

(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2012-527444  
(P2012-527444A)

(43) 公表日 平成24年11月8日(2012.11.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 31/7105 (2006.01)</b>	A 61 K 31/7105 Z N A	2 G 04 5
<b>A61P 3/10 (2006.01)</b>	A 61 P 3/10	4 B 02 4
<b>A61P 3/06 (2006.01)</b>	A 61 P 3/06	4 B 06 3
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A 61 P 43/00 1 1 1	4 C 08 4
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A 61 K 45/00	4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-511367 (P2012-511367)	(71) 出願人	511272152 イーティーエイチ チューリッヒ スイス国, シーエイチ-8092 チューリッヒ, レミストラッセ 101/エイチ ジー イー 48. 1
(86) (22) 出願日	平成22年5月19日 (2010.5.19)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(85) 翻訳文提出日	平成24年1月6日 (2012.1.6)	(72) 発明者	ストフェル, マルクス スイス国, シーエイチ-8704 ヘルリ ベルグ, ガルテンストラッセ 11
(86) 國際出願番号	PCT/IB2010/001384	(72) 発明者	トランジュコビスキ, ミルコ スイス国, シーエイチ-8037 チューリッヒ, ノルドストラッセ 358
(87) 國際公開番号	W02010/133970	F ターム (参考)	2G045 AA13 AA25 AA29 CB01 CB17 DA14 DA30 DA77
(87) 國際公開日	平成22年11月25日 (2010.11.25)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	61/322,878		
(32) 優先日	平成22年4月11日 (2010.4.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/180,024		
(32) 優先日	平成21年5月20日 (2009.5.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】代謝障害に関するターゲッティングマイクロRNA

## (57) 【要約】

代謝障害の治療のための方法および組成物が、本明細書中で提供される。本明細書中では、血糖値の低減、糖新生の低減、インスリン抵抗性の改善および血漿コレステロール値の低減のための方法および組成物も提供される。ある実施形態では、前記方法は、m i R - 103 の活性を抑制することを包含する。ある実施形態では、前記方法は、m i R 107 の活性を抑制することを包含する。ある実施形態では、m i R - 103 および m i R - 107 の両方の活性が抑制される。ある実施形態では、このような方法は、マイクロRNAに対して標的化されるオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを包含する。

【選択図】図なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者の血糖値の低減方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者の血糖値を低減することを包含する方法。

**【請求項 2】**

前記被験者が血糖値上昇を示す請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

被験者の血糖値を測定することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。 10

**【請求項 4】**

血糖値上昇を示す被験者を選択することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。  
。

**【請求項 5】**

前記血糖値が空腹時血糖値である前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

前記血糖値が食後血糖値である請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7】**

前記血糖値が全血血糖値である前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

前記血糖値が血漿血糖値である前記請求項のいずれかに記載の方法。 20

**【請求項 9】**

200 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 10】**

175 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 11】**

150 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。 30

**【請求項 12】**

125 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 13】**

120 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 14】**

115 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 15】**

110 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。 40

**【請求項 16】**

105 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 17】**

100 mg / d L より低い値に血糖値を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 18】**

血糖値上昇を発症する危険がある被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは 50

遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

【請求項 19】

被験者における糖新生の低減方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における糖新生を低減することを包含する方法。

【請求項 20】

前記被験者が糖新生を示す請求項 19 記載の方法。

10

【請求項 21】

被験者におけるインスリン感受性の改善方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン感受性を改善することを包含する方法。

【請求項 22】

前記被験者がインスリン抵抗性を有する請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

インスリン抵抗性を有する被験者を選択することを包含する請求項 21 記載の方法。

20

【請求項 24】

インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者においてインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

【請求項 25】

インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者を選択することを包含する請求項 24 記載の方法。

30

【請求項 26】

被験者における糖耐性の改善方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより糖耐性を改善することを包含する方法。

【請求項 27】

前記被験者が糖耐性減損を有する請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

糖耐性減損を有する被験者を選択することを包含する請求項 26 記載の方法。

40

【請求項 29】

被験者における血漿コレステロール値の減少方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血漿コレステロールを減少することを包含する方法。

【請求項 30】

前記被験者が血漿コレステロール値上昇を示す請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

血漿コレステロール値上昇を示す被験者を選択することを包含する請求項 29 記載の方法。

50

## 【請求項 3 2】

前記血漿コレステロールが LDL コレステロールである請求項 2 9 記載の方法。

## 【請求項 3 3】

前記血漿コレステロールが VLDL コレステロールである請求項 2 9 記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記被験者が代謝障害を有する前記請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 3 5】

被験者における少なくとも 1 つの代謝障害の治療方法であって、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107 あるいは m i R - 103 または m i R - 107 の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を代謝障害を有する被験者に投与し、それにより代謝障害を治療することを包含する方法。10

## 【請求項 3 6】

代謝障害を発症する危険がある被験者における少なくとも 1 つの代謝障害の開始を防止するかまたは遅延する方法であって、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107 あるいは m i R - 103 または m i R - 107 の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における代謝障害の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

## 【請求項 3 7】

少なくとも 1 つの代謝障害が、糖尿病前症、糖尿病、代謝性症候群、肥満症、糖尿病性異脂肪血症、高脂血症、高血圧症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、高コレステロール血症および高インスリン血症の中から選択される請求項 3 5 ~ 3 6 記載の方法。20

## 【請求項 3 8】

被験者における脂肪細胞分化の増大方法であって、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107 あるいは m i R - 103 または m i R - 107 の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における脂肪細胞分化を増大することを包含する方法。

