、一般に、エンドヌクレアーゼ切断に対する基質となるが、一方で、ウイングセグメントは修飾ヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、ギャップマーの領域は、各個別領域を備える糖部のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために使用される糖部のタイプは、いくつかの実施形態において、-D-リボヌクレオチド、-D-デオキシリボヌクレオチド、2'-修飾ヌクレオチド(このような2'-修飾ヌクレオチドは、とりわけ、2'-MOE及び2'-O-CH₃を含み得る。)及び二環性糖修飾ヌクレオチド(このような二環性糖修飾ヌクレオチドは、拘束エチルを有するものを含み得る。)を含み得る。ある一定の実施形態において、ウイングは、例えば2'-MOE及び拘束エチルを含む、いくつかの修飾糖部を含み得る。ある一定の実施形態において、ウイングは、いくつかの修飾及び未修飾糖部を含み得る。ある一定の実施形態において、ウイングは、2'-MOEヌクレオチド、拘束

40

50

エチルヌクレオシド及び2'-デオキシヌクレオシドの様々な組み合わせを含み得る。

【0314】

各個別領域は、均一な糖部、変異又は交互の糖部を備え得る。ウイング-ギャップ-ウイングモチーフは「X-Y-Z」と記載されることが多く、ここで「X」は5'-ウイングの長さを表し、「Y」はギャップの長さを表し、「Z」は3'-ウイングの長さを表す。「X」及び「Z」は、均一な、変異又は交互の糖部を備え得る。ある一定の実施形態において、「X」及び「Y」は、1以上の2'-デオキシヌクレオシドを含み得る。「Y」は、2'-デオキシヌクレオシドを備え得る。本明細書中で使用される場合、「X-Y-Z」として記載されるギャップマーは、ギャップが、5'-ウイング及び3'-ウイングのそれぞれに直接隣接して置かれるような立体配置を有する。従って、5'-ウイングとギャップとの間又はギャップと3'-ウイングとの間に介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書中に記載のアンチセンス化合物の何れも、ギャップマーモチーフを有し得る。ある一定の実施形態において、「X」及び「Z」は同じであり、その他の実施形態においてこれらは異なる。ある一定の実施形態において、「Y」は8から15個のヌクレオシドである。X、Y又はZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30以上のヌクレオシドの何れかであり得る。

10

【0315】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、3-10-4ギャップマーモチーフを保持する。

20

【0316】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、5-10-5ギャップマーモチーフを保持する。

【0317】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、5-10-6ギャップマーモチーフを保持する。

【0318】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、3-10-3ギャップマーモチーフを保持する。

【0319】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、4-12-4ギャップマーモチーフを保持する。

30

【0320】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、2-13-5ギャップマーモチーフを保持する。

【0321】

標的核酸、標的領域及びヌクレオチド配列

ある一定の実施形態において、GCCRは、ヌクレオチド3818000-3980000から短縮されたGENBANK受託番号NT_029289.10に相補的であるGENBANK受託番号のいずれかのようなヒト配列を有する(本明細書中で配列番号1として組み込まれる)。ある一定の実施形態において、GCCRは、ヌクレオチド1334000-1491000から短縮されたGENBANK受託番号NW_001120987.1に相補的であるようなアカゲザル配列を有する(本明細書中で配列番号2として組み込まれる)。

40

【0322】

本明細書中に含有される実施例の各配列番号で述べられる配列は、糖部、ヌクレオシド間結合又は核酸塩基への何らかの修飾と無関係であることを理解されたい。そのようなものとして、配列番号により指定されるアンチセンス化合物は、独立に糖部、ヌクレオシド間結合又は核酸塩基に対する1以上の修飾を備え得る。Issis番号(Issis No)により記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列及びモチーフの組み合わせを示す

50

。

【0323】

ある一定の実施形態において、標的領域は、標的核酸の構造的に定められる領域である。例えば、標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロン連結、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域又は他の定められる核酸領域を包含し得る。GCCRに対して構造的に定められる領域はNCBIなどの配列データベースからの受託番号により得ることができ、このような情報は、参照により本明細書中に組み込まれる。ある一定の実施形態において、標的領域は、標的領域内のある標的セグメントの5' 標的部位から、同じ標的領域内の別の標的セグメントの3' 標的部位の配列を包含し得る。

10

【0324】

標的化することは、所望の効果が生じるようにアンチセンス化合物がハイブリッド形成する少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。ある一定の実施形態において、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの低下である。ある一定の実施形態において、所望の効果は、標的核酸によりコードされるタンパク質レベルの低下又は標的核酸に付随する表現型の変化である。

【0325】

標的領域は、1以上の標的セグメントを含有し得る。標的領域内の複数の標的セグメントは重複し得る。あるいは、これらは非重複であり得る。ある一定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、約300を超えないヌクレオチドにより分離される。ある一定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上で、約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20もしくは10ヌクレオチドであるか、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20もしくは10ヌクレオチド以下であるか、又は前述の値の何れか2つにより定められる範囲である数のヌクレオチドにより分離される。ある一定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上で、5以下又は約5以下のヌクレオチドにより分離される。ある一定の実施形態において、標的セグメントは連続的である。本明細書中で列挙される5' 標的部位又は3' 標的部位の何れかである出発核酸を有する範囲により定められる標的領域が企図される。

20

【0326】

適切な標的セグメントは、5' UTR、コード領域、3' UTR、イントロン、エクソン又はエクソン/イントロン連結内で見出され得る。開始コドン又は終止コドンを含有する標的セグメントもまた適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、開始コドン又は終止コドンなど、ある一定の構造的に定められる領域を特に排除し得る。

30

【0327】

適切な標的セグメントの決定は、ゲノム全体での標的核酸の配列と他の配列の比較を含み得る。例えば、様々な核酸間で類似性領域を同定するために、BLASTアルゴリズムが使用され得る。この比較は、選択される標的核酸以外の配列（即ち、非標的又は標的外配列）と非特異的な方式でハイブリッド形成し得るアンチセンス化合物配列の選択を防ぎ得る。

40

【0328】

活性標的領域内でアンチセンス化合物の（例えば標的核酸レベルの%低下により定められるような）活性のばらつきがあり得る。ある一定の実施形態において、GCCR mRNAレベルの低下は、GCCR発現の阻害の指標である。GCCRタンパク質レベルの低下もまた、標的mRNA発現の阻害の指標である。さらに、表現型の変化は、GCCR発現阻害の指標である。ある一定の実施形態において、グルコース値低下、脂質レベル低下及び体重減少は、GCCR発現阻害の指標であり得る。ある一定の実施形態において、代謝性疾患に付随する症状の改善は、GCCR発現阻害の指標であり得る。ある一定の実施形態において、糖尿病に付随する症状の改善は、GCCR発現阻害の指標であり得る。ある一定の実施形態において、インスリン抵抗性の低下は、GCCR発現阻害の指標である

50

。ある一定の実施形態において、糖尿病バイオマーカーの低下は、GCCR発現阻害の指標であり得る。

【0329】

ハイブリッド形成

いくつかの実施形態において、ハイブリッド形成は、本明細書中で開示されるアンチセンス化合物とGCCR核酸との間で起こる。ハイブリッド形成の最も一般的な機構は、核酸分子の相補的核酸塩基間の水素結合（例えば、ワトソン-クリック、フーグスティーン又は逆フーグスティーン水素結合）を含む。

【0330】

ハイブリッド形成は様々な条件下で起こり得る。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、ハイブリッド形成させようとする核酸分子の性質及び組成により決定される。

【0331】

配列が標的核酸と特異的にハイブリッド形成するか否かを決定する方法は当技術分野で周知である。ある一定の実施形態において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物はGCCR核酸と特異的にハイブリッド形成可能である。

【0332】

相補性

アンチセンス化合物及び標的核酸は、アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、所望の効果が生じるように（例えばGCCR核酸などの標的核酸のアンチセンス阻害）標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合し得る場合、互いに相補的である。

【0333】

アンチセンス化合物は、介入又は隣接セグメントがハイブリッド形成事象に含まれないように（例えばループ構造、ミスマッチ又はヘアピン構造）、GCCR核酸の1以上のセグメントにわたりハイブリッド形成し得る。

【0334】

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物又はその特定部分は、GCCR核酸、標的領域、標的セグメント又はその特定部分に対して、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%相補的である。標的核酸とのアンチセンス化合物の%相補性は、従来からの方法を用いて決定され得る。

【0335】

例えば、アンチセンス化合物の20個の核酸塩基のうち18個が標的領域に相補的であり、従って特異的にハイブリッド形成するアンチセンス化合物は、90%の相補性を示す。この例において、残りの非相補的核酸塩基は、密集していてもよいし又は散在していてもよいし、散在して相補的核酸塩基が間に入ってもよく、互いに対して又は相補的核酸塩基に対して連続している必要はない。そのようなものとして、標的核酸との完全相補性の2つの領域が隣接する4個の非相補的核酸塩基を有する18核酸塩基長であるアンチセンス化合物は、標的核酸と全体で77.8%の相補性があり、従って本発明の範囲内に入る。標的核酸の領域とのアンチセンス化合物の%相補性は、当技術分野で公知のBLASTプログラム(basic local alignment search tools)及びPowerBLASTプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang及びMadden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)を用いて通常どおり決定され得る。%相同性、配列同一性又は相補性は、例えば、Smith及びWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を使用する初期設定を用いて、Gapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)によって決定され得る。

【0336】

10

20

30

40

50

ある一定の実施形態において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物又はその特定部分は、標的核酸又はその特定部分に完全に相補的（即ち100%相補的）である。例えば、アンチセンス化合物は、GCCR核酸、標的領域、標的セグメント又はその標的配列に完全に相補的であり得る。本明細書中で使用される場合、「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各核酸塩基が標的核酸の対応する核酸塩基と正確な塩基対形成可能であることを意味する。例えば、20個の核酸塩基アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物に対して完全に相補的である標的核酸の対応する20個の核酸塩基部分がある限り、400核酸塩基長である標的配列に対して完全に相補的である。完全に相補的とは、第一及び/又は第二の核酸の指定の部分に関しても使用され得る。例えば、30個の核酸塩基アンチセンス化合物の20個の核酸塩基部分は、400核酸塩基長である標的配列に対して「完全に相補的」であり得る。30個の核酸塩基オリゴヌクレオチドのうち20個の核酸塩基部分は、標的配列が対応する20個の核酸塩基部分を有し、各核酸塩基がアンチセンス化合物の20個の核酸塩基部分に対して相補的である場合、標的配列に対して完全に相補的である。同時に30個の核酸塩基アンチセンス化合物全体は、アンチセンス化合物の残りの10個の核酸塩基も標的配列に相補的であるか否かに依存して、標的配列に完全に相補的である場合もない場合もある。

10

20

30

40

50

【0337】

非相補的核酸塩基の位置は、本アンチセンス化合物の5'末端又は3'末端であり得る。あるいは、非相補的核酸塩基は、本アンチセンス化合物の内部の位置であり得る。2以上の非相補的核酸塩基が存在する場合、これらは連続的（即ち連結されている。）でもよいし、又は非連続的でもよい。ある実施形態において、非相補的核酸塩基は、ギャップマアンチセンスオリゴヌクレオチドのウイングセグメントに置かれる。

【0338】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸又はその特定部分などの標的核酸に対して、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個の核酸塩基長であるか又はそれ以下の長さの核酸塩基であるアンチセンス化合物は、4個以下、3個以下、2個以下又は1個以下の非相補的核酸塩基を備える。

【0339】

ある一定の実施形態において、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29もしくは30であるか又はそれ以下の核酸塩基長であるアンチセンス化合物は、GCCR核酸又はその特定部分などの標的核酸に対して、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下又は1個以下の非相補的核酸塩基を備える。

【0340】

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物はまた、標的核酸の一部に対して相補的であるものも含む。本明細書中で使用される場合、「一部」は、標的核酸の領域又はセグメント内の定められた数の連続的（即ち連結される）核酸塩基を指す。「一部」は、アンチセンス化合物の定められた数の連続核酸塩基も指し得る。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも8個の核酸塩基部分に対して相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも12個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも13個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも14個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも15個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも16個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも17個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも18個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少な

くとも19個の核酸塩基部分に相補的である。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも20個の核酸塩基部分に相補的である。また、標的セグメントの少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上の核酸塩基部分又はこれらの値のうち何れか2個により定められる範囲の核酸塩基部分に対して相補的であるアンチセンス化合物も企図される。

【0341】

同一性

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物はまた、特定のヌクレオチド配列、配列番号又は具体的なI s i s番号により表される化合物又はそれらの一部に対する定められる%同一性も有し得る。本明細書中で使用される場合、アンチセンス化合物は、それが同じ核酸塩基対形成能を有する場合、本明細書中で開示される配列と同一である。例えば開示されるDNA配列においてチミジンの代わりにウラシルを含有するRNAは、ウラシル及びチミジンの両者ともアデニンと対形成するので、DNA配列と同一であるとみなされる。本明細書中に記載のアンチセンス化合物ならびに本明細書中で提供されるアンチセンス化合物と非同一である塩基を有する化合物の短縮型及び延長型も企図される。非同一である塩基は互いに隣接していてもよいし、又はアンチセンス化合物全体に分散していてもよい。アンチセンス化合物の%同一性は、それが比較される配列に対して同一塩基対形成を有する塩基数に従い計算される。

10

【0342】

ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物又はその一部は、本明細書中で開示されるアンチセンス化合物又は配列番号又はその一部の1以上と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である。

20

【0343】

修飾

ヌクレオシドは塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの(塩基としても知られる)核酸塩基部分は通常、複素環塩基部である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部に共有結合されるリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むこれらのヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の2'、3'又は5'ヒドロキシル部分に連結され得る。オリゴヌクレオチドは、線状のポリマー性オリゴヌクレオチドを形成するために、互いに対する隣接ヌクレオシドの共有結合を通じて形成される。オリゴヌクレオチド構造内で、リン酸基は一般的には、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成すると言われる。

30

【0344】

アンチセンス化合物に対する修飾は、ヌクレオシド間結合、糖部又は核酸塩基に対する置換又は変化を包含する。修飾アンチセンス化合物は、例えば細胞取り込み促進、核酸標的に対する親和性促進、ヌクレアーゼ存在下での安定性向上又は阻害活性向上などの所望の特性ゆえに、ネイティブ型を上回り、好ましいことが多い。

【0345】

化学修飾ヌクレオシドは、短縮化又は短縮されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのその標的核酸への結合親和性を向上させるためにも使用され得る。結果的に、このような化学修飾ヌクレオシドを有するより短いアンチセンス化合物を用いて同等の結果が得られることが多い。

40

【0346】

修飾ヌクレオシド間結合

RNA及びDNAの天然のヌクレオシド間結合は、3'から5'のホスホジエステル結合である。例えば細胞取り込み促進、核酸標的に対する親和性促進、ヌクレアーゼ存在下での安定性向上などの所望の特性ゆえに、天然のヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物よりも、1以上の修飾された、即ち非天然のヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物が選択されることが多い。

50

【0347】

修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を保持するヌクレオシド間結合ならびにリン原子を有しないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホールアミデート及びホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定されない。リン含有及び非リン含有結合の調製の方法は周知である。

【0348】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、1以上の修飾ヌクレオシド間結合を備える。ある一定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。ある一定の実施形態において、アンチセンス化合物の各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

10

【0349】

修飾糖部

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物は、場合によっては糖基が修飾されている1以上のヌクレオシドを含有し得る。このような糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の促進、結合親和性の向上又はいくつかの他の有益な生物学的特性を本アンチセンス化合物に付与し得る。ある一定の実施形態において、ヌクレオシドは、化学的に修飾されたリボフラノース環部を備える。化学的に修飾されたリボフラノース環の例としては、置換基の付加(5'及び2'置換基を含む。);二環性核酸(BNA)を形成するための非ジェミナル環原子の架橋;リボシル環酸素原子のS、N(R)又はC(R1)(R)2(R=H、C₁-C₁₂アルキル又は保護基)での置換;及びそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。化学的に修飾された糖の例としては、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド(他の開示される5',2'-ビス置換ヌクレオシドに対しては、2008年8月21日公開のPCT国際出願WO2008/101157を参照)、2'-位でさらなる置換がある、Sでのリボシル環酸素原子の置換(米国特許出願公開第US2005/0130923号、2005年6月16日公開参照)又はBNAの5'-置換(LNAが例えば5'-メチル又は5'-ビニル基で置換されている、2007年11月22日公開のPCT国際出願WO2007/134181号参照)が挙げられる。

20

【0350】

修飾糖部を有するヌクレオシドの例としては、5'-ビニル、5'-メチル(R又はS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を備えるヌクレオシドが挙げられるが、これに限定されない。2'位の置換基は、アリール、アミノ、アジド、チオ、O-アリール、O-C₁-C₁₀アルキル、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)及びO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)(式中、各R_m及びR_nは、独立に、H又は置換もしくは未置換C₁-C₁₀アルキルである。)からも選択され得る。

30

【0351】

本明細書中で使用される場合、「二環性ヌクレオシド」は、二環性糖部を備える修飾ヌクレオシドを指す。二環性ヌクレオシドの例としては、4'と2'リボシル環原子との間の架橋を備えるヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。ある一定の実施形態において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物は、架橋が4'-2'二環性ヌクレオシドを備える、1以上の二環性ヌクレオシドを含む。このような4'-2'二環性ヌクレオシドの例としては、式:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'及び4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'及びその類似体(2008年7月15日発行の米国特許第7,399,845号参照);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'及びその類似体(2009年1月8日公開の、PCT国際出願公開WO2009/006478号参照);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'及びその類似体(2008年12月11日公開の、PCT国際出願公開WO2008/150729参照);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(2004年9月2日公開の、米国特許出願公開第US

40

50

2004/0171570号参照); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (式中、RはH、C₁-C₁₂アルキル又は保護基である。)(2008年9月23日発行の、米国特許第7,427,672号参照); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (Chatto padhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照); 及び4'-CH₂-C(=CH₂)-2' 及びその類似体(2008年12月8日公開の、PCT国際出願公開WO2008/154401号参照)のうち1つが挙げられるが、これらに限定されない。また、例えば: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129(26)8362-8379 (2007年7月4日); Elayadi et al., Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 米国特許第U.S. 6,670,461号、同第7,053,207号、同第6,268,490号、同第6,770,748号、同第6,794,499号、同第7,034,133号、同第6,525,191号、同第7,399,845号; PCT国際出願公開WO2004/106356号、WO94/14226号、WO2005/021570号及びWO2007/134181号; 米国特許出願公開第US2004/0171570号、US2007/0287831号及びUS2008/0039618号; 及び米国特許シリアル番号第12/129,154号、同第60/989,574号、同第61/026,995号、同第61/026,998号、同第61/056,564号、同第61/086,231号、同第61/097,787号及び同第61/099,844号; 及びPCT国際出願第PCT/US2008/064591号、PCT/US2008/066154号及びPCT/US2008/068922号も参照のこと。前述の二環性ヌクレオシドのそれぞれは、例えば -L-リボフラノース及び -D-リボフラノースを含む1以上の立体化学的糖立体配置を有するように調製され得る(WO99/14226として1999年3月25日公開の、PCT国際出願PCT/DK98/00393を参照)。