## 【請求項 3 9】

体脂肪を過剰に有する被験者を選択することを包含する請求項 3 8 記載の方法。

## 【請求項 4 0】

被験者の体重を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。30

## 【請求項 4 1】

被験者における体脂肪を低減することを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 2】

投与することが非経口投与を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 3】

非経口投与が静脈内投与または皮下投与を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 4】

投与することが経口投与を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 5】

少なくとも 1 つの付加的療法を施すことを包含する前記請求項のいずれかに記載の方法40

。

## 【請求項 4 6】

少なくとも 1 つの付加的療法が血糖降下薬である請求項 4 1 記載の方法。

## 【請求項 4 7】

血糖降下薬が、PPAR アゴニスト（ガンマ、デュアルまたはパン）、ジペプチジルペプチダーゼ（IV）阻害薬、GLP-1 類似体、インスリンまたはインスリン類似体、インスリン分泌促進薬、SGLT2 阻害薬、ヒトアミリン類似体、ビグアニド、アルファ-グルコシダーゼ阻害薬、メグリチニド、チアゾリジンジオンおよびスルホニル尿素の中から選択される請求項 4 2 記載の方法。

## 【請求項 4 8】

10

20

30

40

50

少なくとも 1 つの付加的療法が脂質低下薬である請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 9】

少なくとも 1 つの付加的療法が前記化合物と同時に投与される請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

少なくとも 1 つの付加的療法が前記化合物より低頻度で投与される請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

少なくとも 1 つの付加的療法が前記化合物より高頻度で投与される請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

少なくとも 1 つの付加的療法が前記化合物の投与の前に投与される請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 3】

少なくとも 1 つの付加的療法が前記化合物の投与後に投与される請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

少なくとも 1 つの付加的療法および化合物が同時投与される請求項 4 5 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

前記化合物が薬学的組成物の形態で投与される前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

細胞または組織におけるインスリン抵抗性を改善する方法であって、前記細胞または組織を、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法。

【請求項 5 7】

前記細胞または組織が、肝臓、脂肪または骨格筋細胞または組織である請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

前記細胞または組織が脂肪細胞または組織である請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 9】

細胞におけるインスリン感受性の増大方法であって、細胞を、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法であり、前記細胞がインスリンに対する感受性低減を示す方法。

【請求項 6 0】

前記細胞が脂肪細胞である請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

脂肪細胞分化を誘導する方法であって、脂肪細胞を、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなり、配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法。

【請求項 6 2】

前記化合物がオリゴヌクレオチドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 3】

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と少なくとも 85 % 相同である前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と少なくとも 90 % 相同である前記請求項のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 6 5】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と少なくとも 95% 相同である前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6 6】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 の核酸塩基配列と完全に相同である前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6 7】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 から選択される核酸塩基配列と 2 つ以下の不整合を有する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6 8】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 から選択される核酸塩基配列と 1 つ以下の不整合を有する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6 9】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 から選択される核酸塩基配列と 1 つの不整合を有する前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 0】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 1、2、3、4 または 5 から選択される核酸塩基配列と不整合を有さない前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 1】**

前記オリゴヌクレオチドが修飾オリゴヌクレオチドである前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 2】**

前記オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 3】**

前記オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 4】**

前記オリゴヌクレオチドが少なくとも 3 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 5】**

前記オリゴヌクレオチドの最初および最後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前記請求項のいずれかの方法。

**【請求項 7 6】**

前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 7】**

少なくとも 1 つの修飾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 7 2 ~ 7 6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 8】**

前記ヌクレオチドが、修飾糖を含む少なくとも 1 つのヌクレオシドを含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 7 9】**

前記ヌクレオチドが、修飾糖を含む少なくとも 2 つのヌクレオシドを含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8 0】**

前記ヌクレオチドが、修飾糖を含む少なくとも 3 つのヌクレオシドを含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8 1】**

前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが修飾糖を含む前記請求項のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 8 2】

前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが 2' - O - メトキシエチル糖を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 3】

前記オリゴヌクレオチドが、 2' - O - メトキシエチル糖を含む複数のヌクレオシドおよび 2' - フルオロ糖修飾を含む複数のヌクレオシドを含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 4】

各修飾糖が、 2' - O - メトキシエチル糖、 2' - フルオロ糖、 2' - O - メチル糖および二環式糖部分から独立して選択される請求項 7 8 ~ 8 1 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 8 5】

各ヌクレオシドが 2' - O - メチルヌクレオシドであり、最初の 2 つの 5' ヌクレオシド間結合の各々がホスホロチオエートであり、4 つの 3' 末端ヌクレオシド間結合の各々がホスホロチオエートであり、残りのヌクレオシド間結合の各々がホスホジエステルであり、そして 3' 末端ヌクレオシドがヒドロキシプロリノール結合を介してコレステロールと連結される請求項 7 8 ~ 8 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 6】

前記オリゴヌクレオチドが 1 2 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 8 7】

前記オリゴヌクレオチドが 1 3 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 8】

前記オリゴヌクレオチドが 1 4 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 9】

前記オリゴヌクレオチドが 1 5 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 0】

前記オリゴヌクレオチドが 1 6 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 9 1】

前記オリゴヌクレオチドが 1 7 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 2】

前記オリゴヌクレオチドが 1 8 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 3】

前記オリゴヌクレオチドが 1 9 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 9 4】

前記オリゴヌクレオチドが 2 0 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 5】

前記オリゴヌクレオチドが 2 1 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 6】

前記オリゴヌクレオチドが 2 2 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。 50

**【請求項 9 7】**

前記オリゴヌクレオチドが 2 3 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 9 8】**

前記オリゴヌクレオチドが 2 4 の連結ヌクレオシドからなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 9 9】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 6、7 または 8 の核酸塩基配列を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 0 0】**