【0352】

ある一定の実施形態において、BNAヌクレオシドの二環性糖部としては、ペントフラノシル糖部の4'と2'位との間に少なくとも1つの架橋を有し、このような架橋が独立に、-[C(R_a)(R_b)]_n-、-C(R_a)=C(R_b)-、-C(R_a)=N-、-C(=NR_a)-、-C(=O)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R_a)₂-、-S(=O)_x- 及び -N(R_a)- (式中、

xは、0、1又は2であり;

nは、1、2、3又は4であり;

各R_a及びR_bは、独立に、H、保護基、ヒドロキシル、C₁-C₁₂アルキル、置換C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換C₂-C₁₂アルキニル、C₅-C₂₀アリール、置換C₅-C₂₀アリール、複素環基、置換複素環基、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₅-C₇脂環式基、置換C₅-C₇脂環式基、ハロゲン、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、アシル(C(=O)-H)、置換アシル、CN、スルホニル(S(=O)₂-J₁)又はスルホキシル(S(=O)-J₁)であり;

各J₁及びJ₂は、独立に、H、C₁-C₁₂アルキル、置換C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換C₂-C₁₂アルキニル、C₅-C₂₀アリール、置換C₅-C₂₀アリール、アシル(

C(=O)-H)、置換アシル、複素環基、置換複素環基、C₁-C₁₂アミノアルキル、置換C₁-C₁₂アミノアルキル又は保護基である。)

から独立に選択される1又は2から4個の連結基を備える化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0353】

ある一定の実施形態において、二環性糖部の架橋は、- [C (R_a) (R_b)]_n -、- [C (R_a) (R_b)]_n - O -、- C (R_a R_b) - N (R) - O - 又は - C (R_a R_b) - O - N (R) - である。ある一定の実施形態において、架橋は、4' - CH₂ - 2'、4' - (CH₂)₂ - 2'、4' - (CH₂)₃ - 2'、4' - CH₂ - O - 2'、4' - (CH₂)₂ - O - 2'、4' - CH₂ - O - N (R) - 2' 及び 4' - CH₂ - N (R) - O - 2' - (式中、各 R は、独立に H、保護基又は C₁ - C₁₂ アルキルである。) である。

10

【0354】

ある一定の実施形態において、二環性ヌクレオシドは、異性体の立体配置によってさらに定められる。例えば、4' - 2' メチレン - オキシ架橋を備えるヌクレオシドは、- L 立体配置又は - D 立体配置であり得る。以前に、- L - メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') BNA が、アンチセンス活性を示したアンチセンスオリゴヌクレオチドに組み込まれている (Frieden et al., Nucleic Acid Research, 2003, 21, 6365 - 6372)。

20

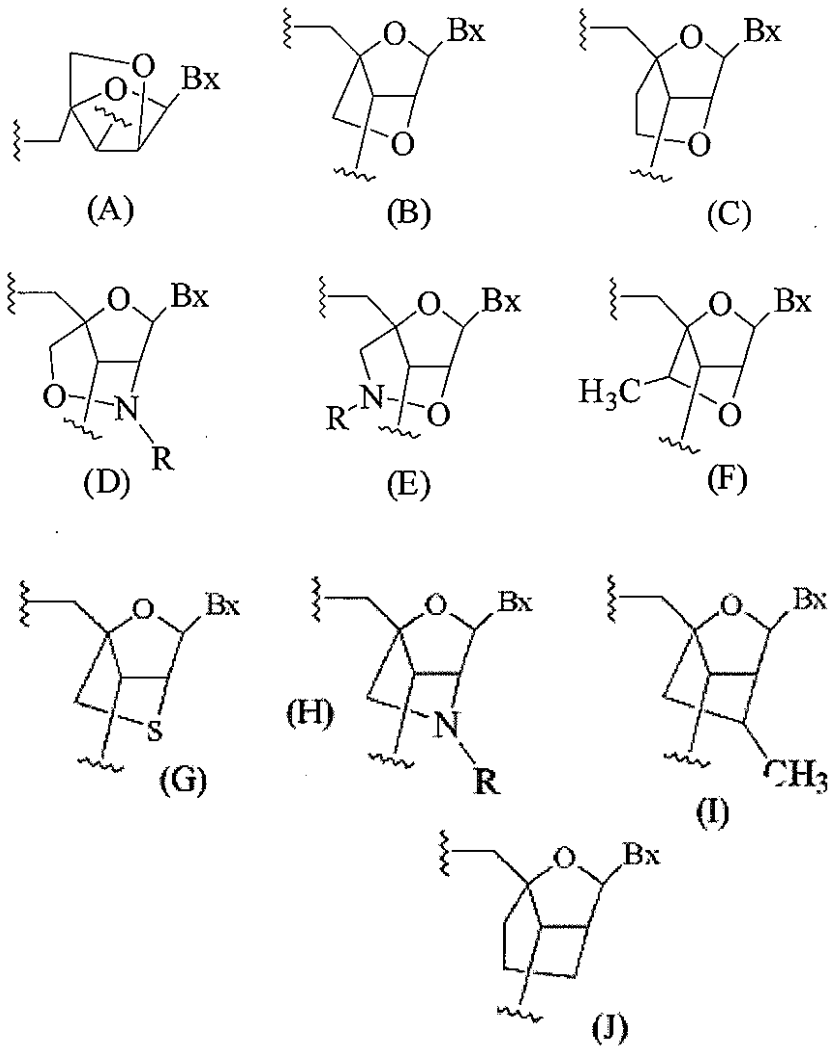
【0355】

ある一定の実施形態において、二環性ヌクレオシドとしては、下記で示されるような、(A) - L - メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') BNA、(B) - D - メチレンオキシ (4' - CH₂ - O - 2') BNA、(C) エチレンオキシ (4' - (CH₂)₂ - O - 2') BNA、(D) アミノオキシ (4' - CH₂ - O - N (R) - 2') BNA、(E) オキシアミノ (4' - CH₂ - N (R) - O - 2') BNA、(F) メチル (メチレンオキシ) (4' - CH (CH₃) - O - 2') BNA、(G) メチレン - チオ (4' - CH₂ - S - 2') BNA、(H) メチレン - アミノ (4' - CH₂ - N (R) - 2') BNA、(I) メチル炭素環式 (4' - CH₂ - CH (CH₃) - 2') BNA 及び (J) プロピレン炭素環式 (4' - (CH₂)₃ - 2') BNA が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0356】

【化 1】



10

20

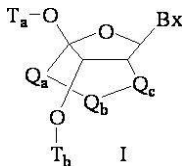
式中、Bxは塩基部であり、Rは、独立にH、保護基又はC₁-C₁₂アルキルである

30

【0357】

ある一定の実施形態において、式Iを有する二環性ヌクレオシド：

【化 2】



40

式中：

Bxは複素環塩基部であり；

-Q_a-Q_b-Q_c-は、-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-又は-N(R_c)-O-CH₂であり；

R_cは、C₁-C₁₂アルキル又はアミノ保護基であり；

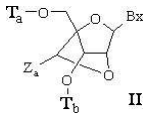
T_a及びT_bは、それぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合である。

【0358】

ある一定の実施形態において、式IIを有する二環性ヌクレオシド：

50

【化 3】



式中：

B x は複素環塩基部であり；

T a 及び T b は、それぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合であり；

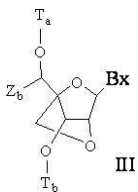
Z a は C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオール又は置換チオである。 10

ある実施形態において、置換基のそれぞれは、独立に、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、O J_c、N J_c J_d、S J_c、N₃、O C (= X) J_c 及び N J_e C (= X) N J_c J_d から独立に選択される置換基で単置換又は多置換され、各 J_c、J_d 及び J_e は、独立に、H、C₁ - C₆ アルキル又は置換 C₁ - C₆ アルキルであり、X は、O 又は N J_c である。

【 0 3 5 9 】

ある一定の実施形態において、式 I I I を有する二環性ヌクレオシド：

【化 4】



式中：

B x は複素環塩基部であり；

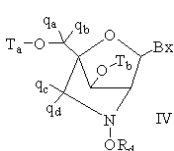
T a 及び T b はそれぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合であり； 30

Z b は、C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル又は置換アシル (C (= O) -) である。

【 0 3 6 0 】

ある一定の実施形態において、式 I V を有する二環性ヌクレオシド：

【化 5】



式中：

B x は複素環塩基部であり；

T a 及び T b はそれぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合であり；

R d は、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル又は置換 C₂ - C₆ アルキニルであり；

各 q a、q b、q c 及び q d は独立に、H、ハロゲン、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル又は置換 C₂ - C₆ アルキニル、C₁ - C₆ アルコキシル、置換 C₁ - C₆ アルコキ 40

10

20

30

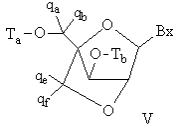
40

50

シル、アシル、置換アシル、 $C_1 - C_6$ アミノアルキル又は置換 $C_1 - C_6$ アミノアルキルであり；

ある一定の実施形態において、式 V を有する二環性ヌクレオシド：

【化 6】



式中、

B x は複素環塩基部分であり；

T a 及び T b はそれぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合であり；

q a、q b、q e 及び q f はそれぞれ独立に、水素、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、 $O J_j$ 、 $S J_j$ 、 $SO J_j$ 、 $SO_2 J_j$ 、 $N J_j J_k$ 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)O J_j$ 、 $C(=O)N J_j J_k$ 、 $C(=O) J_j$ 、 $O - C(=O)N J_j J_k$ 、 $N(H)C(=NH)N J_j J_k$ 、 $N(H)C(=O)N J_j J_k$ 又は $N(H)C(=S)N J_j J_k$ であるか；

又は q e 及び q f は一緒に $=C(q_g)(q_h)$ であり；

q g 及び q h はそれぞれ独立に、H、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル又は置換 $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

それらのオリゴマー化とのメチレンオキシ ($4' - CH_2 - O - 2'$) BNA 単量体アデニン、シトシン、グアニン、5 - メチル - シトシン、チミン及びウラシルの合成及び調製ならびに核酸認識特性が記載されている (例えば Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607 - 3630 参照)。BNA 及びその調製も WO98/39352 及び WO99/14226 に記載されている。

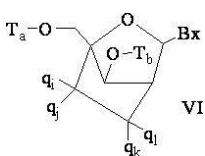
【0361】

メチレンオキシ ($4' - CH_2 - O - 2'$) BNA、メチレンオキシ ($4' - CH_2 - O - 2'$) BNA 及び 2' - チオ - BNA の類似体も調製されている (例えば Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219 - 2222 を参照)。核酸ポリマーゼに対する基質としてのオリゴデオキシリボヌクレオチド 2 本鎖を備えるロックドヌクレオシド類似体の調製も記載されている (例えば Wengel et al., WO99/14226 参照)。さらに、2' - アミノ - BNA の合成、新規の立体配座的に制限される高親和性オリゴヌクレオチド類似体が当技術分野で記載されている (例えば Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035 - 10039 参照)。さらに、2' - アミノ - 及び 2' - メチルアミノ - BNA が調製されており、相補的 RNA 及び DNA 鎖とのそれらの 2 本鎖の温度安定性が既に報告されている。

【0362】

ある一定の実施形態において、式 VI を有する二環性ヌクレオシド：

【化 7】



式中：

B x は複素環塩基部であり；

T_a 及び T_b はそれぞれ独立に、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部又は支持媒体に対する共有結合であり；

各 q_i 、 q_j 、 q_k 及び q_l は、独立に、H、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 又は $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ であり；

q_i 及び q_j 又は q_l 及び q_k は一緒に $=C(q_g)(q_h)$ であり、 q_g 及び q_h は、それぞれ独立に、H、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル又は置換 $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

【0363】

4' - $(CH_2)_3$ - 2' 架橋及びアルケニル類似体、架橋 4' - $CH=CH-CH_2-2'$ を有するある炭素環式二環性ヌクレオシドが記載されている（例えば Freier et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429 - 4443 及び Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731 - 7740 参照）。それらのオリゴマー化及び生化学的研究との炭素環式二環性ヌクレオシドの合成及び調製も記載されている（例えば Srivastava et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(26), 8362 - 8379 参照）。

【0364】

本明細書中で使用される場合、「4' - 2' 二環性ヌクレオシド」又は「4' - 2' 二環性ヌクレオシド」は、2' 炭素原子及び 4' 炭素原子を連結する架橋を備えるフラノース環を備える二環性ヌクレオシドを指す。

【0365】

本明細書中で使用される場合、「単環ヌクレオシド」は、二環性糖部ではない修飾糖部を備えるヌクレオシドを指す。ある一定の実施形態において、ヌクレオシドの糖部又は糖部類似体は、あらゆる位置で修飾又は置換され得る。

【0366】

本明細書中で使用される場合、「2' - 修飾糖」は、2' 位で修飾されたフラノシル糖を意味する。ある一定の実施形態において、このような修飾は、置換及び未置換アルコキシ、置換及び未置換チオアルキル、置換及び未置換アミノアルキル、置換及び未置換アルキル、置換及び未置換アリールならびに置換及び未置換アルキニルを含むが限定されないハロゲン化物から選択される置換基を含む。ある一定の実施形態において、2' 修飾は、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、 $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ 及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ （式中、 n 及び m は 1 から約 10 である。）を含むが限定されない置換基から選択される。他の 2' - 置換基はまた、 $C_1 - C_{12}$ アルキル；置換アルキル；アルケニル；アルキニル；アルカリル；アラルキル； O - アルカリル又は O - アラルキル； SH ； SCH_3 ； OCN ； Cl ； Br ； CN ； CF_3 ； OCF_3 ； $SOCH_3$ ； SO_2CH_3 ； ONO_2 ； NO_2 ； N_3 ； NH_2 ；複素環アルキル；複素環アルカリル；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；挿入剤；薬物動態学的特性を向上させるための基；及びアンチセンス化合物の薬学的特性を向上させるための基、及び同様の特性を有する他の置換基からも選択され得る。ある一定の実施形態において、修飾ヌクレオシドは 2' - MOE 側鎖を備える（例えば Baker et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11944 - 12000 参照）。このような 2' - MOE 置換は、未修飾ヌクレオシドと、及び他の修飾ヌクレオシド、例えば 2' - O - メチル、 O - プロピル及び O - アミノプロピルなどと比較して、結合親和性が向上していることが記載されている。2' - MOE 置換基を有するオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドはまた、インピボでの使用に対して有望な特長がある遺伝子発現のアンチセンス阻害剤であることも示されている（例えば Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; 及び Altmann et al., *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926 参照）。

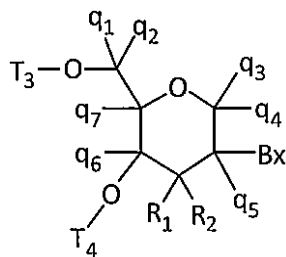
【0367】

本明細書中で使用される場合、「修飾テトラヒドロピランヌクレオシド」又は「修飾 THPヌクレオシド」とは、六員のテトラヒドロピラン「糖」で、通常のヌクレオシドにおけるペントフラノシル残基が置換されているヌクレオシドを意味する（糖代理物）。修飾 THPヌクレオシドとしては、当技術分野でヘキシトール核酸（HNA）、アニトール核酸（ANA）、マニトール核酸（MNA）（Leumann, C.J. *Bioorg. & Med. Chem.* (2002) 10: 841-854 参照）、フルオロHNA（F-HNA）と呼ばれるもの又は式 X を有する化合物：

10

【化8】

式 X :



20

X

（式中、式 X の少なくとも 1 つのテトラヒドロピランヌクレオシド類似体のそれぞれに対して独立に：

B x は複素環塩基部であり；

T₃ 及び T₄ はそれぞれ独立に、本アンチセンス化合物にテトラヒドロピランヌクレオシド類似体を連結するヌクレオシド間連結基であるか、又は T₃ 及び T₄ のうち一方が、本アンチセンス化合物にテトラヒドロピランヌクレオシド類似体を連結するヌクレオシド間連結基であり、T₃ 及び T₄ の他方が H、ヒドロキシル保護基、連結される共役基又は 5' もしくは 3' 末端基であり；

30

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆ 及び q₇ は、それぞれ独立に、H、C₁-C₆ アルキル、置換 C₁-C₆ アルキル、C₂-C₆ アルケニル、置換 C₂-C₆ アルケニル、C₂-C₆ アルキニル又は置換 C₂-C₆ アルキニルであり；

R₁ 及び R₂ のうち一方が水素であり、他方は、ハロゲン、置換又は未置換アルコキシ、N J₁ J₂、S J₁、N₃、OC(=X) J₁、OC(=X) N J₁ J₂、N J₃ C(=X) N J₁ J₂ 及び CN から選択され、式中、X は、O、S 又は N J₁ であり、各 J₁、J₂ 及び J₃ は、独立に H 又は C₁-C₆ アルキルである。) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0368】

ある一定の実施形態において、式中、q_m、q_n、q_p、q_r、q_s、q_t 及び q_u がそれぞれ H である、式 X の修飾 THPヌクレオシドが提供される。ある一定の実施形態において、q_m、q_n、q_p、q_r、q_s、q_t 及び q_u の少なくとも 1 つは H 以外である。ある一定の実施形態において、q_m、q_n、q_p、q_r、q_s、q_t 及び q_u の少なくとも 1 つはメチルである。ある一定の実施形態において、式中、R₁ 及び R₂ のうち一方が F である式 X の THPヌクレオシドが提供される。ある一定の実施形態において、R₁ はフルオロであり、R₂ は H であり、R₁ はメトキシであり、R₂ は H であり、R₁ はメ

50

トキシエトキシであり、 R_2 はHである。

【0369】

本明細書中で使用される場合、「2'修飾」又は「2'置換」は、H又はOHを除き、2'位に置換基を備える糖を備えるヌクレオシドを指す。2'-修飾ヌクレオシドとしては、糖環の架橋を連結する2個の炭素原子が糖環の2'炭素及び別の炭素を非架橋2'置換基、例えばアリアル、アミノ、アジド、チオ、O-アリアル、O- C_1-C_{10} アルキル、 $-OCF_3$ 、O- $(CH_2)_2-O-CH_3$ 、2'-O $(CH_2)_2SCH_3$ 、O- $(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 又はO- $CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ (式中、各 R_m 及び R_n は、独立にHであるか、又は置換もしくは未置換 C_1-C_{10} アルキルである。)など、と連結する、二環性ヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。2'-修飾ヌクレオシドは、例えば糖の他の位置に及び/又は核酸塩基において他の修飾をさらに備え得る。

10

【0370】

本明細書中で使用される場合、「2'-F」は、2'位にフルオロ基を備える糖を指す。

【0371】

本明細書中で使用される場合、「2'-OMe」、「2'-OCH₃」又は「2'-O-メチル」のそれぞれは、糖環の2'位に-OCH₃基を備える糖を指す。

【0372】

本明細書中で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」は、複数個の連結ヌクレオシドを備える化合物を指す。ある一定の実施形態において、この複数のヌクレオシドの1以上が修飾されている。ある一定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1以上のリボヌクレオシド(RNA)及び/又はデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

20

【0373】

アンチセンス化合物への組み込みのためにヌクレオシドを修飾するために使用され得る多くの他の二環式及び三環式糖代理環系も、当技術分野で公知である。(例えば、総説: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854参照)。このような環系は、活性を促進するための様々なさらなる置換を受け得る。

【0374】

修飾糖の調製のための方法は当業者にとって周知である。

30

【0375】

修飾糖部を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部(天然、修飾又はこれらの組み合わせ)は、適切な核酸標的とのハイブリッド形成のために維持される。

ある一定の実施形態において、アンチセンス化合物は、修飾糖部を有する1以上のヌクレオチドを備える。ある一定の実施形態において、修飾糖部は2'-MOEである。ある一定の実施形態において、2'-MOE修飾ヌクレオチドはギャップマーモチーフにおいて配置され得る。ある一定の実施形態において、修飾糖部はcEtである。ある一定の実施形態において、cEt修飾ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフのウイング全体にわたり配置される。

40

【0376】

修飾核酸塩基

核酸塩基(又は塩基)修飾又は置換は、天然又は合成未修飾核酸塩基とは、構造的に区別でき、さらに機能的には交換可能である。天然及び修飾核酸塩基の両者とも、水素結合に関与することが可能である。このような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性又はいくつかの他の有益な生物学的特性をアンチセンス化合物に付与し得る。修飾核酸塩基は、合成及び天然核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)などを含む。5-メチルシトシン置換を含むある一定の核酸塩基置換は、アンチセンス化合物の標的核酸に対する結合親和性を向上させるために特に有用である。例えば、5-メチルシトシン置換は、核酸二本鎖安定性を0.6-1.2、向上させることが示されている(

50

Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. 及び Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 - 278)。

【0377】

さらなる未修飾核酸塩基としては、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニン及びグアニンの、6 - メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの、2 - プロピル及び他のアルキル誘導体、2 - チオウラシル、2 - チオチミン及び2 - チオシトシン、5 - ハロウラシル及びシトシン、5 - プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル及びシトシン及びピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6 - アゾウラシル、シトシン及びチミン、5 - ウラシル(シュードウラシル)、4 - チオウラシル、8 - ハロ、8 - アミノ、8 - チオール、8 - チオアルキル、8 - ヒドロキシル及び他の8 - 置換アデニン及びグアニン、5 - ハロ、特に5 - プロモ、5 - トリフルオロメチル及び他の5 - 置換ウラシル及びシトシン、7 - メチルグアニン及び7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニン及び8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン及び7 - デアザアデニン及び3 - デアザグアニン及び3 - デアザアデニンが挙げられる。

10

【0378】

複素環塩基部はまた、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環、例えば7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアニン、2 - アミノピリジン及び2 - ピリドンで置換されるものも含み得る。アンチセンス化合物の結合親和性を向上させるために特に有用である核酸塩基としては、2アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシル及び5 - プロピニルシトシンを含め、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン及びN - 2、N - 6及びO - 6置換プリンが挙げられる。

20

【0379】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物は、1以上の修飾核酸塩基を備える。ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるギャップ拡大アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾核酸塩基を備える。ある一定の実施形態において、修飾核酸塩基は5 - メチルシトシンである。ある一定の実施形態において、各シトシンは5 - メチルシトシンである。

30

【0380】

医薬組成物を処方するための組成物及び方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物又は処方物の調製のために、医薬的に許容可能な活性又は不活性物質と混合され得る。医薬組成物の処方のための組成物及び方法は、投与経路、疾患の程度又は投与されるべき用量を含むがこれらに限定されない多くの基準に依存する。

【0381】

アンチセンス化合物を適切な医薬的に許容可能な希釈剤又は担体と合わせることによって、医薬組成物においてGCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物が利用され得る。医薬的に許容可能な希釈剤としては、リン酸緩衝食塩水(PBS)が挙げられる。PBSは、非経口的に送達されるべき組成物中での使用に適切な希釈剤である。従って、ある実施形態において、本明細書中に記載の方法で利用されるものは、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物と、医薬的に許容可能な希釈剤と、を備える医薬組成物である。ある一定の実施形態において、医薬的に許容可能な希釈剤はPBSである。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

40

【0382】

アンチセンス化合物を備える医薬組成物は、ヒトを含む動物に投与時、(直接又は間接的に)生物学的に活性のあるその代謝産物又は残基を提供可能である何らかの医薬的に許容可能な塩、エステル又はこのようなエステルの塩又は何らかの他のオリゴヌクレオチドを包含する。従って、本開示は、例えば、アンチセンス化合物の医薬的に許容可能な塩、

50

プロドラッグ、このようなプロドラッグの医薬的に許容可能な塩及び他の生物学的同等物にも関する。適切な医薬的に許容可能な塩としては、ナトリウム及びカリウム塩が挙げられるが、これらに限定されない。

本明細書中に記載の化合物の医薬的に許容可能な塩は、当技術分野で周知の方法によって調製され得る。医薬的に許容可能な塩の概説については、Stahl及びWermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)を参照。アンチセンスオリゴヌクレオチドのナトリウム塩は、ヒトへの治療的投与に対して有用であり、広く受け入れられている。従って、ある実施形態において、本明細書中に記載の化合物はナトリウム塩の形態である。

10

【0383】

活性アンチセンス化合物を生成させるために、プロドラッグは、体内の内在性ヌクレアーゼにより切断されるアンチセンス化合物の一方又は両末端におけるさらなるヌクレオシドの組み込みを含み得る。

【0384】

複合アンチセンス化合物

アンチセンス化合物は、活性、細胞分布又は得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞取り込みを促進する、1以上の部分又は複合物に共有結合され得る。典型的な共役基としては、コレステロール部及び脂質部が挙げられる。さらなる共役基としては、炭水化物、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、クマリン及び色素が挙げられる。

20

【0385】

アンチセンス化合物はまた、例えばヌクレアーゼ安定性などの特性を促進するために、アンチセンス化合物の一方又は両末端に一般に連結される1以上の安定化基を有するようにも修飾され得る。キャップ構造が安定化基に含まれる。これらの末端修飾は、エキソヌクレアーゼ分解から末端核酸を有するアンチセンス化合物を保護し、送達及び/又は細胞での局在に関与し得る。このキャップは5'-末端(5'-キャップ)もしくは3'-末端(3'-キャップ)に存在し得るか、又は両末端に存在し得る。キャップ構造は当技術分野で周知であり、例えば、逆位デオキシ脱塩基キャップを含む。ヌクレアーゼ安定性を付与するためにアンチセンス化合物の一方又は両末端にキャップ付加するために使用され得るさらなる3'及び5'-安定化基としては、2003年1月16日公開のWO03/004602で開示されるものが挙げられる。

30

【0386】

細胞培養及びアンチセンス化合物処理

GCCR核酸のレベル、活性又は発現におけるアンチセンス化合物の影響は、インビトロで様々な細胞タイプにおいて試験され得る。このような分析に対して使用される細胞タイプは市販業者から入手可能であり(例えばAmerican Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD)、細胞は、市販の試薬(例えばInvitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)を使用して業者の説明書に従い培養される。実例となる細胞タイプとしては、HepG2細胞及び初代培養肝細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0387】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロでの試験

他のアンチセンス化合物での処理のために適切に改変され得る、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの細胞の処理のための方法が本明細書中に記載されている。

【0388】

一般に、培養中で細胞がおよそ60から80%コンフルエンスに到達したら、アンチセンスオリゴヌクレオチドで細胞を処理する。

50

【0389】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために一般に使用されるある試薬としては、陽イオン性脂質形質移入試薬 LIPOFECTIN (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度及び一般的には 100 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドあたり 2 から 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である LIPOFECTIN (登録商標) 濃度を達成するために、OPTI-MEM (登録商標) 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で LIPOFECTIN (登録商標) と混合される。

【0390】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の試薬としては、LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度および、一般的に 100 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドあたり 2 から 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である LIPOFECTAMINE (登録商標) 濃度を達成するために、OPTI-MEM (登録商標) 1 低血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標) と混合される。

【0391】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の試薬としては、Cytfectin (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度及び一般的に 100 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドあたり 2 から 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲である Cytfectin (登録商標) 濃度を達成するために、OPTI-MEM (登録商標) 1 低血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で Cytfectin (登録商標) と混合される。

【0392】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の技術としては、エレクトロポレーションが挙げられる。

【0393】

従来からの方法によって細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。細胞は、一般的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理から 16 から 24 時間後に回収するが、このときに標的核酸のタイム RNA またはタンパク質レベルを当技術分野で公知の及び本明細書中に記載の方法により測定する。一般に、複数回繰り返して処理が行われる場合、データは、繰り返し処理の平均として与えられる。

【0394】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株によって変動する。特定の細胞株に対する最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を決定するための方法は当技術分野で周知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般的に、LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標)、Lipofectin 又は Cytfectin で形質移入した場合、1 nM から 300 nM の範囲の濃度で使用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、エレクトロポレーションを用いて形質移入される場合、625 から 20,000 nM の範囲のより高い濃度で使用される。

【0395】

RNA 単離

RNA 分析は、トータル細胞性 RNA 又はポリ(A) + mRNA において行われ得る。RNA 単離の方法は当技術分野で周知である。RNA は、例えば、製造者の推奨プロトコールに従い、TRIZOL (登録商標) 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて当技術分野で周知である方法を用いて調製される。

【0396】

標的レベル又は発現の阻害の分析

G C C R 核酸のレベル又は発現の阻害は、当技術分野で公知の様々な方法でアッセイされ得る。例えば、標的核酸レベルは、例えばノザンプロット分析、競合ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 又は定量的リアルタイム P C R によって定量され得る。RNA 分析は、トータル細胞性 RNA 又はポリ (A) + m R N A において行われ得る。RNA 単離の方法は当技術分野で周知である。ノザンプロット分析もまた当技術分野で通常のものである。定量的リアルタイム P C R は、P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A から入手可能であり、製造者の説明書に従い使用される市販の A B I P R I S M (登録商標) 7 6 0 0、7 7 0 0 又は 7 9 0 0 S e q u e n c e D e t e c t i o n S y s t e m を用いて都合よく完遂され得る。

10

【 0 3 9 7 】

標的 RNA レベルの定量的リアルタイム P C R 分析

標的 RNA レベルの定量は、製造者の説明書に従い、A B I P R I S M (登録商標) 7 6 0 0、7 7 0 0 又は 7 9 0 0 S e q u e n c e D e t e c t i o n S y s t e m (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) を用いて、定量的リアルタイム P C R により遂行され得る。定量的リアルタイム P C R の方法は当技術分野で周知である。

【 0 3 9 8 】

リアルタイム P C R 前に、単離 RNA は、逆転写酵素 (R T) 反応に供されるが、これは相補的 DNA (c D N A) を生成させ、次いでこれがリアルタイム P C R 増幅に対して基質として使用される。R T 及びリアルタイム P C R 反応は、同じ試料ウェル中で連続的に行われる。R T 及びリアルタイム P C R 試薬は I n v i t r o g e n (C a r l s b a d , C A) から入手される。R T、リアルタイム P C R 反応は当業者にとって周知の方法によって行われる。

20

【 0 3 9 9 】

リアルタイム P C R により得られる遺伝子 (又は RNA) 標的量は、シクロフィリン A などの発現が一定である遺伝子の発現レベルの何れかを用いるか又は R I B O G R E E N (登録商標) (I n v i t r o g e n , I n c . C a r l s b a d , C A) を用いてトータル RNA を定量することによって、正規化される。シクロフィリン A 発現は、リアルタイム P C R により、多重的に又は個別に、標的と同時に操作を行うことによって定量される。トータル RNA は、R I B O G R E E N (登録商標) RNA 定量試薬 (I n v i t r o g e n , I n c . E u g e n e , O R) を使用して定量される。R I B O G R E E N (登録商標) による RNA 定量の方法は、J o n e s , L . J . , e t a l . (A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , 1 9 9 8 , 2 6 5 , 3 6 8 - 3 7 4) において教示される。R I B O G R E E N (登録商標) 蛍光を測定するために、C Y T O F L U O R (登録商標) 4 0 0 0 機器 (P E A p p l i e d B i o s y s t e m s) が使用される。

30

【 0 4 0 0 】

プローブ及びプライマーは、G C C R 核酸とハイブリッド形成するように設計される。リアルタイム P C R プローブ及びプライマーを設計するための方法は、当技術分野で周知であり、P R I M E R E X P R E S S (登録商標) ソフトウェア (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) などのソフトウェアの使用を含み得る。

40

【 0 4 0 1 】

タンパク質レベルの分析

G C C R 核酸のアンチセンス阻害は、G C C R タンパク質レベルを測定することによって評価され得る。G C C R のタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンプロット分析 (免疫プロットティング)、酵素免疫測定アッセイ (E L I S A)、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ (例えばカスパーゼ活性アッセイ)、免疫組織化学、免疫細胞化学又は蛍光活性化セルソーティング (F A C S) などの当技術分野で周知である様々

50

な方法において評価又は定量され得る。標的に対する抗体は、抗体のMSRSカタログ(Aerie Corporation, Birmingham, MI)など、様々なソースから特定され、入手され得るか、又は当技術分野で周知である従来モノクローナル又はポリクローナル抗体作製方法を介して調製され得る。ヒト及びラットGCCRの検出に有用な抗体は市販されている。

【0402】

アンチセンス化合物のインビボ試験

アンチセンス化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらのGCCR発現阻害能及び表現型変化生成能を評価するために動物において試験される。試験は、正常な動物で又は実験的な疾患モデルで行われ得る。動物に対する投与の場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝食塩水などの医薬的に許容可能な希釈剤中で処方される。投与は、非経口の投与経路を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理期間後、組織からRNAを単離し、GCCR核酸発現の変化を測定する。GCCRタンパク質レベルの変化も測定する。

10

【0403】

ある一定の適応

ある一定の実施形態において、本明細書中に記載のような1以上の医薬組成物を投与することを備える、個体を処置する方法が本明細書中で提供される。ある一定の実施形態において、個体は代謝関連疾患を有する。

【0404】

下記の実施例で示されるように、本明細書中に記載のような、GCCRに対して標的化される化合物は、メタボリックシンドローム、糖尿病、インスリン抵抗性、糖尿病の脂質異常症、高トリグリセリド血症、肥満及び体重増加を含む代謝関連疾患の生理学的症状の重症度を低下させることが示され、例えば動物は症状が継続したが、未処置動物と比較してその症状の重症度が低下したことが示されている。ある一定の実験において、本化合物は、血糖値を低下させた。他の実験において、本化合物は糖尿病の症状を軽減する。他の実験において、本化合物は、体重増加を抑制する。他の実験において、本化合物は、高トリグリセリド血症を抑制する。ある一定の実施形態において、本化合物は、化合物の機能を回復させることにより、本明細書に記載された化合物での処置によって疾患の症状が逆転させる。ある一定の実施形態において、より長期間処置を受けた動物は、本化合物をより短期間投与された動物よりも症状の重症度が低下する。

20

【0405】

糖尿病は、多くの身体的及び生理学的兆候及び/又は症状を特徴とする。2型糖尿病に付随することが当業者にとって公知の何らかの症状は、上述の方法において上記で述べられるように、改善されるか又は調整され得る。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は、グルコース値上昇、体重増加、頻尿、異常な喉の渇き、過度の空腹、過度の疲労、視力障害、感染症の頻発、四肢の刺痛又は無感覚、皮膚の乾燥及びかゆみ、体重減少、回復が遅い痛み及び歯肉の腫脹などの身体的症状である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は、インスリン抵抗性上昇、グルコース値上昇、脂肪量増加、代謝率低下、糖クリアランス低下、耐糖能低下、インスリン感受性低下、肝臓インスリン感受性低下、脂肪組織サイズ及び重量上昇、体脂肪増加及び体重増加などの、生理学的症状である。

30

40

【0406】

ある一定の実施形態において、身体的兆候又は症状はグルコース値上昇である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は体重増加である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は頻尿である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は異常な喉の渇きである。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は過度の空腹である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は過度の疲労である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は視力障害である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は感染症の頻発である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は四肢の刺痛又は無感覚である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は皮膚の乾燥及びかゆみである。ある一定の

50

実施形態において、兆候又は症状は体重減少である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は回復が遅い痛みである。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は歯肉の腫脹である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状はインスリン抵抗性上昇である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状はグルコース値上昇である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は脂肪量増加である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は代謝率低下である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は糖クリアランス低下である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は耐糖能低下である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状はインスリン感受性低下である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は肝臓インスリン感受性低下である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は脂肪組織サイズ及び重量上昇である。ある一定の実施形態において、兆候又は症状は体脂肪増加である。ある一定の実施形態において、症状又は兆候は体重増加である。

10

【0407】

ある一定の実施形態において、本明細書中に記載のような1以上の医薬組成物を投与することを備える、個体を処置する方法が提供される。ある一定の実施形態において、個体は代謝関連疾患を有する。

【0408】

ある一定の実施形態において、GCCR核酸に対して標的化されるアンチセンス化合物の投与の結果、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%又はこれらの値のうち何れか2つにより定められる範囲、GCCR発現が低下する。

20

【0409】

ある一定の実施形態において、代謝関連疾患に罹患しているか又は罹患し易い患者を処置するための医薬の調製のために、GCCRに対して標的化されるアンチセンス化合物を備える医薬組成物が使用される。

【0410】

ある一定の実施形態において、本明細書中に記載の方法は、配列番号36挙げられる配列の本明細書中に記載のような連続核酸塩基部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを備える化合物を投与することを含む。ある一定の実施形態において、本化合物はISIS425115である。