前記オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が配列番号 6、7 または 8 の核酸塩基配列からなる前記請求項のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 0 1】**

治療を必要とする被験者の同定方法であって、以下の：

被験者から得られる試料中のマイクロ RNA の量を陰性対照の量と比較すること（この場合、マイクロ RNA は m i R - 1 0 3 または m i R - 1 0 7 であり、そして被験者から得られる試料中のより多い量のマイクロ RNA は、被験者が m i R N A - 1 0 3 / 1 0 7 と相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物による治療を必要とする、ということを示す）

を包含する方法。

**【請求項 1 0 2】**

前記試料が肝臓試料である請求項 1 0 1 記載の方法。

**【請求項 1 0 3】**

前記試料が脂肪組織試料である請求項 1 0 0 記載の方法。

**【請求項 1 0 4】**

前記被験者が代謝障害を発症する危険がある請求項 1 0 1 記載の方法。

**【請求項 1 0 5】**

前記被験者が代謝障害を有すると推測される請求項 1 0 1 記載の方法。

**【請求項 1 0 6】**

被験者の血糖値の低減方法であって、7 ~ 1 2 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者の血糖値を低減することを包含する方法。

**【請求項 1 0 7】**

血糖値上昇を発症する危険がある被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、7 ~ 1 2 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

**【請求項 1 0 8】**

被験者における糖新生の低減方法であって、7 ~ 1 2 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における糖新生を低減することを包含する方法。

**【請求項 1 0 9】**

被験者におけるインスリン感受性の改善方法であって、7 ~ 1 2 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン感受性を改善することを包含する方法。

**【請求項 1 1 0】**

インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者におけるインスリン抵抗性の開始を防止

10

20

30

40

50

するかまたは遅延するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

【請求項 1 1 1】

被験者における糖耐性の改善方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより糖耐性を改善することを包含する方法。

【請求項 1 1 2】

被験者における少なくとも1つの代謝障害の治療方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を代謝障害を有する被験者に投与し、それにより代謝障害を治療することを包含する方法。

【請求項 1 1 3】

代謝障害を発症する危険がある被験者における少なくとも1つの代謝障害の開始を防止するかまたは遅延する方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における代謝障害の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法。

【請求項 1 1 4】

少なくとも1つの代謝障害が、糖尿病前症、糖尿病、代謝性症候群、肥満症、糖尿病性異脂肪血症、高脂血症、高血圧症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、高コレステロール血症および高インスリン血症の中から選択される請求項 1 1 2～1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 1 5】

被験者における脂肪細胞分化の増大方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における脂肪細胞分化を増大することを包含する方法。

【請求項 1 1 6】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 および 1 6 のいずれかの核酸塩基配列を含む請求項 1 0 6～1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1 0 の核酸塩基配列を含む請求項 1 0 6～1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記オリゴヌクレオチドが配列番号 1 1 の核酸塩基配列を含む請求項 1 0 6～1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが修飾糖を含む請求項 1 0 6～1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 0】

各修飾糖 2' - O - メトキシエチル糖、2' - フルオロ糖、2' - O - メチル糖および二環式糖部分から独立して選択される請求項 1 1 9 記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記二環式糖部分が L N A である請求項 1 2 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(配列表)

本出願は、電子フォーマットでの配列表を伴って出願されたものである。配列表は、4

10

20

30

40

50

Kbのサイズで、ETHZ0001WOSEQ.txtという表題のファイル(2010年5月19日作成)として提示される。配列表の電子フォーマットでの情報は、参照により本明細書中で援用される。

#### 【0002】

代謝障害の治療のための方法および組成物が、本明細書中で提供される。

#### 【背景技術】

#### 【0003】

「成熟mRNA」としても知られているマイクロRNA(mRNA)は、植物および動物のゲノムにおいてコードされる小型(約18~24ヌクレオチド長)非コードRNA分子である。ある場合には、高度に保存された内因的発現mRNAは、特定のmRNAの3'非翻訳領域(3'-UTR)と結合することにより、遺伝子の発現を調節する。1000より多くの異なるmRNAが、植物および動物において同定されている。ある成熟mRNAは、しばしば数百ヌクレオチド長である長い内因性一時mRNA転写物(pri-mRNA、pri-mir、pri-miRまたはpri-pre-miRNAとしても既知である)から生じると思われる(Lee, et al., EMBO J., 21(17), 4663-4670)。

10

#### 【0004】

これらの小型非コードRNAが、動物におけることなる生理学的過程、例えば発生時機、器官形成、分化、パターン化、胚形成、成長制御およびプログラムされた細胞死に寄与する、ということをmRNAの機能的分析は明示している。mRNAが関与する特定の過程の例としては、幹細胞分化、神経形成、血管新生、造血およびエキソサイトシスが挙げられる(Alvarez-Garcia and Miska, Development, 2005, 132, 4653-4662により再検討されている)。

20

#### 【0005】

mRNAのファミリーは、シード配列として既知の領域であるmRNAの位置2~8でのヌクレオチド同一性により特異化され得る。いくつかのmRNAファミリー、ならびにmRNAスーパーファミリー(関連シード配列により特異化される)を、Lewis等は記載する(Lewis et al. Cell, 2005, 120(1): 15-20)。マイクロRNA-miR-103およびmRNA-107は、同一のシード量基を有するので、ファミリー成員である。したがって、これら2つのマイクロRNAは、同一でないとしても、類似の組の標的遺伝子を調節する。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本明細書中では、代謝障害ならびに代謝障害に関連した症状を治療するための方法であって、マイクロRNAに対して標的化されるオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、マイクロRNAはmiR-103である。ある実施形態では、マイクロRNAはmiR-107である。