30

【0411】

ある一定の併用療法

ある一定の実施形態において、本明細書中に記載の1以上の医薬組成物は、1以上の他の医薬剤と同時に投与される。ある一定の実施形態において、このような1以上の他の医薬剤は、本明細書中に記載の1以上の医薬組成物と同じ疾患、障害又は状態を処置するように設計される。ある一定の実施形態において、このような1以上の他の医薬剤は、本明細書中に記載の1以上の医薬組成物として異なる疾患、障害又は状態を処置するように設計される。ある一定の実施形態において、このような1以上の他の医薬剤は、本明細書中に記載のような1以上の医薬組成物の望ましくない副作用を処置するように設計される。ある一定の実施形態において、1以上の医薬組成物は、他の医薬剤の望ましくない影響を処置するために別の医薬剤と同時に投与される。ある一定の実施形態において、1以上の医薬組成物は、併用効果を生じさせるために別の医薬剤と同時に投与される。ある一定の実施形態において、1以上の医薬組成物は、相乗的效果を生じさせるために別の医薬剤と同時に投与される。

40

【0412】

ある一定の実施形態において、第一の薬剤及び1以上の第二の薬剤が同時に投与される。ある一定の実施形態において、第一の薬剤及び1以上の第二の薬剤が異なる時間に投与される。ある一定の実施形態において、第一の薬剤及び1以上の第二の薬剤は、単一の医薬処方物中で一緒に調製される。ある一定の実施形態において、第一の薬剤及び1以上の第二の薬剤は個別に調製される。

50

【0413】

ある一定の実施形態において、第二の化合物は、本明細書中に記載の医薬組成物の投与前に投与される。ある一定の実施形態において、第二の化合物は、本明細書中に記載の医薬組成物の投与後に投与される。ある一定の実施形態において、第二の化合物は、本明細書中に記載の医薬組成物として同時に投与される。ある一定の実施形態において、同時投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与された場合に投与される用量と同じである。ある一定の実施形態において、同時投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与された場合に投与される用量よりも少ない。ある一定の実施形態において、同時投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与された場合に投与される用量よりも多い。

10

【0414】

ある一定の実施形態において、第二の化合物の同時投与は、化合物の同時投与の結果、第一の化合物を単独で投与する効果よりも効果が大きくなるように、第一の化合物の効果を促進する。ある一定の実施形態において、同時投与の結果、単独投与された場合の化合物の効果の相加である効果が得られる。ある一定の実施形態において、同時投与の結果、単独投与された場合の化合物の効果の相加的效果を超える効果が得られる。ある一定の実施形態において、第一の化合物はアンチセンス化合物である。ある一定の実施形態において、第二の化合物はアンチセンス化合物である。

【0415】

ある一定の実施形態において、第二の薬剤としては、グルコース低下剤が挙げられるが、これらに限定されない。グルコース低下剤としては、治療的なライフスタイル変化、P PARアゴニスト、ジペプチジルペプチダーゼ (IV) 阻害剤、GLP-1類似体、インスリン又はインスリン類似体、インスリン分泌促進剤、SGLT2阻害剤、ヒトアミリン類似体、ピグアナイド、 α -グルコシダーゼ阻害剤又はこれらの組み合わせが挙げられ得るがこれらに限定されない。グルコース低下剤としては、メトホルミン、スルホニル尿素、ロシグリタゾン、メグリチニド、チアゾリジンジオン、 α -グルコシダーゼ阻害剤又はこれらの組み合わせが挙げられ得るがこれらに限定されない。スルホニル尿素は、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トルブタミド、トラザミド、グリメピリド、グリピジド、グリブリド又はグリクラジドであり得る。メグリチニドは、ナテグリニド又はレバグリニドであり得る。チアゾリジンジオンは、ピオグリタゾン又はロシグリタゾンであり得る。 α -グルコシダーゼは、アカルボース又はミグリトールであり得る。

20

30

【0416】

いくつかの実施形態において、グルコース低下治療薬はGLP-1類似体である。いくつかの実施形態において、GLP-1類似体は、エキセンジン-4又はリラグルチドである。

【0417】

他の実施形態において、グルコース低下治療薬はスルホニル尿素である。いくつかの実施形態において、スルホニル尿素は、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トルブタミド、トラザミド、グリメピリド、グリピジド、グリブリド又はグリクラジドである。

【0418】

いくつかの実施形態において、グルコース低下薬はピグアナイドである。いくつかの実施形態において、ピグアナイドはメトホルミンであり、いくつかの実施形態において、メトホルミン単独での処置後に観察される乳酸アシドーシスと比較した場合、乳酸アシドーシスを向上させることなく血糖値が低下させられる。

40

【0419】

いくつかの実施形態において、グルコース低下薬はメグリチニドである。いくつかの実施形態において、メグリチニドは、ナテグリニド又はレバグリニドである。

【0420】

いくつかの実施形態において、グルコース低下薬はチアゾリジンジオンである。いくつかの実施形態において、チアゾリジンジオンはピオグリタゾン、ロシグリタゾン又はトロ

50

グリタゾンである。いくつかの実施形態において、ロシグリタゾン単独での処置で観察されるものよりも大きな体重増加なく、血糖値が低下させられる。

【0421】

いくつかの実施形態において、グルコース低下薬は - グルコシダーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態において、 - グルコシダーゼ阻害剤は、アカルボース又はミグリトールである。

【0422】

ある一定の実施形態において、同時投与されるグルコース低下剤は I S I S 1 1 3 7 1 5 である。

【0423】

ある一定の実施形態において、グルコース低下療法は治療的なライフスタイル変化である。

【0424】

ある一定の実施形態において、第二の薬剤としては、脂質低下剤が挙げられるがこれに限定されない。脂質低下剤としては、アトロバスタチン、シンバスタチン、ロスバスタチン及びエゼチミブが挙げられ得るがこれらに限定されない。ある一定のこのような実施形態において、脂質低下剤は、本明細書中に記載の医薬組成物の投与前に投与される。ある一定のこのような実施形態において、脂質低下剤は、本明細書中に記載の医薬組成物の投与後に投与される。ある一定のこのような実施形態において、脂質低下剤は、本明細書中に記載の医薬組成物と同時に投与される。ある一定のこのような実施形態において、同時投与される脂質低下剤の用量は、脂質低下剤が単独で投与された場合に投与される用量と同じである。ある一定のこのような実施形態において、同時投与される脂質低下剤の用量は、脂質低下剤が単独で投与された場合に投与される用量よりも少ない。ある一定のこのような実施形態において、同時投与される脂質低下剤の用量は、脂質低下剤が単独で投与された場合に投与される用量よりも多い。

【0425】

ある一定の実施形態において、同時投与される脂質低下剤は、HMG - CoA レダクターゼ阻害剤である。ある一定のこのような実施形態において、HMG - CoA レダクターゼ阻害剤は、スタチンである。ある一定のこのような実施形態において、スタチンは、アトロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン及びロスバスタチンから選択される。

【0426】

ある一定の実施形態において、同時投与される脂質低下剤は、コレステロール吸収阻害剤である。ある一定のこのような実施形態において、コレステロール吸収阻害剤はエゼチミブである。

【0427】

ある一定の実施形態において、同時投与される脂質低下剤は、同時処方 HMG - CoA レダクターゼ阻害剤及びコレステロール吸収阻害剤である。ある一定のこのような実施形態において、同時処方される脂質低下剤はエゼチミブ/シンバスタチンである。

【0428】

ある一定の実施形態において、同時投与される脂質低下剤は、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質阻害剤 (MTP 阻害剤) である。

【0429】

ある一定の実施形態において、同時投与される脂質低下剤は、ApoB に標的化されるオリゴヌクレオチドである。

【0430】

ある一定の実施形態において、第二の薬剤としては、抗肥満薬又は薬剤が挙げられるが、これに限定されない。このような抗肥満剤としては、オルリスタット、又はリモナバンが挙げられるが、これらに限定されず、脂肪又は体重低下剤として上述のように投与され得る。ある一定の実施形態において、本アンチセンス化合物は、食欲抑制剤と同時投与さ

10

20

30

40

50

れ得る。このような食欲抑制剤としては、ジエチルプロピオンテヌエート、マジンドール、オルリスタット、フェンジメトラジン、及びフェンテルミンが挙げられるが、これらに限定されず、本明細書中に記載のように投与され得る。ある一定の実施形態において、抗肥満剤は、CNSベースのもの、又はGLP-1ベースのもの、例えば以下に限定されないがリラグルチドなどである。

【0431】

処方物

本明細書中で提供される化合物はまた、取り込み、分布及び/又は吸収を補助するために、他の分子、分子構造又は化合物の混合物、例としてはリポソーム、受容体-標的分子又は他の処方物と、混合、複合化又は会合させられ得る。このような取り込み、分布及び/又は吸収を補助する処方物の調製を教示する代表的な米国特許としては、それぞれ参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第5,108,921号;同第5,354,844号;同第5,416,016号;同第5,459,127号;同第5,521,291号;同第5,543,158号;同第5,547,932号;同第5,583,020号;同第5,591,721号;同第4,426,330号;同第4,534,899号;同第5,013,556号;同第5,108,921号;同第5,213,804号;同第5,227,170号;同第5,264,221号;同第5,356,633号;同第5,395,619号;同第5,416,016号;同第5,417,978号;同第5,462,854号;同第5,469,854号;同第5,512,295号;同第5,527,528号;同第5,534,259号;同第5,543,152号;同第5,556,948号;同第5,580,575号;及び同第5,595,756号が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0432】

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物は、医薬組成物又は処方物中に含まれ得る。本医薬組成物は、何らかの医薬的に許容可能な塩、エステルもしくはこのようなエステルの塩又はヒトを含む動物への投与時に生物学的に活性のある代謝産物もしくはその残基を(直接又は間接的に)提供することが可能である何らかの他の化合物を含み得る。

【0433】

「医薬的に許容可能な塩」という用語は、本明細書中で提供される化合物の生理学的に及び医薬的に許容可能な塩、即ち親化合物の所望の生物学的活性を保持し、それに対して望ましくない毒性の影響を付与しない塩を指す。「医薬的に許容可能な塩」という用語は、無機又は有機酸及び塩基を含め、医薬的に許容可能な非毒性酸又は塩基から調製される塩を含む。オリゴヌクレオチドの場合、医薬的に許容可能な塩及びそれらの使用の好ましい例は、その全体において本明細書中に組み込まれる米国特許第6,287,860号でさらに記載される。ナトリウム塩は、オリゴヌクレオチド薬の適切な形態であることが示されている。

30

【0434】

「医薬的に許容可能な誘導体」という用語は、本明細書中に記載の化合物の、医薬的に許容可能な塩、溶媒和物、水和物、エステル、プロドラッグ、多型体、異性体、同位体標識される変異体を包含するが、これらに限定されない。

40

【0435】

本明細書中に記載の医薬組成物は、局所又は全身的処置が所望されるか否か及び処置しようとする領域に依存して、多くの方法で投与され得る。投与は非経口であり得る。非経口投与としては、皮下、静脈内もしくは筋肉内注射又は点滴が挙げられるがこれらに限定されない。

【0436】

非経口投与は、肝臓及び血漿においてGCCR発現を標的とするために好ましい。少なくとも1個の2'-O-メトキシエチル修飾があるオリゴヌクレオチドは、非経口投与に特に有用であると思われる。

【0437】

50

単位剤形で都合よく与えられ得る本明細書中に記載の医薬処方物は、製薬業界で周知の従来の技術に従い調製され得る。このような技術は、活性成分を医薬担体又は賦形剤と組み合わせる段階を含む。一般に、本処方物は、均一に及び完全に活性成分を液体担体もしくは微粉化固形担体又は両者と合わせることによって調製される。

【0438】

本明細書中に記載の組成物はまた、水性、非水性又は混合溶媒中の懸濁液としても処方され得る。懸濁液はまた安定化剤も含有し得る。

【0439】

本明細書中に記載の医薬組成物としては、溶液、乳液及びリポソーム含有処方物が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中に記載の医薬組成物及び処方物は、1以上の浸透促進剤、担体、賦形剤又は他の活性もしくは不活性成分を備え得る。

10

【0440】

処方物はリポソーム性処方物を含む。本発明において使用される場合、「リポソーム」という用語は、球形の二重層（単数又は複数）に配置される両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リポソームは、脂溶性材料及び送達しようとする組成物を含有する水性の内部から形成される膜を有する単層又は多重膜小胞である。陽イオン性リポソームは、安定な複合体を形成するために負に荷電しているDNA分子と相互作用すると考えられている正に荷電しているリポソームである。pH感受性であるか又は負に荷電しているリポソームは、それとの複合体ではなく、DNAを取り込むと考えられる。陽イオン性及び非陽イオン性リポソームの両者とも、細胞にDNAを送達するために使用されてきた。

20

【0441】

リポソームは、「立体的に安定化された」リポソームも含み、この用語は、本明細書中で使用される場合、リポソームに組み込まれた場合に、その結果、このような特殊化した脂質を欠くリポソームと比べて循環寿命が延長される、1以上の特殊化した脂質を備えるリポソームを指す。リポソーム及びそれらの使用は、その全体において本明細書中に組み込まれる米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

【0442】

別の実施形態において、処方物は食塩水処方物を含む。ある一定の実施形態において、処方物は、本明細書中に記載の化合物及び食塩水からなる。ある一定の実施形態において、処方物は、基本的に本明細書中に記載の化合物及び食塩水からなる。ある一定の実施形態において、食塩水は医薬的に許容可能なグレードの食塩水である。ある一定の実施形態において、食塩水は緩衝食塩水である。ある一定の実施形態において、食塩水はリン酸緩衝食塩水（PBS）である。

30

【0443】

ある一定の実施形態において、処方物はリポソームを除外する。ある一定の実施形態において、処方物は、立体的に安定化されたリポソームを除外する。ある一定の実施形態において、処方物はリン脂質を除外する。ある一定の実施形態において、処方物は、基本的に本明細書中に記載の化合物及び食塩水からなり、リポソームを除外する。

【0444】

本医薬処方物及び組成物はまた界面活性剤も含み得る。界面活性剤及びそれらの使用は、その全体において本明細書中に組み込まれる米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

40

【0445】

ある実施形態において、本発明は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの効率的な送達に影響を及ぼすために様々な浸透促進剤を使用する。浸透促進剤及びそれらの使用は、その全体において本明細書中に組み込まれる米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

【0446】

静脈内、皮下及び筋肉内注射又は点滴を含む、非経口投与のための組成物及び処方物は、緩衝液、希釈剤及び他の適切な添加物、例えば、以下に限定されないが、浸透促進剤、

50

担体化合物及び他の医薬的に許容可能な担体又は賦形剤なども含有し得る滅菌水溶液を含み得る。

【0447】

別の関連実施形態において、本明細書中で提供される組成物は、第一の核酸に標的化される1以上のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、及び第二の核酸標的に標的化される1以上のさらなるアンチセンス化合物を含有し得る。あるいは、本明細書中で提供される組成物は、同じ核酸標的の様々な領域に標的化される2以上のアンチセンス化合物を含有し得る。アンチセンス化合物の多くの例が当技術分野で公知である。2以上の合わせられた化合物は、一緒に又は連続的に使用され得る。

【0448】

投薬

投薬は、処置しようとする病状の重症度及び反応性に依存し、一連の処置は、数日から数ヶ月、又は治療が効果をもたらすかもしくは病状の軽減が達成されるまで続く。最適な投薬スケジュールは、患者の身体での薬物蓄積の測定から計算され得る。最適な投与量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に依存して変動し得、一般にインビトロ及びインビボ動物モデルにおいて有効であることが見出される EC_{50} に基づいて推定され得る。一般に、投与量は $0.01 \mu g$ から $100 g/kg$ 体重であり、1日、1週間、1ヶ月もしくは1年に1回以上、又は所望の間隔で与えられ得る。良好な処置後、病状の再発を予防するために患者に維持療法を受けさせることも望ましいものであり得、この場合、オリゴヌクレオチドは、1日に1回以上、 $0.01 \mu g$ から $100 g/kg$ 体重の範囲の維持用量で投与される。

【0449】

ある一定のその好ましい実施形態に従い、具体的に本発明を記載してきたが、次の実施例は本発明を単に説明するものであり、これを限定するものではない。本願で挙げられる、参考文献、GenBank受託番号などはそれぞれ、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【0450】

ある一定の化合物

様々な長さの、約760種類の新規に設計された、及び既に開示されているアンチセンス化合物、モチーフ及びバックボーン組成物を、いくつかの細胞型におけるインビトロでのヒトGCCRM RNAにおけるそれらの効果について試験した(実施例1および2)。インビトロで最も効力の高いアンチセンス化合物のうちの一部であることが既に決定されている、ISIS377131、ISIS361137、ISIS361141、ISIS361151、ISIS361155およびISIS361156を含む以前に設計された化合物(例えば、国際特許公開第2007/035759号参照)と、新規化合物を比較した。約760種類の新規設計及び以前に設計されたアンチセンス化合物のうち、インビトロでの活性に基づきさらなる試験のために選択した化合物のみが提示される。

【0451】

これらの化合物の内15個が選択され、さらなる新規化合物を、これら化合物に基づき設計した。317種類の新規化合物を、元の化合物のアップストリームおよびダウンストリーム(すなわち、マイクロウォーク(microwalk))をわずかに転換した化合物を作製することにより設計した。新規化合物および元の化合物を、形質移入用のエレクトロポレーションおよび形質移入剤としてのリポフェクチンを使用してそれぞれ試験した(実施例3)。試験した332種類の化合物の内、インビトロでの活性に基づくさらなる研究で選択された化合物のみが提示される。この投薬反応アッセイのための72種類の化合物を、エレクトロポレーションおよび形質移入剤としてのリポフェクチンを使用してそれぞれ試験した(実施例4)。実施例4および5において記載される投薬反応アッセイにおいて、いくつかの例示的な化合物が、ISIS377131といった基準となる化合物よりも効力があることが見いだされた。29種類の化合物を、形質移入剤としてのエレクトロポレーションを用いた投薬反応アッセイを目的として選択し(実施例5)、12種類の

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドが、インビボでの齧歯類の忍容性の研究のために選択された。I S I S 4 2 0 4 7 0 (配列番号: 6)、I S I S 4 2 0 4 7 6 (配列番号: 7)、I S I S 4 2 6 1 1 5 (配列番号: 3 6)、I S I S 4 2 6 1 3 0 (配列番号: 3 3)、I S I S 4 2 6 1 6 8 (配列番号: 3 9)、I S I S 4 2 6 1 7 2 (配列番号: 4 2)、I S I S 4 2 6 1 8 3 (配列番号: 1 0)、I S I S 4 2 6 2 4 6 (配列番号: 1 1)、I S I S 4 2 6 2 6 1 (配列番号: 1 0)、I S I S 4 2 6 2 6 2 (配列番号: 3 5)、I S I S 4 2 6 2 6 7 (配列番号: 4 3) および I S I S 4 2 6 3 2 5 (配列番号: 4 2) の 1 2 種類化合物を、C D 1 マウスおよび S p r a g u e - D a w l e y ラットモデルにおいて忍容性を目的として試験した。化合物 I S I S 3 7 7 1 3 1 (配列番号: 4) を基準として進めた。本化合物は、配列番号 1 の領域 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、7 6 2 5 5 ~ 7 6 2 7 4、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 に相補的である。

10

【0452】

アラントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ及びビリルビンなどの肝臓機能マーカー及び B U N 及びクレアチニンなど腎臓機能マーカーおよび炎症マーカーを測定した(実施例 6 及び 7)。また、1 2 週間にわたり C D / 1 G S ラットモデルにおける忍容性に対する長期的効果について 1 3 種類の化合物をアッセイした(実施例 8)。アラントランスアミナーゼ、及びアスパラギン酸トランスアミナーゼなどの肝臓機能マーカー並びにクレアチニンに対する尿タンパク質など腎臓機能マーカーを測定した。

20

【0453】

これらの齧歯類の忍容性試験の最終評価(実施例 6 から 8) から、さらなる試験のため、1 2 種類のすべての化合物を選択した。

【0454】

インビトロでの効力およびインビボでの忍容性を含む利点のある特性を有するため、ある一定の実施形態において、本明細書で提供される化合物は、配列番号 6、7、3 6、3 3、3 9、4 2、1 0、1 1、3 5 及び 4 3 の内の 1 つの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、または少なくとも 2 0 個の連続核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する。ある一定の実施形態において、本化合物は、配列番号 1 の領域 5 7 8 2 5 ~ 5 7 8 4 4、5 9 9 5 6 ~ 5 9 9 7 5、6 3 6 7 7 ~ 6 3 6 9 6、6 5 9 3 8 ~ 6 5 9 5 7、6 5 9 3 9 ~ 6 5 9 5 8、6 5 9 4 0 ~ 6 5 9 5 9、7 6 2 2 4 ~ 7 6 2 4 3、7 6 2 2 5 ~ 7 6 2 4 4、7 6 2 2 9 ~ 7 6 2 4 8、及び 9 5 5 1 3 ~ 9 5 5 3 2 の内の 1 つと等長部分に相補的な少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、又は少なくとも 2 0 個の連続核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

30

【0455】

ある一定の実施形態において、領域を標的とするか又は列挙される配列番号において挙げられる配列の核酸塩基部分を有する化合物は、本明細書にさらに記載されるように様々な長さとすることができ、本明細書にさらに記載されるように多様なモチーフの内の 1 つを有することができる。ある特定の実施形態において、化合物は、I S I S 番号 4 2 0 4 7 0、4 2 6 4 7 6、4 2 6 1 1 5、4 2 6 1 3 0、4 2 6 1 6 8、4 2 6 1 7 2、4 2 6 1 8 3、4 2 6 2 4 6、4 2 6 2 6 1、4 2 6 2 6 2、4 2 6 2 6 7、及び 4 2 6 3 2 5 により示されるように、特異的な長さ及びモチーフを有する。カニクイザルにおいて、これらの 1 2 種類の化合物を活性、薬物動態学的プロファイル及び忍容性について試験した(実施例 9)。一部の化合物での処置は、肝臓組織における G C C R m R N A 発現の低下を引き起こした。具体的に、I S I S 4 2 0 4 7 6、I S I S 4 2 6 1 1 5 及び I S I S 4 2 6 3 2 5 での処置は、P B S 対照と比較して、肝臓組織での G C C R m R N A 発現の顕著な低下を引き起こした。

40

50

【0456】

また、カニクイザルにおいて忍容性試験も実行した（実施例9）。体重および臓器の重量を測定し、ALT、AST、アルカリホスファターゼ、およびビルビリリンレベルを測定し、肝臓機能の評価し、BUNおよびクレアチニンレベルを測定して腎臓機能の評価し、CRPおよび免疫細胞数を測定して炎症状態の評価し、肝臓および腎臓のオリゴヌクレオチド濃度を測定して本化合物の薬物動態の評価した。ISIS 426115での処置は、上述の全てのパラメータのベースライン値により示されるように、良好に忍容性であった。ISIS 420476, ISIS 426115, とISIS 426325の粘度をも測定して、いずれの三件の粘度は最適であることが確認された。

【0457】

従って、何らかの1以上の特徴が改善したアンチセンス化合物が本明細書中で提供される。ある一定の実施形態において、本明細書中に記載のような化合物は、実施例4及び5で記載されるようにエレクトロポレーションを用いてHe p G 2細胞株に送達された場合に3 μM未満、2.5 μM未満、2 μM未満、1.5 μM未満、1 μM未満のヒト細胞におけるインビトロIC₅₀の少なくとも1つを有するという理由で有効である。ある一定の実施形態において、本明細書に記載される化合物は、実施例4に記載されるリポフェクチン剤を使用してHe p G 2細胞に送達される場合、50 nM未満、45 nM未満、40 nM未満、35 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、20 nM未満のヒト細胞におけるIC₅₀の少なくとも1つを有するという理由で有効である。

【0458】

ある一定の実施形態において、本明細書中に記載のような化合物は、食塩水で処置された動物の50倍以下、40倍以下、30倍以下、20倍以下、10倍以下、5倍以下、4倍以下、3倍以下もしくは2倍以下のALTもしくはAST値の上昇；又は30%以下、20%以下、15%以下、12%以下、10%以下、5%以下もしくは2%以下の肝臓、脾臓もしくは腎臓重量の上昇の少なくとも1つを有することにより明らかになるように、非常に忍容性が高い。

実施例

【0459】

非限定的開示及び参照による組み込み

ある一定の実施形態に従い、本明細書中に記載のある一定の化合物、組成物及び方法を具体的に記載してきたが、次の実施例は本明細書中に記載の化合物を単に例示するものであり、これを限定するものではない。本願で挙げられる、参考文献はそれぞれ、その全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

【0460】

実施例1：He p G 2細胞におけるヒトグルコシルコイド受容体（GCCR）のアンチセンス阻害

ヒトGCCR核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、これらをインビトロにおけるGCCR mRNAでのその効果について試験した。以前に国際公開報第2005/071080号に記載のISIS 377131も本アッセイに含めた。120 nMアンチセンスオリゴヌクレオチドとともにリポフェクチン剤を用いて、10,000細胞/ウェルの密度で、培養He p G 2細胞に形質移入した。およそ24時間の処理時間後、細胞からRNAを単離し、定量的リアルタイムPCRによってGCCR mRNAレベルを測定した。mRNAレベルを測定するために、ヒトプライマープローブセットRTS 1408（本明細書中で配列番号58と呼ばれるフォワード配列GGAGATCATATAGACAATCAAGTGC AA；本明細書中で配列番号29と呼ばれるリバース配列GGGTAGAGTCA T T C T C T G C T C A T T A A；本明細書中で配列番号60と呼ばれるプローブ配列CTGTGTTT T G C T C C T G A T C T G A T）を使用した。RIBOGREEN（登録商標）で測定して、総RNA含量に従い、GCCR mRNAレベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対するGCCRの阻害%として提示される。460種類のオリゴヌクレオチドを試験し、さらなる試験のために選択されたオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドのみが提示される。

【0461】

表1の新規に設計されたキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを5-10-5MOEギャップマーとして設計した。このギャップマーは20ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌクレオシドを備え、各5個のヌクレオシドを備えるウイングセグメントが5'及び3'方向の両方に隣接する。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシド及び3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体にわたるヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート(P=S)結合である。各ギャップマー全体にわたるシトシン残基は全て、5-メチルシトシンである。「ヒト標的開始部位」は、ヒト遺伝子配列においてギャップマーが標的化される5'-モストヌクレオシドを示す。このギャップマーは、ヒトGCCR遺伝子配列のイントロン配列又はイントロン-エクソン連結部を標的とし、この配列は、(ヌクレオチド3818000-3980000から短縮されたGENBANK受託番号NT_029289.10と相補的な)配列番号1として示される。このデータは、配列番号1のイントロン領域に標的化したアンチセンスオリゴヌクレオチドは、GCCR mRNAレベルを有意に低下させることを示す。

10

【表1】

表1

配列番号1に対して標的化される5-10-5MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒトGCCR mRNAレベルの阻害

20

ISIS番号	ヒト開始部位	領域	配列	阻害%	配列番号
377131	37217	エクソン2	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	81	4
420450	51879	イントロン2	TCCACAGATCTCTAGGGCAG	87	5
420470	57825	イントロン2	GGTAGAAATATAGTTGTCC	77	6
420476	59956	イントロン2	TTCATGTGTCTGCATCATGT	86	7
420479	60939	イントロン2	ATTTGGCTATTGTGGGATTC	71	8
420488	63678	イントロン2	GGCATCCAGCGAGCACCAAA	79	9
420493	65938	イントロン2	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	78	10
420522	76225	イントロン2	GGTCTGGATTACAGCATAAA	78	11
420599	95518	イントロン2	TACTGGTGCTTGCCAGGAT	79	12
420634	109349	イントロン2	TCTGCGCACCTGCAGGCCCA	91	13
420644	112219	イントロン2	ACTTCTTACATGGTGGTGGC	76	14
	114155				
420764	143259	イントロン7	GCAACTATGAAACCACAGTT	76	15
414681	143737	イントロン7	GGTATATATTTCCATCCTTA	83	16

30

40

【0462】

実施例2: HepG2細胞におけるヒトGCCRのアンチセンス阻害

GCCR核酸を標的化するためにさらなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、

50

インビトロでのGCCR mRNAにおけるそれらの効果について試験した。国際公開公報第2005/071080号に前に記述されているISIS361137、ISIS361141、ISIS361151、ISIS361156、ISIS377131、ISIS361143、及びISIS361155がこのアッセイに含められた。

120 nMアンチセンスオリゴヌクレオチドとともにリポフェクチン剤を用いて、10,000細胞/ウェルの密度の培養He p G 2細胞に形質移入した。およそ24時間の処理時間後、細胞からRNAを単離し、ヒトプライマープローベセットRTS1408を用いて定量的リアルタイムPCRによってGCCR mRNAレベルを測定した。RIBO GREEN (登録商標)で測定して、総RNA含量により、GCCR mRNAレベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対するGCCRの阻害%として表される。298種類の新規のオリゴヌクレオチドを試験し、さらなる試験のために選択されたオリゴヌクレオチドのみが提示される。

【0463】

表2の新規に設計されたキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは5'-10'-5MOEギャップマーとして設計された。このギャップマーは20ヌクレオチド長であり、中央のギャップセグメントは、10個の2'-デオキシヌクレオチドを備え、5'方向及び3'方向の両方に各5個のヌクレオチドを備えるウイングセグメントが隣接する。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオチド及び3'ウイングセグメント中の各ヌクレオチドは2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体にわたるヌクレオチド間結合はホスホロチオエート(P=S)結合である。各ギャップマー全体にわたるシトシン残基は全て5'-メチルシトシンである。「ヒト標的開始部位」は、ヒト遺伝子配列においてギャップマーが標的化される5'-モストヌクレオチドを示す。このギャップマーは、配列番号1のエクソン配列、イントロン配列、またはイントロン-エクソン連結部に標的化された。

【表2】

表2

配列番号1に対して標的化される5'-10'-5MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒトGCCR mRNAレベルの阻害

ISIS番号	ヒト開始部位	領域	配列	阻害%	配列番号
361137	33116	エクソン 2	CGACCTATTGAGGTTTGCAA	77	17
361141	33673	エクソン 2	GCAGACATTTTATTACCAAT	65	18
361151	33716	エクソン 2	GTACATCTGTCCTCCAGAGG	66	19
361155	33732	エクソン 2	TATTCATGTCATAGTGGTAC	75	20
361156	33736	エクソン 2	GCTGTATTCATGTCATAGTG	73	21
377131	33296	エクソン 2	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	82	4
414641	104247	イントロ ン2	GCGCACCTGCAGGCCCAACA	80	22
414648	109473	イントロ ン2	CCCTCAGGTTTTGATGCTGC	74	23
414681	139287	イントロ ン7	GGTATATATTTCCATCCTTA	87	16

【0464】

実施例3：マイクロウォーク(microwalk)により設計されたオリゴヌクレオチ

ドによる Hep G 2 細胞における GCCR のアンチセンス阻害

表 1 および 2 に提示されるギャップマーに基づき、さらなるギャップマーを設計した。これらのギャップマーを、表 1 および 2 からの元となるギャップマーのアップストリームおよびダウンストリームをわずかに転換した（すなわち、「マイクロウォーク」）ギャップマーを作製することにより設計した。また、たとえば、5 - 10 - 5 MOE、3 - 14 - 3 MOE、及び 2 - 13 - 5 MOE モチーフを有したギャップマーを作製した。これらギャップマーをインビトロで試験した。2, 000 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用し、エレクトロポレーションを用いて、20, 000 細胞/ウェルの密度の培養 Hep G 2 細胞に形質移入した。およそ 24 時間の処理時間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によって GCCR mRNA レベルを測定した。このヒトプライマープロベセット RTS 1408 を使用して GCCR mRNA レベルを測定した。RIBOGREEN（登録商標）で測定して、総 RNA 含量により、GCCR mRNA レベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対する GCCR の阻害 % として表される。この結果が表 3 に提示される。

10

【0465】

また、このギャップマーを、形質移入剤としてリポフェクチンを使用して活性を試験した。50 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドとともにリポフェクチンを使用して 10, 000 細胞/ウェルの密度で培養 Hep G 2 細胞を形質移入した。およそ 24 時間の処理時間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR により GCCR mRNA レベルを測定した。ヒトプライマープロベセット RTS 1408 を使用して、GCCR mRNA レベルを測定した。RIBOGREEN（登録商標）で測定して、総 RNA 含量により、GCCR mRNA レベルを調整した。結果は、未処置対照細胞に対する GCCR の阻害 % として提示される。この結果も表 3 に提示される。

20

【0466】

表 3 のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは 5 - 10 - 5 MOE ギャップマー、3 - 14 - 3 MOE、又は 2 - 13 - 5 MOE ギャップマーとして設計された。表 3 でアスタリスク（*）を有するギャップマーは、元となるギャップマーであり、そこから、ギャップマーである ISIS 426106 - 426405 が、マイクロウォーク（micro walk）を介して設計された。ISIS 377131 は本アッセイに含まれ、新規に設計されたギャップマーの活性が、ISIS 377131 の活性と比較された。この 5 - 10 - 5 ギャップマーは 20 ヌクレオチド長であり、中央のギャップセグメントは 10 個の 2' - デオキシヌクレオチドを備え、それぞれ 5 個のヌクレオチドを備えるウイングセグメントが 5' 方向及び 3' 方向の両方で隣接する。3 - 14 - 3 ギャップマーは、20 ヌクレオチド長であり、中央のギャップセグメントは、14 個の 2' - デオキシヌクレオチドから成り、それぞれ 3 個のヌクレオチドを備えるウイングセグメントが 5' 方向及び 3' 方向の両方で隣接する。2 - 13 - 5 ギャップマーは、20 ヌクレオチド長であり、中央のギャップセグメントは 13 個の 2' - デオキシヌクレオチドから成り、それぞれ 2 及び 5 個のヌクレオチドを備えるウイングセグメントが 5' 方向及び 3' 方向の両方で隣接する。各モチーフ（5 - 10 - 5、3 - 14 - 3、及び 2 - 113 - 5）では、5' ウィングセグメントの各ヌクレオチド及び 3' ウィングセグメントの各ヌクレオチドは 2' - MOE 修飾を有する。各ギャップマー全体にわたるヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート（P = S）結合である。各ギャップマー全体にわたるシトシン残基は全て、5 - メチルシトシンである。「標的開始開始部位」は、ギャップマーが標的化される 5' - モストヌクレオチドを示す。表 3 で列挙される各ギャップマーは、（3818000 - 3980000 に短縮された GENBANK 受託番号 NT_029289.10 に相補的な）配列番号 1 に対して標的化される。さらなる試験のために選択されたこれらのギャップマーのみが提示される。

30

40

【表 3】

表 3

キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒトGCCR mRNAレベルの阻害

ISIS S番号	開始部 位	配列	モチー フ	エレクトロ ポレーション を使用した阻害%	リポフ ェクチ ンを使 用した 阻害%	配列番 号
377131	37217	GTCAAAGGTGCTTTGGTCTG	4-12-4	67	37	4
426128	51878	CCACAGATCTCTAGGGCAGG	5-10-5	73	45	24
426199	51878	CCACAGATCTCTAGGGCAGG	3-14-3	54	28	24
426276	51878	CCACAGATCTCTAGGGCAGG	2-13-5	47	47	24
420450*	51879	TCCACAGATCTCTAGGGCAG	5-10-5	73	21	5
420470*	57825	GGTAGAAATATAGTTGTTC	5-10-5	54	26	6
426331	57827	GTGGTAGAAATATAGTTGTT	5-10-5	33	29	25
426150	59951	GTGTCTGCATCATGTCTCTC	5-10-5	50	20	26
426301	59951	GTGTCTGCATCATGTCTCTC	2-13-5	50	22	26
426302	59952	TGTGTCTGCATCATGTCTCT	2-13-5	17	48	27
426229	59955	TCATGTGTCTGCATCATGTC	3-14-3	23	34	28
420476*	59956	TTCATGTGTCTGCATCATGT	5-10-5	53	59	7
426306	59956	TTCATGTGTCTGCATCATGT	2-13-5	24	46	7
426157	59959	TATTCATGTGTCTGCATCA	5-10-5	45	20	29
426142	60935	GGCTATTGTGGGATTCTCCT	5-10-5	59	52	30
426216	60935	GGCTATTGTGGGATTCTCCT	3-14-3	50	46	30
426143	60936	TGGCTATTGTGGGATTCTCC	5-10-5	60	50	31
426293	60936	TGGCTATTGTGGGATTCTCC	2-13-5	51	7	31
426144	60937	TTGGCTATTGTGGGATTCTC	5-10-5	48	25	32
420479*	60939	ATTTGGCTATTGTGGGATTC	5-10-5	30	26	8
426130	63677	GCATCCAGCGAGCACCAAAG	5-10-5	49	46	33
420488*	63678	GGCATCCAGCGAGCACAAA	5-10-5	55	50	9
426203	63678	GGCATCCAGCGAGCACAAA	3-14-3	31	38	9
426131	63679	GGGCATCCAGCGAGCACCAA	5-10-5	52	32	34
426281	63679	GGGCATCCAGCGAGCACCAA	2-13-5	38	53	34
420493*	65938	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	5-10-5	53	49	10
426183	65938	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	3-14-3	68	70	10
426261	65938	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	2-13-5	72	65	10
426262	65939	CAGCCATGGTGATCAGGAGG	2-13-5	34	61	35
426115	65940	GCAGCCATGGTGATCAGGAG	5-10-5	56	71	36