#### 【0007】

本明細書中では、被験者の血糖値を低減するための方法であって、12~30連結ヌクレオシドからなり、miR-103、miR-107あるいはmiR-103またはmiR-107の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者の血糖値を低減することを包含する方法が提供される。

40

#### 【0008】

本明細書中では、被験者の血糖値を低減するための方法であって、7~12連結ヌクレオシドからなり、miR-103およびmiR-107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者の血糖値を低減することを包含する方法が提供される。

#### 【0009】

50

ある実施形態では、被験者は血糖値上昇を示す。ある実施形態では、方法は、被験者の血糖値を測定することを包含する。ある実施形態では、方法は、血糖値上昇を示す被験者を選択することを包含する。ある実施形態では、血糖値は空腹時血糖値である。ある実施形態では、血糖値は食後血糖値である。ある実施形態では、血糖値は全血血糖値である。ある実施形態では、血糖値は血漿血糖値である。

#### 【0010】

ある実施形態では、血糖値は200mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は175mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は150mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は125mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は120mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は115mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は110mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は105mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は100mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、血糖値は110mg/dLより低い値に低減される。

10

#### 【0011】

本明細書中では、血糖値上昇を発症する危険がある被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはm i R - 103またはm i R - 107の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。

20

#### 【0012】

本明細書中では、血糖値上昇を発症する危険がある被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血糖値上昇の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。

30

#### 【0013】

本明細書中では、被験者における糖新生の低減方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはm i R - 103またはm i R - 107の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における糖新生を低減することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、被験者は糖新生を示す。

#### 【0014】

本明細書中では、被験者における糖新生の低減方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における糖新生を低減することを包含する方法が提供される。

40

#### 【0015】

本明細書中では、被験者におけるインスリン感受性の改善方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはm i R - 103またはm i R - 107の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン感受性を改善することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、被験者はインスリン抵抗性を有する。ある実施形態では、方法は、インスリン抵抗性を有する被験者を選択することを包含する。

#### 【0016】

本明細書中では、被験者におけるインスリン感受性の改善方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるイ

50

ンスリン感受性を改善することを包含する方法が提供される。

【0017】

本明細書中では、インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者においてインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、方法は、インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者を選択することを包含する。

【0018】

本明細書中では、インスリン抵抗性を発症する危険がある被験者においてインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者におけるインスリン抵抗性の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。

【0019】

本明細書中では、被験者における糖耐性の改善方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより糖耐性を改善することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、被験者は糖耐性減損を有する。ある実施形態では、方法は、糖耐性減損を有する被験者を選択することを包含する。

【0020】

本明細書中では、被験者における糖耐性の改善方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより糖耐性を改善することを包含する方法が提供される。

【0021】

本明細書中では、被験者における血漿コレステロール値の減少方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における血漿コレステロールを減少することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、被験者は血漿コレステロール値上昇を示す。ある実施形態では、方法は、血漿コレステロール値上昇を示す被験者を選択することを包含する。ある実施形態では、血漿コレステロールはL D Lコレステロールである。ある実施形態では、血漿コレステロールはV L D Lコレステロールである。

【0022】

本明細書中で提供される方法のいずれかにおいて、被験者は代謝障害を有し得る。

【0023】

本明細書中では、被験者における少なくとも1つの代謝障害の治療方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を代謝障害を有する被験者に投与し、それにより代謝障害を治療することを包含する方法が提供される。

【0024】

本明細書中では、被験者における少なくとも1つの代謝障害の治療方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を代謝障害を有する被験者に投与し、それにより代謝障害を治療することを包含する方法が提供される。

【0025】

10

20

30

40

50

本明細書中では、代謝障害を発症する危険がある被験者における少なくとも1つの代謝障害の開始を防止するかまたは遅延する方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における代謝障害の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。

#### 【0026】

本明細書中では、代謝障害を発症する危険がある被験者における少なくとも1つの代謝障害の開始を防止するかまたは遅延する方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における代謝障害の開始を防止するかまたは遅延することを包含する方法が提供される。

10

#### 【0027】

ある実施形態では、少なくとも1つの代謝障害は、糖尿病前症、糖尿病、代謝性症候群、肥満症、糖尿病性異脂肪血症、高脂血症、高血圧症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、高コレステロール血症および高インスリン血症の中から選択される。

#### 【0028】

ある実施形態では、投与することは非経口投与を含む。ある実施形態では、非経口投与は静脈内投与または皮下投与を含む。ある実施形態では、投与することは経口投与を含む。

20

#### 【0029】

ある実施形態では、投与することは、少なくとも1つの付加的療法を施すことを包含する。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は血糖降下薬である。ある実施形態では、血糖降下薬は、P P A R アゴニスト（ガンマ、デュアルまたはパン）、ジペプチジルペプチダーゼ（I V）阻害薬、G L P - I 類似体、インスリンまたはインスリン類似体、インスリン分泌促進薬、S G L T 2 阻害薬、ヒトアミリン類似体、ビグアニド、アルファ - グルコシダーゼ阻害薬、メグリチニド、チアゾリジンジオンおよびスルホニル尿素の中から選択される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は脂質低下薬である。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は化合物と同時に投与される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は化合物より低頻度で投与される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は化合物より高頻度で投与される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は化合物の投与の前に投与される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法は化合物の投与後に投与される。ある実施形態では、少なくとも1つの付加的療法および化合物は同時投与される。

30

#### 【0030】

ある実施形態では、化合物は薬学的組成物の形態で投与される。

#### 【0031】

本明細書中では、細胞または組織におけるインスリン抵抗性を改善する方法であって、細胞または組織を、12～30連結ヌクレオシドからなり、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、細胞または組織は、肝臓、脂肪または骨格筋細胞または組織である。ある実施形態では、細胞または組織は脂肪細胞または組織である。ある実施形態では、細胞または組織はin vivoで接触される。

40

#### 【0032】

本明細書中では、被験者における脂肪細胞分化の増大方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3、m i R - 1 0 7あるいはm i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7の前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における脂肪細胞分化を増大することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、被験者は過剰量の体脂肪を有する。ある実施形態では、投与は被験者の体重を低減する。ある実施形態では、投与することは、被験者におけ

50

る体脂肪を低減する。

【0033】

本明細書中では、被験者における脂肪細胞分化の増大方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与し、それにより被験者における脂肪細胞分化を増大することを包含する方法が提供される。

【0034】

本明細書中では、細胞におけるインスリン感受性の増大方法であって、細胞を、12～30連結ヌクレオシドからなり、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、細胞はインスリンに対する感受性低減を示す。ある実施形態では、細胞は脂肪細胞である。

10

【0035】

本明細書中では、脂肪細胞分化を誘導する方法であって、脂肪細胞を、12～30連結ヌクレオシドからなり、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物と接触することを包含する方法が提供される。

【0036】

ある実施形態では、化合物はオリゴヌクレオチドからなる。

20

【0037】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と少なくとも85%相同である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と少なくとも90%相同である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と少なくとも95%相同である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5の核酸塩基配列と完全に相同である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5から選択される核酸塩基配列と2つ以下の不整合を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5から選択される核酸塩基配列と1つ以下の不整合を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5から選択される核酸塩基配列と1つの不整合を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1、2、3、4または5から選択される核酸塩基配列と不整合を有さない。

30

【0038】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは修飾オリゴヌクレオチドである。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは少なくとも2つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは少なくとも3つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの最初および最後のヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、少なくとも1つの修飾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。ある実施形態では、ヌクレオチドは、修飾糖を含む少なくとも1つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、ヌクレオチドは、修飾糖を含む少なくとも2つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、ヌクレオチドは、修飾糖を含む少なくとも3つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは修飾糖を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル糖を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル糖を含む複数のヌクレオシドおよび2'-フルオロ糖修飾を含む複数のヌクレオシドを含む。ある実施形態では、各修飾糖は、2

40

50

' - O - メトキシエチル糖、2' - フルオロ糖、2' - O - メチル糖および二環式糖部分から独立して選択される。ある実施形態では、二環式糖部分は LNA である。ある実施形態では、化合物はオリゴヌクレオチドと連結される共役体を含む。ある実施形態では、共役体はコレステロールである。

【0039】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは異化の修飾を有する：各ヌクレオシドが 2' - O - メチルヌクレオシドであり、最初の 2 つの 5' ヌクレオシド間結合の各々がホスホロチオエートであり、4 つの 3' 末端ヌクレオシド間結合の各々がホスホジエステルであり、そして 3' 末端ヌクレオシドがヒドロキシプロリノール結合を介してコレステロールと連結される。

10

【0040】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 7 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、8 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 9 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 10 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 11 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 12 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 13 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 14 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 15 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 16 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 17 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 18 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 19 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 20 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 21 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 22 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 23 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 24 連結ヌクレオシドからなる。

20

【0041】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号 6、7 または 8 の核酸塩基配列を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は配列番号 6、7 または 8 の核酸塩基配列からなる。

30

【0042】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 10、11、12、13、14、15 および 16 のいずれかの核酸塩基配列を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 10 の核酸塩基配列を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 11 の核酸塩基配列を含む。

40

【0043】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 10、11、12、13、14、15 および 16 のいずれかの核酸塩基配列からなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 10 の核酸塩基配列からなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 11 の核酸塩基配列からなる。このようなある実施形態では、各ヌクレオシドは糖修飾を含む。

【0044】

本明細書中では、治療を必要とする被験者の同定方法であって、被験者から得られる試料中のマイクロ RNA の量を陰性対照の量と比較すること（この場合、マイクロ RNA は miR - 103 または miR - 107 であり、そして被験者から得られる試料中のより多い量のマイクロ RNA は、被験者が miRNA - 103 / 107 と相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物による治療を必要とする、ということを示す）を包含する方法が提供される。ある実施形態では、試料は肝臓試料である。ある実施形態では、試料は脂肪組織試料である。ある実施形態では、被験者は代謝障害を発症する危険がある。ある実施

50

形態では、被験者が代謝障害を有すると推測される。ある実施形態では、被験者は、m i R N A - 1 0 3 および / または m i R 1 0 7 あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物で治療される。

#### 【0045】

本発明のこれらのおよびその他の実施形態は、以下の図面、説明および特許請求の範囲と関連付けて明らかになる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0046】

別記しない限り、野生型雄 C 5 7 B 1 / 6 マウス ( ~ 2 0 g ) に、 P B S 、抗 m i R - 1 0 7 ( 1 × 1 5 m g / k g ) 、抗 m i R 1 0 3 ( 2 × 1 5 m g / k g ) 、抗 m m - 1 0 7 ( 2 × 1 5  $\mu$  g / k g ) または抗 m i R - 1 2 4 ( 2 × 1 5  $\mu$  g / k g ) の何れかを注射し、一方、雄 o b / o b ( 4 5 g ) には、 P B S 、抗 m i R - 1 0 7 ( 1 × 1 5 m g / k g ) 、抗 m i R 1 0 3 ( 2 × 1 5 m g / k g ) または抗 m i R - 1 2 4 ( 2 × 1 5 m g / k g ) の何れかを注射した。図面全体を通して、抗 m i R 処置のラベルには、以下の表中の記載と同様に記載した。