10

20

30

【表 3 - 1】

426185	65940	GCAGCCATGGTGATCAGGAG	3-14-3	41	51	36
426263	65940	GCAGCCATGGTGATCAGGAG	2-13-5	46	57	36
426116	65941	TGCAGCCATGGTGATCAGGA	5-10-5	45	61	37
426264	65941	TGCAGCCATGGTGATCAGGA	2-13-5	42	58	37
426117	65942	CTGCAGCCATGGTGATCAGG	5-10-5	58	70	38
426187	65942	CTGCAGCCATGGTGATCAGG	3-14-3	42	69	38
426168	76224	GTCTGGATTACAGCATAAAC	5-10-5	43	31	39
420522*	76225	GGTCTGGATTACAGCATAAA	5-10-5	44	33	11
426246	76225	GGTCTGGATTACAGCATAAA	3-14-3	60	39	11
426323	76227	TTGGTCTGGATTACAGCATA	2-13-5	32	50	40
426171	76228	CTTGGTCTGGATTACAGCAT	5-10-5	53	47	41
426324	76228	CTTGGTCTGGATTACAGCAT	2-13-5	51	33	41
426172	76229	CCTGGTCTGGATTACAGCA	5-10-5	53	56	42
426325	76229	CCTGGTCTGGATTACAGCA	2-13-5	43	57	42
426119	95513	GTGCTTGCCAGGATGATGC	5-10-5	44	45	43
426189	95513	GTGCTTGCCAGGATGATGC	3-14-3	44	59	43
426267	95513	GTGCTTGCCAGGATGATGC	2-13-5	41	45	43
420599*	95518	TACTGGTGCTTGCCAGGAT	5-10-5	63	51	12
426124	95519	CTACTGGTGCTTGCCAGGA	5-10-5	41	54	44
414641*	109346	GCGCACCTGCAGGCCCAACA	5-10-5	43	76	22
426177	109346	GCGCACCTGCAGGCCCAACA	3-14-3	29	68	22
426255	109346	GCGCACCTGCAGGCCCAACA	2-13-5	13	68	22
426110	109347	TGCGCACCTGCAGGCCCAAC	5-10-5	45	69	45
420634*	109349	TCTGCGCACCTGCAGGCCCA	5-10-5	37	62	13
426343	112218	CTTCTTACATGGTGGTGCA	5-10-5	42	21	46
	114154					
420644*	112219	ACTTCTTACATGGTGGTGGC	5-10-5	44	40	14
	114155					
426401	112219	ACTTCTTACATGGTGGTGGC	2-13-5	31	50	14
	114155					

10

20

30

【表 3 - 2】

426344	112220	TACTTCTTACATGGTGGTGG	5-10-5	32	44	47
	114156					
426402	112220	TACTTCTTACATGGTGGTGG	2-13-5	33	40	47
	114156					
426345	112221	GTACTTCTTACATGGTGGTG	5-10-5	49	55	48
	114157					
426403	112221	GTACTTCTTACATGGTGGTG	2-13-5	31	37	48
	114157					
426346	112222	GGTACTTCTTACATGGTGGT	5-10-5	38	37	49
	114158					
426404	112222	GGTACTTCTTACATGGTGGT	2-13-5	40	34	49
	114158					
426347	112223	AGGTACTTCTTACATGGTGG	5-10-5	42	41	50
	114159					
426405	112223	AGGTACTTCTTACATGGTGG	2-13-5	30	31	50
	114159					
426334	114587	CAGGTTTTGATGCTGCTGCT	5-10-5	15	37	51
426390	114587	CAGGTTTTGATGCTGCTGCT	2-13-5	15	42	51
426336	114589	CTCAGGTTTTGATGCTGCTG	5-10-5	15	36	52
426337	114590	CCTCAGGTTTTGATGCTGCT	5-10-5	20	44	53
414648*	114591	CCCTCAGGTTTTGATGCTGC	5-10-5	23	37	23
420764*	143259	GCAACTATGAAACCACAGTT	5-10-5	41	14	15
426136	143260	GGCAACTATGAAACCACAGT	5-10-5	56	33	54
426137	143261	TGGCAACTATGAAACCACAG	5-10-5	47	28	55
414681*	143737	GGTATATATTCCATCCTTA	5-10-5	36	57	16
426161	143738	AGGTATATATTCCATCCTT	5-10-5	13	55	56

10

20

【0467】

30

実施例 4 : Hep G 2 細胞でのヒト G C C R の用量依存的アンチセンス阻害

ヒト G C C R のインビトロでの有意な阻害を示す実施例 3 のギャップマーを、Hep G 2 細胞において多様な条件下で試験した。細胞を、20,000 細胞/ウェルの密度でプレーティングし、表 4 で特定されるように、0.8 μM、1.5 μM、3.0 μM、又は 6.0 μM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドで、エレクトロポレーションを使用して形質移入した。およそ 16 時間の処理時間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によって G C C R mRNA レベルを測定した。ヒト G C C R プライマープロープセット RTS 1408 を使用して mRNA レベルを測定した。RIBOGREEN (登録商標) で測定して、総 RNA 含量により、G C C R mRNA レベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対する G C C R の阻害 % として表される。

40

【0468】

また、このギャップマーを、形質移入剤であるリポフェクチンを使用して、Hep G 2 細胞中で、様々な用量で試験した。細胞を 10,000 細胞/ウェルの密度でプレーティングし、表 5 で特定されるように、17.5 nM、35 nM、70 nM 又は 140 nM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドで、リポフェクチン剤を用いて形質移入した。およそ 16 時間の処理時間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によって G C C R mRNA レベルを測定した。mRNA レベルを測定するために、ヒト G C C R プライマープロープセット RTS 1408 を使用した。RIBOGREEN (登録商標) で測定して、総 RNA 含量により、G C C R mRNA レベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対する G C C R の阻害 % として表される。

50

【0469】

各オリゴヌクレオチドの最大半量阻害濃度 (IC_{50}) も表4及び5で提示され、これは各濃度で達成されるGCCR mRNA発現の阻害%に対して、使用されるオリゴヌクレオチドの濃度をプロットすることによって計算したが、なお、これは対照と比較してGCCR mRNA発現の50%阻害が達成されたオリゴヌクレオチド濃度である。表4及び5で例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された細胞において、GCCR mRNAレベルが用量依存的に顕著に低下した。ある一定の例示的な化合物は、基準であるISIS 377131よりもより効力があることを示した。

【表4】

表4

エレクトロポレーション法を使用したHe p G 2細胞でのヒトGCCR発現の用量依存的アンチセンス阻害

ISIS番号	0.8 μ M	1.5 μ M	3.0 μ M	6.0 μ M	IC_{50} (μ M)
377131	28	43	66	83	2.0
414641	30	50	77	93	1.4
414648	8	32	50	61	3.4
414681	28	43	61	84	1.8
420450	36	57	68	90	1.3
420470	34	58	70	89	1.3
420476	36	51	81	93	1.3
420488	12	28	54	58	3.5
420493	32	42	66	82	1.7
420522	32	52	73	90	1.4
420599	28	52	73	80	1.5
420644	30	48	58	72	1.9
426110	20	40	57	78	2.2
426115	35	51	76	82	1.3
426116	32	48	74	80	1.5
426117	20	41	72	88	1.8
426119	33	52	72	80	1.4
426124	18	30	64	78	2.3
426128	40	51	82	91	1.2
426130	5	32	47	74	3.0
426131	26	23	41	60	4.3
426136	19	42	71	81	1.9
426137	5	25	48	73	3.1
426142	28	36	69	85	1.8
426143	14	38	59	80	2.3
426144	8	29	50	69	3.1
426150	26	42	69	81	1.8
426157	23	48	71	88	1.7
426161	17	34	52	68	2.8
426168	36	56	75	94	1.2
426171	34	49	78	90	1.4
426172	46	63	83	92	0.8
426177	19	35	55	83	2.3
426183	36	71	77	93	1.0
426185	36	43	65	78	1.6

10

20

30

40

【表 4 - 1】

426187	22	42	57	81	2.1
426189	31	45	68	84	1.6
426199	13	37	40	76	2.9
426203	0	6	16	33	1.8
426216	3	28	32	60	4.5
426229	5	23	55	83	2.6
426246	38	59	86	94	1.1
426255	19	29	62	77	2.4
426261	62	76	92	97	<0.8
426262	23	26	57	71	2.7
426263	25	40	70	90	1.7
426264	18	46	67	88	1.8
426267	45	54	78	90	1.0
426276	0	14	33	68	4.1
426281	0	8	15	44	1.0
426293	5	11	48	55	4.5
426301	26	47	76	92	1.6
426302	18	36	64	75	2.3
426306	12	17	60	85	2.5
426323	16	28	58	76	2.5
426324	27	54	81	94	1.4
426325	75	61	86	97	<0.8
426331	13	33	45	72	3.0
426334	1	16	41	63	4.1
426336	5	31	38	63	3.9
426337	16	29	35	64	4.1
426343	19	34	45	74	2.8
426344	11	26	42	70	3.4
426345	23	42	74	83	1.8
426346	23	41	60	82	2.0
426347	29	43	65	83	1.8
426390	13	19	30	60	5.2
426401	21	39	60	76	2.2
426402	14	16	37	67	4.0
426403	24	33	52	77	2.4
426404	27	39	54	86	2.0
426405	19	31	51	73	2.7

10

20

30

【表 5】

表 5

リポフェクチン剤を用いたHe p G 2細胞でのヒトGCCR発現の用量依存的アンチセンス阻害

ISI S番号	17.5 nM	35.0 nM	70.0 nM	140.0 nM	IC ₅₀ (nM)
377131	27	55	78	87	33.0
414641	54	74	89	96	<17.5
414648	28	41	66	83	42.0
414681	30	48	68	85	37.0
420450	27	47	74	77	39.1
420470	22	45	59	75	49.4
420476	38	58	74	88	27.3
420488	28	48	72	71	40.3
420493	41	62	75	85	23.2
420522	32	57	72	78	31.8
420599	37	55	73	82	28.9
420644	32	53	75	84	32.0
426110	55	69	89	95	<17.5
426115	45	62	76	69	17.8
426116	47	67	81	92	18.1
426117	49	68	83	92	16.7
426119	36	53	68	70	33.4
426124	22	53	73	89	37.0
426128	34	48	73	83	33.7
426130	32	55	81	93	29.7
426131	41	52	71	79	28.4
426136	12	41	63	80	50.8
426137	14	41	62	87	47.8
426142	32	51	74	81	33.6
426143	34	54	76	82	30.7
426144	21	48	71	86	40.2
426150	27	49	66	76	40.8
426157	31	55	68	79	34.6
426161	23	43	70	86	41.6
426168	37	56	75	86	27.9
426171	42	56	73	83	25.3
426172	52	67	83	90	<17.5
426177	42	72	88	97	19.1
426183	54	70	86	92	<17.5
426185	36	61	82	87	25.9

10

20

30

40

【表 5 - 1】

426187	50	64	83	95	17.9
426189	40	62	79	86	23.5
426199	33	58	74	84	30.4
426203	29	46	74	90	36.0
426216	26	51	67	80	39.6
426229	23	44	70	90	40.2
426246	41	54	74	84	26.6
426255	43	69	88	96	19.8
426261	43	67	86	96	20.3
426262	44	65	82	90	19.7
426263	45	65	80	87	19.0
426264	36	57	83	95	27.0
426267	22	51	73	85	38.2
426276	28	56	77	92	32.4
426281	25	48	72	89	37.4
426293	30	46	72	79	37.5
426301	29	60	70	85	32.2
426302	22	48	72	89	39.2
426306	37	45	76	91	31.8
426323	19	44	71	88	41.9
426324	34	57	76	84	29.1
426325	2	48	70	89	46.9
426331	29	54	67	78	36.8
426334	20	39	65	81	47.3
426336	30	47	67	84	37.9
426337	31	55	71	89	32.7
426343	33	52	70	76	34.3
426344	38	53	72	85	29.5
426345	43	59	78	83	22.7
426346	34	56	62	35	>140.0
426347	36	53	71	79	31.3
426390	24	38	62	84	46.6
426401	35	49	69	82	34.0
426402	39	52	71	83	29.7
426403	29	54	72	86	33.9
426404	36	56	70	78	30.1
426405	33	53	73	86	32.1

10

20

30

【 0 4 7 0 】

40

実施例 5 : H e p G 2 細胞におけるヒト G C C R の用量依存的アンチセンス阻害

実施例 4 から選択したギャップマーを、H e p G 2 細胞において様々な用量で試験した。細胞を 20,000 細胞/ウェルの密度でプレーティングし、表 6 で特定されるように、0.5 μM、1.0 μM、2.0 μM、4.0 μM 又は 8.0 μM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用してエレクトロポレーションを用いて形質移入した。およそ 16 時間の処理時間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によって G C C R m R N A レベルを測定した。m R N A レベルを測定するために、ヒト G C C R プライマープロベセット R T S 1 4 0 8 を使用した。R I B O G R E E N (登録商標) で測定して、総 RNA 含量により、G C C R m R N A レベルを調整した。結果は、未処理対照細胞に対する G C C R の阻害 % として表される。

50

【 0 4 7 1 】

表 6 で例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞において G C C R mRNA レベルが用量依存的に低下した。ある例示的な化合物は、基準となる I S I S 3 7 7 1 3 1 よりも効力があることを示した。

【表 6】

表 6

エレクトロポレーションを用いた、H e p G 2 細胞におけるヒト G C C R の用量依存的なアンチセンス阻害

I S I S 番号	0.5 μ M	1.0 μ M	2.0 μ M	4.0 μ M	8.0 μ M	IC ₅₀ (μ M)
377131	19	42	65	83	90	1.4
414641	23	48	67	88	95	1.2
420450	29	49	65	81	94	1.1
420470	15	25	47	72	91	2.0
420476	14	36	67	86	94	1.5
420644	22	33	51	69	87	1.8
426110	13	33	52	77	93	1.8
426115	32	53	70	84	90	0.9
426116	27	44	71	87	90	1.1
426119	30	41	66	78	84	1.2
426128	37	54	77	82	94	0.8
426130	21	38	55	80	92	1.5
426131	1	33	39	74	86	2.2
426142	33	45	72	89	93	1.0
426143	29	44	69	85	93	1.1
426168	15	47	59	77	91	1.5
426171	15	23	45	72	88	2.1
426172	31	48	68	81	91	1.1
426183	23	51	79	91	97	1.0
426246	0	5	0	5	0	>8.0
426261	36	60	81	88	95	0.7
426262	15	26	55	76	92	1.8
426267	18	44	57	80	90	1.5
426325	25	46	74	89	97	1.1
426344	11	3	37	60	78	3.1
426345	7	20	43	65	82	2.5
426347	16	26	41	72	85	2.1
426402	3	9	35	54	80	3.2
426404	15	26	40	70	89	2.1

10

20

30

40

【 0 4 7 2 】

実施例 6 : C D 1 マウスにおけるヒト G C C R を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

C D 1 (登録商標) マウス (Charles River, MA) は、多目的マウスモデルであり、安全性及び効力試験のために利用されることが多い。このマウスを、実施例 5 に記載されている試験から選択された I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、様々なマーカーレベルにおける変化について評価した。

【 0 4 7 3 】

処置

8 週齢雄の C D 1 マウスを、1 2 時間の明 / 暗サイクルで維持し、P u r i n a のマウ

50

ス固形試料5001を自由に与えるようにした。実験を開始する前に、動物は、少なくとも7日間研究施設に気候順化させた。50mg/kgのISIS377131、ISIS420470、ISIS420476、ISIS426115、ISIS426130、ISIS426168、ISIS426172、ISIS426183、ISIS426246、ISIS426261、ISIS426262、ISIS426267、又はISIS426325を、各4匹のCD1マウスのグループに、4週間にわたり、1週間に2回皮下注射した。投与する前並びに投与後2、3、及び4週間後に、尾を切ることでより血液試料を収集した。各時点で最後に投与してから3日後、マウスを安楽死させ、器官及び血漿をさらなる分析のために回収した。ISIS426267で処置したマウスは、研究が終了する前に死亡した。したがって、ISIS426267で処置したマウスからの試料は、いずれのアッセイにも含まれなかった。

10

【0474】

血漿化学

肝臓機能および腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼ、コレステロール、グルコース、およびトリグリセリドの血漿レベルを、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)を用いて測定した。ALT(アラニントランスアミナーゼ)及びAST(アスパラギン酸トランスアミナーゼ)の血漿レベルを測定し、この結果をIU/Lで表し、表7および8に提示する。また、コレステロール、グルコース、およびトリグリセリドの血漿レベルを同一の臨床化学分析装置を用いて測定し、この結果を、表9.10、及び11に提示する。

20

【表7】

表7

4週間でのCD1マウスのALTレベル(IU/L)

	週0	週2	週3	週4
PBS	25	23	31	25
ISIS 377131	24	41	32	50
ISIS 420470	31	53	62	97
ISIS 420476	24	46	56	83
ISIS 426115	23	29	39	47
ISIS 426130	21	29	41	37
ISIS 426168	22	31	64	65
ISIS 426172	24	32	35	39
ISIS 426183	22	29	43	50
ISIS 426261	23	39	77	93
ISIS 426262	28	34	43	81
ISIS 426246	25	291	535	1061
ISIS 426325	26	32	52	145

30

【表 8】

表 8

4 週間での CD1 マウスの AST レベル (IU/L)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	46	40	45	38
ISIS 377131	42	43	38	62
ISIS 420470	38	64	62	152
ISIS 420476	41	47	77	112
ISIS 426115	42	34	43	66
ISIS 426130	41	33	42	43
ISIS 426168	50	37	63	81
ISIS 426172	45	41	44	48
ISIS 426183	55	35	46	62
ISIS 426261	52	47	64	75
ISIS 426262	45	43	47	88
ISIS 426246	43	236	245	525
ISIS 426325	45	48	53	88

10

【表 9】

表 9

4 週間での CD1 マウスの コレステロール レベル (mg/dL)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	152	166	176	161
ISIS 377131	141	162	149	175
ISIS 420470	159	181	193	201
ISIS 420476	132	161	165	179
ISIS 426115	115	131	143	140
ISIS 426130	120	148	160	157
ISIS 426168	123	138	161	159
ISIS 426172	134	163	161	161
ISIS 426183	135	166	154	164
ISIS 426261	128	146	158	172
ISIS 426262	149	208	197	248
ISIS 426246	156	283	225	183
ISIS 426325	128	140	117	81

20

30

【表 1 0】

表 1 0

4週間でのCD1マウスのグルコースレベル (mg/dL)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	205	196	223	185
ISIS 377131	188	211	203	175
ISIS 420470	200	194	206	186
ISIS 420476	192	222	216	175
ISIS 426115	184	180	185	167
ISIS 426130	166	225	205	218
ISIS 426168	170	209	190	181
ISIS 426172	200	220	232	190
ISIS 426183	176	229	217	203
ISIS 426261	174	212	219	192
ISIS 426262	203	232	200	197
ISIS 426246	209	220	202	142
ISIS 426325	172	204	204	154

10

【表 1 1】

表 1 1

4週間でのCD1マウスのトリグリセリドレベル (mg/dL)

	週 2	週 3	週 4
PBS	165	212	143
ISIS 377131	187	137	158
ISIS 420470	170	138	104
ISIS 420476	172	130	109
ISIS 426115	176	142	127
ISIS 426130	125	133	173
ISIS 426168	167	123	124
ISIS 426172	175	166	177
ISIS 426183	162	92	108
ISIS 426261	139	70	91
ISIS 426262	126	88	98
ISIS 426246	67	58	63
ISIS 426325	136	132	102

20

30

【0475】

実施例7：Sprague-DawleyラットにおけるヒトGCCRを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

Sprague-Dawleyラットを、実施例6に記載される試験からのISISアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、様々なマーカーレベルでの変化を評価した。

40

【0476】

処置

8週齢雄のラットを12時間の明/暗サイクルで維持し、Purinaの通常のラット用固形試料を自由に与えるようにした。実験を開始する前に、動物は、少なくとも7日間研究施設に気候順化させた。50mg/kgのISIS377131、ISIS420470、ISIS420476、ISIS426115、ISIS426130、ISIS426168、ISIS426172、ISIS426183、ISIS426246、ISIS426261、ISIS426262、ISIS426267、又はISIS426325を、1週間に2回、各4匹のSprague-Dawleyラットのグルー

50

ブに皮下注射した。投与する前並びに投与後 2、3、及び 4 週間後に、尾を切ることに
より血液試料を収集した。各時点で最後に投与してから 3 日後、ラットを安楽死させ、器官
及び血漿をさらなる分析のために回収した。

【0477】

血漿化学

肝臓機能及び腎臓機能における ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、
トランスアミナーゼ、コレステロール、グルコース、及びトリグリセリドの血漿レベルを
自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) を用いて測定した。ALT (アラニントランスアミナーゼ) 及び AST (ア
スパラギン酸トランスアミナーゼ) の血漿レベルを測定し、この結果を IU/L で表し、
表 12 および 13 に提示する。また、コレステロール、グルコース、およびトリグリセリ
ドの血漿レベルを同一の臨床化学分析装置を用いて測定し、この結果を、mg/dL で表
し、表 14 ~ 16 に提示する。「n/a」は、特定の時点で測定されなかった血漿化学マ
ーカーを示す。

10

【表 12】

表 12

Sprague-Dawley ラットの ALT レベル (IU/L)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	47	49	52	71
ISIS 377131	46	59	51	103
ISIS 420470	55	59	64	105
ISIS 420476	47	59	41	63
ISIS 426115	53	79	151	198
ISIS 426130	50	56	50	74
ISIS 426168	44	54	53	106
ISIS 426172	46	60	46	123
ISIS 426183	54	61	140	288
ISIS 426261	46	63	116	132
ISIS 426262	41	66	56	78
ISIS 426246	58	56	74	362
ISIS 426267	50	487	242	227
ISIS 426325	51	63	71	108

20

30

【表 1 3】

表 1 3

Sprague-DawleyラットのASTレベル (IU/L)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	73	87	83	85
ISIS 377131	71	76	72	127
ISIS 420470	95	83	109	141
ISIS 420476	72	80	78	104
ISIS 426115	82	92	226	192
ISIS 426130	74	75	75	86
ISIS 426168	72	78	112	155
ISIS 426172	76	77	87	188
ISIS 426183	75	90	207	361
ISIS 426261	72	87	144	140
ISIS 426262	72	94	97	119
ISIS 426246	92	82	108	269
ISIS 426267	86	400	264	206
ISIS 426325	83	75	90	126

10

20

【表 1 4】

表 1 4

Sprague-Dawleyラットのコレステロールレベル (mg/dL)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	93	72	71	65
ISIS 377131	111	41	36	40
ISIS 420470	103	37	42	42
ISIS 420476	85	59	59	59
ISIS 426115	116	81	95	110
ISIS 426130	89	59	49	54
ISIS 426168	68	43	46	72
ISIS 426172	81	49	53	118
ISIS 426183	87	89	111	245
ISIS 426261	84	67	54	70
ISIS 426262	80	60	49	60
ISIS 426246	78	59	62	91
ISIS 426267	89	58	70	72
ISIS 426325	83	44	49	71

30

40

【表 15】

表 15

Sprague-Dawley ラットのグルコースレベル (mg/dL)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	184	172	159	157
ISIS 377131	191	175	146	138
ISIS 420470	191	134	162	161
ISIS 420476	185	151	159	188
ISIS 426115	191	151	124	142
ISIS 426130	191	161	161	154
ISIS 426168	189	158	142	233
ISIS 426172	189	150	143	288
ISIS 426183	183	154	146	268
ISIS 426261	176	150	134	142
ISIS 426262	163	169	143	141
ISIS 426246	200	152	148	156
ISIS 426267	193	121	137	142
ISIS 426325	174	146	154	147

10

20

【表 16】

表 16

Sprague-Dawley ラットのトリグリセリドレベル (mg/dL)

	週 0	週 2	週 3	週 4
PBS	73	66	124	96
ISIS 377131	81	32	33	32
ISIS 420470	71	42	35	31
ISIS 420476	79	41	59	43
ISIS 426115	48	43	35	26
ISIS 426130	84	37	52	40
ISIS 426168	62	44	56	37
ISIS 426172	65	46	51	n/a
ISIS 426183	74	26	44	n/a
ISIS 426261	71	55	37	40
ISIS 426262	91	36	34	27
ISIS 426246	136	56	43	36
ISIS 426267	120	42	34	29
ISIS 426325	75	82	86	67

30

40

【0478】

実施例 8 : CD / 1GS ラットにおけるヒト GCCR を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの長期間の忍容性

CD / 1GS ラットを、実施例 6 及び 7 に記載した試験から選択した ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで 12 週間処置し、多様なマーカーレベルにおける変化を評価した。

【0479】

8 週齢雄のラットを、代謝ケージ内に配置し、12 時間の明 / 暗サイクルに維持し、Purina のラット固形試料を自由に与えるようにした。実験を開始する前に、動物は、少なくとも 7 日間研究施設に気候順化させた。30 mg / kg の ISIS 377131、

50

ISIS 420470、ISIS 420476、ISIS 426115、ISIS 426130、ISIS 426168、ISIS 426172、ISIS 426183、ISIS 426246、ISIS 426261、ISIS 426262、ISIS 426267、又はISIS 426325を12週間にわたって1週間に2回、各4匹のラットのグループに皮下注射した。投与する前並びに投与後2、4、6、8、10及び12週間後に、尾を切るにより血液試料を収集した。各時点で最後に投与してから3日後、ラットを安楽死させ、器官及び血漿をさらなる分析のために回収した。ISIS 426267で処置したラットは、試験が終了する前に死亡した。従って、ISIS 426267は、さらなる試験のいずれにも含まれなかった。

【0480】

肝臓機能

肝臓機能に関するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するため、トランスアミナーゼ、コレステロール、グルコース、及びトリグリセリドの血漿レベルを、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)を用いて測定した。第12週でALT及びASTの血漿レベルを測定し、表17に提示する。この値をPBS対照の値に対する倍数単位での上昇として提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れる血漿化学マーカーレベルにおいて何等か変化を引き起こしたアンチセンスオリゴヌクレオチドはなかった。

【表17】

表17

PBS対照と比較したSprague-Dawleyラットの血漿化学マーカーの倍数単位での上昇

	ALT	AST
ISIS 377131	1.0	1.5
ISIS 420470	0.7	0.6
ISIS 420476	1.7	2.6
ISIS 426115	4.2	2.5
ISIS 426130	1.1	1.4
ISIS 426168	1.6	1.7
ISIS 426172	1.8	2.1
ISIS 426183	1.3	0.8
ISIS 426261	1.2	0.9
ISIS 426262	2.0	1.4
ISIS 426246	1.1	0.8
ISIS 426325	3.8	3.4

【0481】

腎臓機能

腎臓機能に関するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、尿タンパク質及びクレアチニンの尿素の合計の濃度を、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)を用いて測定した。この結果を、12週目に採取した比率で、ならびに比率の倍数単位での増加として、表18に提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れる腎代謝マーカーのいずれの変化も引き起こさなかったアンチセンスオリゴヌクレオチドが、さらなる試験のために選択された。

【表 18】

表 18

Sprague-Dawley ラットの腎代謝マーカーに関するオリゴヌクレオチド処置の効果

	倍数単位での増加
PBS	1
ISIS 377131	7
ISIS 420470	63
ISIS 420476	6
ISIS 426115	12
ISIS 426130	5
ISIS 426168	16
ISIS 426172	7
ISIS 426183	61
ISIS 426261	60
ISIS 426262	54
ISIS 426246	68
ISIS 426325	11

10

【0482】

20

マウスおよびラットの両方の結果は、ISIS 426115 が、GCCR を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドに最も忍容性があることを示した。

【0483】

実施例 9：カニクイザルにおけるヒト GCCR を標的とする ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

カニクイザルを、実施例 6、7、及び 8 に記載される試験からの ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性および忍容性を評価した。

【0484】

30

選択されたヒトオリゴヌクレオチドは、アカゲザルの遺伝子配列と十分に交差反応性を示す。ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザル配列との間の相補性が大きいほど、ヒトオリゴヌクレオチドがアカゲザル配列と交差反応し得る可能性が大きくなる。ヒトオリゴヌクレオチドを、ヒトのエクソンに対する類似性に基づき、アカゲザル配列（ヌクレオチド 1334000 から 1491000 から短縮された GENBANK 受託番号 NW_001120987.1 に相補的な配列番号 2）と比較し、この結果を表 19 に表す。「アカゲザル開始部位」は、このギャップマーがアカゲザルの遺伝子配列に標的化する 5' - モストヌクレオチドを示す。

【表 19】

表 19

配列番号 2 に対するヒトGCCRを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの相補性

ISIS番号	モチーフ	アカゲザル開始部位	配列	配列番号
420470	5-10-5	53479	GGTAGAAATATAGTTGTTC	6
420476	5-10-5	55628	TTCATGTGTCTGCATCATGT	7
426130	5-10-5	59602	GCATCCAGCGAGCACCAAAG	33
426183	3-14-3	61848	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	10
426261	2-13-5	61848	AGCCATGGTGATCAGGAGGC	10
426262	2-13-5	61849	CAGCCATGGTGATCAGGAGG	35
426115	5-10-5	61850	GCAGCCATGGTGATCAGGAG	36
426168	5-10-5	72083	GTCTGGATTACAGCATAAAC	39
426246	3-14-3	72084	GGTCTGGATTACAGCATAAA	11
426172	5-10-5	72088	CCTTGGTCTGGATTACAGCA	42
426325	2-13-5	72088	CCTTGGTCTGGATTACAGCA	42
426267	2-13-5	91877	GTGCTGTCCAGGATGATGC	43

10

【0485】

20

処置

この試験は、中華人民共和国のWuXi PharmaTechの試験施設で行った。2～5週齢雄のカニクイザルを、本試験に使用する前に、結核について2回にわたり試験し、投与の開始前に、少なくとも14日間検疫した。8mg/kg又は20mg/kgのISIS420470、ISIS420476、ISIS426115、ISIS426130、ISIS426168、ISIS426172、ISIS426183、ISIS426246、ISIS426261、ISIS426262、ISIS426267、又はISIS426325を、第1週目に1週間に3回、次の11週間に1週間に1回、ランダムに割り当てられた5匹のカニクイザルの24のグループに皮下注射した。16匹のカニクイザルの対照グループに、第1週目に1週間に3回、次の11週間に1週間に1回、PBSを皮下注射した。

30

【0486】

試験期間の間、疾病又は苦痛の兆候についてサルを毎日観察した。この処置に対する副作用を示すいずれの動物も除去し、獣医師および試験責任者に問い合わせた。

【0487】

臨床的な観察及び死亡数のチェックを、投与前、および投与レジメンの間、少なくとも1日に1回実行した。体重を1週間に1度測定した。処置の5日前および試験期間の異なる日に血液試料を収集し、分析した。この動物を、血液収集前、少なくとも13時間（一晚）飢餓状態にした。拘束した意識のある動物の末梢静脈から静脈穿刺により血液を収集した。全てのグループの屠殺を、最後の投与から48時間目である86日目に行った。

40

【0488】

阻害研究

RNA分析

この試験の終わりに、プライマープローブセットmkGCCR__1（配列番号61として本明細書に記載されるフォワード配列TTAGGAGGGCGGCAAGTG、配列番号62として本明細書に記載されるリバーズ配列AGGTGTAAGTTCCTGAAA CCTGGTA、配列番号63として本明細書に記載されるプローブ配列TGCAAGCA GTGAAATGGGCAAGGC）を使用してGCCRのリアルタイムPCR分析にて、RNAを肝組織から抽出した。また、このデータを、プライマープローブセットmkGCCR__5（配列番号64として本明細書に記載されるフォワード配列GGAGATC

50

A T A T A G A C A A T C A A G T G C A A、配列番号 65 として本明細書に記載されるリバーズ配列 G G G T A G A G T C A T T C T C T G C T C A T T A A、配列番号 66 として本明細書に記載されるプローブ配列 C T G T G T T T T G C T C C T G A T C T G A T) を使用して分析した。この結果は、ハウスキーピング遺伝子シクロフィリンに対して正規化された P B S 対照と比較した G C C R の阻害%として提示される。表 20 に示されるように、I S I S 4 2 6 3 2 5、I S I S 4 2 0 4 7 6、及び I S I S 4 2 6 1 1 5 での処置は、G C C R mRNA のレベルを有意に低下させた。

【表 20】

表 20

P B S 対照に対するカニクイザルの肝臓における G C C R mRNA の阻害

10

I S I S 番号	・・8 mg/kg 用量		20 mg/kg 用量	
	プライマープローブセット mkGCCR_1	プライマープローブセット mkGCCR_5	プライマープローブセット mkGCCR_1	プライマープローブセット mkGCCR_5
420470	34	0	51	57
420476	53	67	76	87
426115	52	66	6	49
426130	27	38	34	48
426168	31	53	42	54
426172	28	37	41	51
426183	43	55	49	59
426246	31	61	50	68
426261	41	55	36	73
426262	41	8	49	59
426267	45	64	43	64
426325	68	72	73	79

20

【0489】

30

タンパク質分析

11週目に、約 1 mL の血液をすべての利用可能な動物から収集し、E D T A のカリウム塩を含む試験管に配置した。この試験管を(室温、10分間、3000rpmで)遠心し、血漿を得た。G C C R タンパク質レベルを、S a n t a C r u z s c - 1 0 0 3 ラビットポリクローナル抗体を使用したウエスタン分析により血漿において測定した。この結果を表 21 に提示し、P B S 対照レベルと比較した阻害パーセンテージとして表す。この結果は、I S I S 4 2 6 3 2 5、I S I S 4 2 0 4 7 6、及び I S I S 4 2 6 1 1 5 が G C C R タンパク質レベルを低下させたことを示している。

【表 2 1】

表 2 1

対照レベルと比較したカニクイザルの血漿におけるGCCRタンパク質レベルの低下

	用量 (mg/kg)	低下%
ISIS 426325	8	70
	20	61
ISIS 420476	8	63
	20	62
ISIS 426115	8	57
	20	52
ISIS 426261	8	21
	20	28
ISIS 426183	8	0
	20	0

10

【0490】

忍容性試験

体重及び器官重量の測定

20

動物の総体的な健康におけるISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、第12週に体重及び器官重量を測定した。このデータを表22に提示する。ISIS420476での処置により、脾臓の重量が増加した。残りのISISオリゴヌクレオチドでの処置は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れる顕著な変化を引き起こさなかった。

【表 2 2】

表 2 2

1 2 週でのカニクイザルにおける最終的な体重および臓器重量

	用量 (mg/kg)	体重	腎臓	脾臓	肝臓
PBS	-	2744	5	3	52
ISIS 426325	8	3000	6	6	63
	20	2882	7	6	72
ISIS 426172	8	2786	6	4	63
	20	2750	6	5	63
ISIS 426183	8	3026	6	4	58
	20	2822	6	5	58
ISIS 426168	8	2724	6	4	60
	20	2868	7	5	72
ISIS 420476	8	2980	7	4	71
	20	2798	7	9	77
ISIS 426267	8	2788	7	6	73
	20	2826	6	5	78
ISIS 426261	8	2590	6	4	57
	20	2596	5	6	59
ISIS 426246	8	2612	6	4	57
	20	2470	6	6	67
ISIS 426115	8	2572	5	5	56
	20	2642	6	7	62
ISIS 426262	8	2952	6	6	60
	20	2980	6	6	67
ISIS 420470	8	2588	8	9	70
	20	2782	7	6	80
ISIS 426130	8	2958	6	3	62
	20	2870	6	4	61

10

20

30

40

【0 4 9 1】

肝臓機能

肝臓の機能に関するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血液試料を、第11週の全ての試験グループから収集した。約3mLの血液を、飢餓状態の動物から収集し、血清を分離のため試験管内に配置した。30～80分室温で試験管を安定化させた後、遠心(2000g×15分、室温)することにより血清を得た。トランスアミナーゼのレベルを、Hitachi-917/911化学分析器により測定した。ALT及びASTの血漿レベルを測定し、この結果を表23に提示し、IU/Lで表す。アルカリホスファターゼ(ALP)は、損傷した肝細胞により合成される量が増加し、また、肝疾患のマーカーでもあり、同様に測定された。また、そのデータを表23に提示し、mg/dLで表す。アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れる肝臓機能の何らかのマーカーレベルの変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドはなかった。