#### 【表 1】

表 1

修飾オリゴヌクレオチドの説明		
数字標識	図&実施例の記述	配列および化学的性質
Ant.103 または Ant-103	抗-miR-103	<ul style="list-style-type: none"> <li>UCAUAGCCCUGUACAAUGCUGCU (配列番号 6)</li> <li>各糖での 2'-0-メチル修飾</li> <li>最初の 4 つおよび最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾；残りの結合はホスホジエステルである</li> <li>ヒドロキシプロリノールにより連結される 3' 末端でのコレステロール</li> </ul>
Ant.107 or Ant-107	抗-miR-107	<ul style="list-style-type: none"> <li>UGAUAGCCCUGUACAAUGCUGCU (配列番号 7)</li> <li>各糖での 2'-0-メチル修飾</li> <li>最初の 4 つおよび最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾；残りの結合はホスホジエステルである</li> <li>ヒドロキシプロリノールにより連結される 3' 末端でのコレステロール</li> </ul>
Ant.scr or Ant-scr or Ant.MM107 or 抗-MM107 or Ant.MM103 or Ant-MM103	抗-mm-107	<ul style="list-style-type: none"> <li>TCATTGGCATGTACCATGCAGCT (配列番号 9)</li> <li>各糖での 2'-0-メチル修飾</li> <li>最初の 4 つおよび最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾；残りの結合はホスホジエステルである</li> <li>ヒドロキシプロリノールにより連結される 3' 末端でのコレステロール</li> </ul>
Ant.124 or Ant-124	抗-miR-124	<ul style="list-style-type: none"> <li>miR-124 の完全相補体</li> <li>TGGCATTCCCGCGTGCCTAA (配列番号 19)</li> <li>各糖での 2'-0-メチル修飾</li> <li>最初の 4 つおよび最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾；残りの結合はホスホジエステルである</li> <li>ヒドロキシプロリノールにより連結される 3' 末端でのコレステロール</li> </ul>

【図 1】 m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 は糖尿病および肥満症のモデルにおいて上方調節される。( A ) 指示されたような野生型 ( w t ) 、 o b / o b 、正常固形試料 ( C h o w ) または D I O マウスの肝臓からの総 R N A 2 5  $\mu$  g における m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 に関するノーザンプロットティング ( n = 3 ) 。総 R N A の臭化工チジウム染色を、対照として示す。( B ) 0 、 1 0 または 1 0 0 n M 合成 m i R - 1 0 3 または m i R - 1 0 7 における m i R - 1 0 3 に関するノーザンプロットティング。( C ) 抗 m i

10

20

30

40

50

R - 103 および抗m i R - 107 または対照として PBS を注射した o b / o b マウスの肝臓からの総 RNA 35 μg における m i R - 103、m i R - 107 または m i R - 16 に関するノーザンプロットティング。 (D) 抗m i R - 103、抗m i R - 107 または対照として PBS を注射した o b / o b または C 57 B 1 / 6 マウスの脂肪からの総 RNA 35 μg における m i R - 107 または m i R - 16 に関するノーザンプロットティング。 (E) 抗m i R - 103 処置を用いた場合と用いない場合の、 C 57 B 1 / 6 の異なる器官からの総 RNA 35、10 または 5 μg における m i R - 103、m i R - 16 または U 6 に関するノーザンプロットティング。 (F) C 57 B 1 / 6 マウスの肝臓および脂肪からの総 RNA 35 μg における m i R - 103 に関するノーザンプロットティング。

【図 2】m i R - 107 のアデノウイルス媒介性過剰発現は m i R - 107 発現を増大し m i R - 103 / 107 標的を下方調節する。 (A) アデノウイルス注射 C 57 B 1 / 6 または PBS 注射 o b / o b マウスにおける肝臓からの m i R - 107 のノーザンプロット分析。示した実験は全て、 n = 5 からである。 (B) 3' UTR 中の m i R - 107 とシード整合を有する mRNA は、 3' UTR 中の m i R - 107 とシード整合を有さない mRNA と比較して、有意に下方調節された；下方調節は、進化選択圧下にあると推測されるシード整合を保有する mRNA の亜組に関してより顕著である。

【図 3】m i R - 103 / 107 の抗 m i R 抑制はコレステロールを低減する。 (A) 指示されたような、それぞれ LDL または HDL のマーカーとしての抗アポ B または抗アポ A 1 抗体でイムノプロットされた分画のウエスタンプロットティング。 (B) 指示されたような、それぞれ VLDL、LDL または HDL のマーカーとしての抗アポ E、抗アポ B または抗アポ A 1 抗体でイムノプロットされた分画のウエスタンプロットティング。 (C) トリグリセリドに関して検定された、 PBS または抗 m i R - 103 を注射した 8 週齢雌 LDL R - / - マウスの血漿 150 uL からの FPLC ゲル滌過により分離された主リポタンパク質分画。

【図 4】m i R - 103 / 107 の抗 m i R 抑制は遺伝子標的を低減する。 (A) m i R - 103 / 107 のサイレンシング時の o b / o b マウスからの肝臓 RNA を用いた標的遺伝子の実時間 PCR。 (B) m i R - 103 / 107 の抗 m i R サイレンシング後の o b / o b マウスからの脂肪 RNA を用いた標的遺伝子の実時間 PCR。 (C) m i R - 103 / 107 の抗 m i R サイレンシング後の o b / o b マウスからの筋肉 RNA を用いた標的遺伝子の実時間 PCR。