【表 2 3】

表 2 3

カニクイザルの血漿における肝臓機能マーカーのレベル

	用量 (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	ビリル ビン (mg/dL)
PBS	-	52	71	1310	4
ISIS 426325	8	51	62	1408	4
	20	38	46	1464	5
ISIS 426172	8	55	61	1643	4
	20	56	55	1442	4
ISIS 426183	8	47	57	1633	3
	20	65	61	1603	6
ISIS 426168	8	37	41	1907	2
	20	55	46	1990	2
ISIS 420476	8	65	41	2088	2
	20	53	46	1698	2
ISIS 426267	8	42	40	1738	2
	20	68	47	1982	1
ISIS 426261	8	59	93	1193	4
	20	41	47	1158	4
ISIS 426246	8	57	64	1108	3
	20	35	60	1376	3
ISIS 426115	8	42	61	1369	3
	20	87	68	1418	3
ISIS 426262	8	41	45	1973	3
	20	49	48	1637	3
ISIS 420470	8	51	57	2137	2
	20	65	59	2568	2
ISIS 426130	8	33	42	1884	2
	20	44	54	2279	3

10

20

30

【 0 4 9 2 】

腎臓機能

腎臓機能に関する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血液試料を、第 11 週の全ての試験グループから収集した。約 3 mL の血液を、飢餓状態の動物から収集し、血清を分離するために試験管に配置した。30 ~ 80 分間室温で試験管を安定化させた後、遠心 (2,000 g × 15 分、室温) することにより血清を得た。BUN 及びクレアチニンの濃度を、Hitachi-917/911 化学分析装置を使用して 11 週目に測定した。この結果を表 24 に提示し、mg/dL で表す。アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れたこれら腎臓機能マーカーにおけるいずれかの変化を ISIS オリゴヌクレオチドは引き起こさなかった。

40

【表 2 4】

表 2 4

カニクイザルの血漿BUN及びクレアチニンレベル (mg/dL)

	用量 (mg/kg)	BUN	クレアチ ニン
PBS	-	7	56
ISIS 426325	8	8	58
	20	7	57
ISIS 426172	8	8	54
	20	7	53
ISIS 426183	8	6	62
	20	8	66
ISIS 426168	8	7	46
	20	6	46
ISIS 420476	8	7	51
	20	8	55
ISIS 426267	8	7	43
	20	6	50
ISIS 426261	8	7	56
	20	7	54
ISIS 426246	8	7	53
	20	6	54
ISIS 426115	8	8	57
	20	7	52
ISIS 426262	8	7	54
	20	6	58
ISIS 420470	8	7	61
	20	6	61
ISIS 426130	8	7	56
	20	6	57

10

20

30

【0493】

炎症のマーカー

カニクイザルのISISオリゴヌクレオチドの何らかの炎症効果を評価するために、1週目に血液試料を採取した。C-反応性タンパク質(CRP)は、肝臓内で合成され、炎症のマーカーとして機能し、Hitachi-917/911化学分析装置を使用して同様に測定した。この結果を表25に提示する。ISIS426172及びISIS420470での処置は、CRPレベルの増加を引き起こした。残りのISISオリゴヌクレオチドでの処置は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対する予想範囲を外れるいずれの変化も引き起こさなかった。

40

【0494】

約1.3mLの血液を、EDTAで処置した試験管内に収集し、血液学のパラメータの測定のために使用した。試料を、ADVIA120血液分析計(Bayer, USA)を用いて、赤血球細胞(RBC)数、白血球細胞(WBC)数、個々の白血球細胞のパーセンテージ、例えば、単球、好中球、リンパ球の数など、ならびに血小板数及びヘマトクリット(%)について試料を分析した。このデータを表26に提示する。ISIS426168及びISIS420476での処置により、リンパ球数が増加した。ISSI426325、ISIS426172、ISIS426262、及びISIS420470での処置により、好中球の数が増加した。残りのISISオリゴヌクレオチドでの処置は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに対して予想を超えた顕著な炎症促進性反応を引き起こさ

50

なかった。

【表 2 5】

表 2 5

カニクイザルにおけるCRPレベル

	用量 (mg/kg)	CRP (mg/L)
PBS	-	4
ISIS 426325	8	6
	20	5
ISIS 426172	8	17
	20	11
ISIS 426183	8	5
	20	3
ISIS 426168	8	3
	20	3
ISIS 420476	8	4
	20	6
ISIS 426267	8	4
	20	4
ISIS 426261	8	4
	20	3
ISIS 426246	8	6
	20	3
ISIS 426115	8	4
	20	3
ISIS 426262	8	4
	20	6
ISIS 420470	8	20
	20	12
ISIS 426130	8	3
	20	4

10

20

30

【表 2 6】

表 2 6

カニクイザルの血液細胞数

	用量 (mg/kg)	WBC (x 10 ³ /・L)	RBC (x 10 ⁶ /・L)	血小板 (x 1000/・L)	ヘマトク リット (%)	リンパ球 (%)	好中球 (%)	単球 (%)
PBS	-	13	6	500	47	56	39	2
ISIS	8	11	6	471	43	52	44	2
426325	20	13	6	454	45	45	52	2
ISIS	8	12	6	496	48	44	51	2
426172	20	14	6	437	45	42	54	2
ISIS	8	15	6	494	42	44	52	2
426183	20	12	6	466	45	61	34	2
ISIS	8	15	6	334	43	76	18	3
426168	20	18	6	401	44	73	22	3
ISIS	8	15	6	484	44	71	22	4
420476	20	15	6	455	42	70	24	3
ISIS	8	16	5	377	41	52	43	2
426267	20	14	5	488	41	42	52	3
ISIS	8	13	6	414	43	48	48	2
426261	20	12	5	414	40	47	48	3
ISIS	8	10	6	403	44	47	49	3
426246	20	17	6	421	45	43	54	2
ISIS	8	12	6	408	42	49	45	3
426115	20	15	6	457	44	47	50	2
ISIS	8	13	5	443	41	46	50	3
426262	20	15	6	402	44	46	50	2
ISIS	8	14	6	461	43	39	56	3
420470	20	12	5	445	43	45	50	2
ISIS	8	15	6	466	44	41	54	3
426130	20	16	6	425	42	48	45	2

10

20

30

【0495】

薬物動態試験

オリゴヌクレオチド濃度の測定

全長オリゴヌクレオチドの濃度ならびに総オリゴヌクレオチド濃度（分解形態を含む。）を12週に測定した。使用された方法は、フェノール-クロロホルム（液体-液体）抽出とそれに続く固相抽出からなる既に公開されている方法（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）の改法である。内部標準物質（ISIS 355868、本明細書中で配列番号57と呼ばれる、27-マーの2'-O-メトキシエチル修飾ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、GCGTTTGCTCTTCTTCTTGC GTTTTTT）を抽出前に添加した。およそ1.14 μg/gの定量下限（LLOQ）の校正曲線を用いて組織試料濃度を計算した。腎臓対肝臓における濃度比率を計算した。この結果を表27及び28に提示し、μg/g組織として表す。

40

【表 27】

表 27

カニクイザルの肝臓における完全長のオリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

I S I S 番号	用量 (mg/kg)	腎臓	肝臓	腎臓/肝臓 比率
426325	8	685	390	1.8
	20	1558	654	2.4
426172	8	643	483	1.3
	20	1159	1042	1.1
426183	8	655	537	1.2
	20	1245	820	1.5
426168	8	751	388	1.9
	20	1906	765	2.5
420476	8	939	463	2.0
	20	1318	689	1.9
426267	8	709	401	1.8
	20	1507	893	1.7
426261	8	453	382	1.2
	20	930	720	1.3
426246	8	595	248	2.4
	20	1479	425	3.5
426115	8	1035	511	2.0
	20	1403	1067	1.3
426262	8	558	410	1.4
	20	1506	921	1.6
420470	8	811	275	2.9
	20	2938	609	4.8
426130	8	718	425	1.7
	20	1715	769	2.2

10

20

30

【表 28】

表 28

カニクイザルの肝臓における総オリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

ISIS S 番号	用量 (mg/kg)	腎臓	肝臓	腎臓/肝 臓比率
426325	8	870	523	1.7
	20	2139	875	2.4
426172	8	922	688	1.3
	20	1681	1313	1.3
426183	8	905	809	1.1
	20	1791	1232	1.5
426168	8	909	507	1.8
	20	2477	951	2.6
420476	8	1367	636	2.1
	20	2057	948	2.2
426267	8	858	505	1.7
	20	1816	1103	1.6
426261	8	607	580	1.0
	20	1770	1098	1.6
426246	8	898	404	2.2
	20	2897	653	4.4
426115	8	1478	773	1.9
	20	2102	1542	1.4
426262	8	815	786	1.0
	20	2340	1438	1.6
420470	8	1051	401	2.6
	20	4012	815	4.9
426130	8	987	677	1.5
	20	2496	1144	2.2

10

20

30

【0496】

実施例 10 : ヒト GCCR を標的とする ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度の測定

40 cP を超える粘度を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングして除外するために、実施例 9 に記載されるサルの研究で試験した 3 種類のアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度を測定した。40 cP を超える粘度を有するオリゴヌクレオチドは粘度が高すぎて、何れの対象にも投与できない。

【0497】

ISIS オリゴヌクレオチド (32 から 35 mg) をガラスバイアルに量り取り、120 μL の水を添加し、バイアルを 50 で加熱することによって、アンチセンスオリゴヌクレオチドを溶解させて溶液にした。予め加熱した試料の一部 (75 μL) をピペットで採取して微小粘度計 (Cambridge) に入れた。微小粘度計の温度を 25 に設定し、試料の粘度を測定した。85 で 260 nM での UV 読み取り (Cary UV instrument) のために、予め加熱した試料の別の一部 (20 μL) をピペットで採取して 10 mL の水に加えた。この結果は表 29 で提示され、この結果は、全アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液が、上述の基準を下回る粘度である点で最適であることを示す。

40

【表 29】

表 29

ヒトGCCRを標的とするISISアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度および濃度

ISIS番号.	粘度 (cP)	濃度 (mg/mL)
420476	4.18	179
426115	17.6	178
426325	4.17	164

【0498】

10

実施例11：アカゲザルLLC-MK2細胞におけるヒトGCCRを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量反応の確認

実施例9に記載されるサルの研究から選択されたギャップマーを、LLC-MK2細胞の多様な投与量で試験した。試験したISISオリゴヌクレオチドは、アカゲザルGCCR遺伝子(ヌクレオチド1334000 1491000から短縮されたGENBANK受託番号NW_001120987.1に相補的な配列番号2)と交差反応性を示す。

【0499】

細胞を、25,000細胞/ウェルの密度でプレーティングし、表32で特定される0.09 μM、0.19 nM、0.38 μM、0.75 μM、1.50 μM、3.00 μM、6.00 μM又は12.00 μMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドで、エレクトロポレーションを使用して形質移入した。約16時間の処置期間後、RNAを細胞から単離し、定量的リアルタイムPCRによりGCCR mRNAレベルを測定した。ヒトGCCRプライマープロベセットRTS1408を使用してmRNAレベルを測定した。RIBOGREEN(登録商標)により測定して、総RNA含量によりGCCR mRNAレベルを調整した。この結果を、未処置の対照細胞と比較したGCCRの%阻害として提示する。表30に例証されるように、GCCR mRNAレベルは、試験したISISオリゴヌクレオチドで処置したLLC-MK2細胞において用量依存的に低下した。

20

【表 30】

表 30

エレクトロポレーションを使用したLLC-MK2におけるヒトGCCRの用量依存的アンチセンス阻害

30

ISIS番号	0.09 μM	0.19 μM	0.38 μM	0.75 μM	1.50 μM	3.00 μM	6.00 μM	12.00 μM	IC ₅₀ (μM)
377131	10	21	31	63	82	94	98	97	0.6
420476	0	2	4	30	45	71	93	97	1.7
426115	3	6	20	46	67	87	94	95	0.9
426261	6	24	31	52	77	94	97	97	0.6
426325	3	12	22	28	51	77	95	99	1.2

【0500】

40

実施例12：カニクイザルにおけるヒト/アカゲザルのGCCRを標的とするISIS426115の効果

ISIS426115は、非常に効力があり、かつ忍容性のあるアンチセンスオリゴヌクレオチドであることが上述の研究により示されたため、第2のカニクイザルの試験のために選択された。

【0501】

処置

試験前に、サルを検疫所で5週間維持し、その間、全身健康状態について動物を毎日観察した。このサルは2から3歳であり、体重は2から5kgであった。無作為に割り当てられた各5匹の雄カニクイザルの1群に対して、サルの関節包内領域及び外腿に、適切な

50

サイズのステンレス鋼投与針及びシリンジを用いてISIS 426115を皮下注射した。最初の1週間、週に4回(第1、3、5及び7日)、負荷用量としてサルに投与し、続いて第2から13週にわたり週に1回、40mg/kgのISIS 426115を投与した。最初の1週間、週に3回4回(第1、3、5及び7日)、8匹のカニクイザルの対照群にPBSを皮下注射し、続いて第2週から第13週にわたり週に1回注射した。

【0502】

試験期間の間、疾病又は苦痛の兆候についてサルを1日2回観察した。試験責任者による診察後、獣医学従事者によって、疼痛を緩和することに対して承認済みの鎮痛剤又は薬剤を用いて、処置、損傷又は疾病による一時的な又は軽度の疼痛又は苦痛を超えるものがある何れの動物も処置が行われた。健康状態が悪いか又は瀕死状態である危険性がある何れの動物も、さらなる監視及び安楽死の可能性に対して特定された。ケタミン/キシラジン誘導性麻酔及びペントバルビタールナトリウムの投与後、スケジュール化された動物の安楽死を放血によって第93日に遂行した。実施例に記載のプロトコールは、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)により、承認された。

10

【0503】

忍容性試験

肝臓機能

肝臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの影響を評価するために、群全てから血液試料を回収した。第95日に、投薬から48時間後、大腿静脈穿刺を介して血液試料を回収した。血液回収前に一晚、サルを飢餓状態にした。K₂-EDTA抗凝固薬を含有する試験管で血液を回収し、血漿を得るために遠心した。東芝200FR NEO化学分析装置(東芝株式会社、日本)を用いて、様々な肝臓機能マーカーのレベルを測定した。ALT及びASTの血漿レベルを測定し、この結果は表31で提示され、IU/L単位で表される。ビリルビン、肝臓機能マーカーを同様に測定し、表31で提示し、mg/dL単位で表す。ISIS 426115での処置は、サルにおいて、肝臓機能に関して忍容性が良好であった。

20

【表31】

表31

カニクイザルの血漿における肝臓代謝マーカーのレベル

30

	PBS	ISIS 426115
ALT (IU/L)	42	46
AST (IU/L)	42	46
ビリルビン (mg/dL)	0.18	0.26

【0504】

腎臓機能

腎臓機能におけるISIS 426115の影響を評価するために、試験群全てから血液試料を回収した。第95日、投薬から48時間後に、大腿静脈穿刺を介して血液試料を回収した。血液回収前に一晚、動物を飢餓状態にした。K₂-EDTA抗凝固薬を含有する試験管で血液を回収し、血漿を得るために遠心した。東芝200FR NEO化学分析装置(東芝株式会社、日本)を用いて、BUN及びクレアチニン濃度を測定した。結果は表32で提示され、mg/dL単位で表される。

40

【0505】

この血漿データは、ISIS 426115が、サルの腎臓機能に関して忍容性が良好であったことを示す。

【表 3 2】

表 3 2

カニクイザルにおける血漿効果BUN及びクレアチニンレベル (mg/dL)

	PBS	ISIS 426115
BUN	17	19
クレアチニン	0.60	0.58

実施例 9 に記載される試験を考慮に入れた本研究は、ISIS 426115 が、GCC R を標的とする忍容性が良好なアンチセンスオリゴヌクレオチドであることをさらに確認する。

10

【配列表】

201550115500001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/61984
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/11; C07H 21/04; C12N 5/00 (2013.01) USPC - 514/44A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 15/11; C07H 21/04; C12N 5/00 (2013.01) USPC - 514/44A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 536/24.5; 435/375 Search not restricted by classification Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, (oligonucleotide, linked nucleoside, glucocorticoid, gccl, isis 37217, modulaf*, gtcagggtgcttggtcig, isis 37217)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0222412 A1 (MONIA et al.) 02 September 2010 (02.09.2010). Paras [0005], [0006], [0008], [0009], [0022], [0024], [0025], [0050], [0051], [0053], [0065] and [0124].	1, 4-10 and 37-40
A	US 2007/0066557 A1 (MONIA et al.) 22 March 2007 (23.03.2007). Paras [0005]-[0010], [0021], [0022], [0024], [0025], [0028]-[0034], [0050], [0051], [0065] and [0123].	1, 4-10 and 37-40
A	US 2006/0160760 A1 (BHANOT et al.) 20 July 2006 (20.07.2006). Paras [0035], [0042], [0043], [0048], [0077], [0078], [0080], [0083], [0249].	1, 4-10 and 37-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 February 2012 (18.02.2013)		Date of mailing of the international search report 18 MAR 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/61984

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 11-29, 31-36, 41-52
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
- Please see extra sheet for continuation -

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 4-10, and 37-40 restricted to SEQ ID NO: 4

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/61984

Continuation of:

Box No III. Observations where unity of invention is lacking

Group I+: claims 1-10, 30 and 37-40, drawn to a compound comprising a modified oligonucleotide of 12 to 30 linked nucleosides having a nucleobase sequence comprising a portion of at least 8 contiguous nucleobases of any one of SEQ ID NOs: 4-56, wherein the nucleobase sequence of the modified oligonucleotide is at least 90% complementarity to SEQ ID NO: 1. The first invention is restricted to SEQ ID NO: 4 (Claims 1, 4-10, and 37-40). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional sequence(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

The inventions of Group I+ share the technical feature of a compound comprising a modified oligonucleotide of 12 to 30 linked nucleosides, wherein the nucleobase sequence of the modified oligonucleotide is at least 90% complementarity to SEQ ID NO: 1. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2010/0222412 A1 to Monia et al. (hereinafter 'Monia'). Monia discloses a compound comprising a modified oligonucleotide (para [0005]-[0006]) of 12 to 30 linked nucleosides having a nucleobase sequence comprising a portion of at least 8 contiguous nucleobases of SEQ ID NO: 4, wherein the nucleobase sequence of the modified oligonucleotide is at least 90% complementarity to SEQ ID NO: 1 (para [0125], SEQ ID NO: 37 is 100% identical to claimed SEQ ID NO: 4). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific sequence(s) recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because no significant structural similarities can readily be ascertained among sequence(s). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Group I+ therefore lacks unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01) A 6 1 K 31/7088

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

(74) 代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72) 発明者 フレアー, スーザン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72) 発明者 パノット, サンジェイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA09 CA12 CA20 DA03 GA11 HA17

4C084 AA13 NA14 ZC212 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZC21 ZC35