【図 5】m i R - 103 または m i R - 107 の変調は標的タンパク質を調節する。 (A) 図 1 A および B の場合と同様に PBS または抗 m i R - 103 を注射した o b / o b マウスの脂肪からの総抽出物のウエスタンプロットティング。カベオリン 1 (Santa Cruz)、インスリン受容体 b (IR b)、pAKT、AKT および y - チューブリンに対する抗体で、膜をプロットティングした。 (B、C) タンパク質抽出物 35 μg、あるいは指示されたような濃度で PBS、抗 m i R - 124 または抗 m i R - 103 でトランスフェクトされた HEK 293 細胞からの総 RNA 25 μg のウエスタンプロットティング (B) およびノーザンプロットティング (C)。 (D) 6 - ウエルフォーマット中に植え付けて、抗 m i R - 103 とともにインキュベートした HEK 293 細胞からの総細胞抽出物のウエスタンプロットティング。抗 m i R 処置の 3 日後に、細胞を収穫した。 (E および F) 250 pmol / 6 ウエルプレートのウエルの濃度で、模造、スクランブルまたは m i R 103 siRNA でトランスフェクト後 2 日目に収穫した 6 - ウエルフォーマットでプレート化した HEK 293 細胞からの総細胞抽出物のウエスタンプロット。

(G) 6 - ウエルフォーマットでプレート化し、そして 250 pmol / 6 ウエルプレートのウエルの濃度で、模造、スクランブル 1、スクランブル 2 または m i R 103 siRNA でのトランスフェクション後 2 日目に収穫した 3T3 細胞からの総細胞抽出物のウエスタンプロット。

【図 6】抗 m i R - 103 のリポソーム送達。異なる量の Lip - 抗 m i R - 103、Lip - 抗 m i R - 107 または対照としての PBS を注射した o b / o b マウスからの肝臓、脂肪または筋肉からの総 RNA 30 μg における m i R - 103 または m i R - 16 に関するノーザンプロットティング。

10

20

30

40

50

【図7】脂肪組織におけるm i R - 1 0 3 / 1 0 7 抑制の作用。(A)抗m i R - 1 0 7 または抗m i R - 1 0 3 注射D I O (上部)またはo b / o b マウス(底部)におけるコンピューター断層撮影(CT)。(B、C)抗m i R - 1 0 7 または抗m i R - 1 0 3 o b / o b (B)およびD I O (C)注射マウスのS C またはV脂肪からのパラフィン切片のヘマトキシリン(HE)染色。(D)抗m i R - 1 0 3 または抗m i R - 1 0 7 の存在下での分化の8日後のS V F細胞におけるB O D I P Y脂質滴染色、ヘキスト核検出およびS y t o 6 0 サイトゾル染色。

【図8】m i R - 1 0 3 による遺伝子発現およびインスリンシグナル伝達の調節。(A)A d - G F P またはa d - 1 0 7 / G F P を注射したC 5 7 B 1 / 6 マウスの肝臓からの総タンパク質抽出物 5 0  $\mu$  g のウエスタンブロッティング。(B)a d - G F P またはa d - 1 0 7 / G F P を注射したC 5 7 B 1 / 6 マウス外科的V脂肪からのタンパク質抽出物 2 0  $\mu$  g に関するウエスタンブロッティング。(C)抗m i R - 1 0 7 または抗m i R - 1 0 3 注射o b / o b マウスの脂肪からのタンパク質抽出物 2 0  $\mu$  g に関するウエスタンブロッティング。(D)抗m i R - 1 0 7 または抗m i R - 1 0 3 を注射後8日目に、5週間高脂肪餌に保持されたC 5 7 B 1 / 6 またはC a v 1 ノックアウト(C a v 1 K O)マウスの脂肪からの総タンパク質 2 0  $\mu$  g に関するウエスタンブロッティング。マウスを12時間絶食させて、1.2 U / k g の用量でインスリンで8分間刺激した。

【図9】m i R - 1 0 3 結合部位。ヒトおよびマウスにおけるC a v 1 コード配列(C D S)およびシードモチーフを伴うその3' U T R を示すグラフ。シード配列を褐色で印を付け、そしてC a v 1 3' U T R とシード配列に近位のm i R - 1 0 3との間の整合残基を赤色で印を付けてある。C a v 1 シード 2 3' U T R 領域の多重アラインメント。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0 0 4 7】

別記しない限り、本明細書中で用いられる技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当該技術分野の当業者に一般に理解されるものと同一の意味を有する。具体的な定義が提示されない限り、本明細書中で記載される分析化学、合成有機化学ならびに医学および薬学化学と関連して用いられる命名法、ならびにそれらの手法および技法は、当該技術分野で周知であり、一般に用いられる。本明細書中の用語に関して複数の意味が存在する場合には、この節の意味が採用される。標準技法は、化学合成、化学分析、薬学的調製、処方および送達、ならびに被験者の処置のために用いられ得る。ある種のこのような技法および手法は、例えば "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Edited by Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; および "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18<sup>th</sup> edition, 1990 (これらの記載内容は、任意の目的のために参照により本明細書中で援用される)に見出され得る。容認される場合、本明細書中の全開示全体を通して言及される特許出願、公開出願および出版物、G E N B A N K 配列、ウェブサイトおよびその他の出版物は全て、別記しない限り、これらの記載内容が参照により本明細書中で援用される。U R L、あるいはこのような識別子またはアドレスに言及される場合、このような識別子は変わり得るし、インターネット上の特定の情報は是認(go)を命令し得るが、しかしインターネットを検索することにより等価の情報が見出され得る、と理解される。これらの参照は、そのような情報を利用できる証拠となり、また公に普及されていることの証拠にもなる。

#### 【0 0 4 8】

本発明の組成物および方法が開示され、記載される前に、本明細書中で用いられる用語は特定の実施形態を説明するのみの目的のためであり、限定的であるよう意図されない、と理解されるべきである。明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、単数形態である「1つの(a)」、「1つの(a n)」および「その(the)」は、状況が明らかにそうでないことを示さない限り、複数指示を含む、ということに留意しなければならない。

10

20

30

40

50

## 【0049】

## 定義

「血糖値」は、被験者の血液中のグルコースの濃度を意味する。ある実施形態では、血糖値は、グルコースのミリグラム数／血液1デシリットルとして表される。ある実施形態では、血糖値はグルコースのmmol数／血液1リットルとして表される。

## 【0050】

「上昇血糖値」は、正常より高い血糖値を意味する。

## 【0051】

「空腹時血糖値」は、被験者が一定時間絶食した後の血糖値を意味する。例えば、被験者は、空腹時血糖値の測定前に少なくとも8時間絶食することがある。

10

## 【0052】

「食後血糖値」は、被験者が食事を食べた後の血糖値を意味する。ある実施形態では、食後血糖値は、被験者が食事を食べた2時間後に測定される。

## 【0053】

「全血血糖値」は、分離を施されていない全血中のグルコースの濃度を意味する。

## 【0054】

「血漿血糖値」は、血漿および赤血球分画に全血が分離された後の血漿中のグルコースの濃度を意味する。

20

## 【0055】

「インスリン感受性」は、インスリン作用に応答してグルコースを取り入れる細胞の能力を意味する。

## 【0056】

「インスリン抵抗性」は、正常量のインスリンが、脂肪、筋肉および肝臓細胞からの正常インスリン応答を生じるのに不適切である状態を意味する。脂肪細胞におけるインスリン抵抗性は、保存トリグリセリドの加水分解を生じ、これが血液中の遊離脂肪酸を上昇させる。筋肉におけるインスリン抵抗性は、筋肉細胞による血液からのグルコースの取込みを低減する。肝臓におけるインスリン抵抗性は、グルコース保存を低減し、グルコース産生の抑圧失敗を低減する。遊離脂肪酸上昇、グルコース取込み低減、およびグルコース産生上昇は全て、血糖値上昇に寄与する。インスリン抵抗性のためのインスリンおよびグルコースの高血漿レベルは、しばしば、代謝症候群および2型糖尿病を引き起こす。

30

## 【0057】

「インスリン抵抗性改善」は、正常インスリン応答を生じる細胞の能力を増大することを意味する。ある実施形態では、インスリン抵抗性は筋肉細胞において改善されて、筋肉細胞中のグルコースの取込み増大を生じる。ある実施形態では、インスリン抵抗性は肝臓細胞において改善されて、肝臓細胞中のグルコース保存増大を生じる。ある実施形態では、インスリン抵抗性は脂肪細胞において改善されて、トリグリセリドの加水分解の低減を生じ、その結果として、血中遊離脂肪酸を低減する。

## 【0058】

「代謝障害」は、身体中の1つ以上の代謝過程における変更または妨害により特性化される症状を意味する。代謝障害としては、高血糖症、糖尿病前症、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満症、糖尿病性異脂肪血症、代謝性症候群および高インスリン血症が挙げられるが、これらに限定されない。「糖尿病」または「真性糖尿病」は、身体がインスリンを產生しないかまたは適正に用いずに、異常に高い血糖値を生じる疾患を意味する。ある実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。ある実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。

40

## 【0059】

「糖尿病前症」は、被験者の血糖値が正常血糖値を有する被験者より高いが、しかし糖尿病の診断のためには低いか、十分に高くない症状を意味する。

## 【0060】

「1型糖尿病」は、膵臓のランゲルハンス島のインスリン産生ベータ細胞を損失して、インスリンの欠乏をもたらすことにより特性化される糖尿病（インスリン依存性真性糖尿

50

病またはI D D M としても既知である)を意味する。1型糖尿病は、小児または成人に影響を及ぼし得るが、典型的には10歳~16歳の間に現れる。

【0061】

「2型糖尿病」は、インスリン抵抗性および相対的インスリン欠乏により特性化される糖尿病(2型真性糖尿病としても既知であり、そして以前は、2型真性糖尿病、非インスリン依存性糖尿病(N I D D M)、肥満症関連糖尿病または成人発症性糖尿病と呼ばれていた)を意味する。

【0062】

「肥満症」は、除脂肪体重に関して過度に高量の体脂肪または脂肪組織を意味する。体脂肪(脂肪過多)の量は、身体全体の脂肪の分布および脂肪組織沈着物のサイズの両方を含む。体脂肪分布は、皮膚皺測定、胴囲対腰囲比、あるいは超音波、コンピューター断層撮影または磁気共鳴画像法のような技法により概算され得る。疾病管理予防センターによれば、30以上の体格指数(B M I)を有する個体は肥満とみなされる。

10

【0063】

「糖尿病性異脂肪血症」または「異脂肪血症を伴う2型糖尿病」は、2型糖尿病、H D L-C低減、血清トリグリセリド上昇ならびに小型高密度L D L粒子増大により特性化される症状を意味する。

【0064】

「代謝性症候群」は、代謝起源の脂質および非脂質危険因子の群成により特性化される症状を意味する。ある実施形態では、代謝性症候群は、以下の因子のうちのいずれか3つの存在により同定される:男性では102cmより大きい、女性では88cmより大きい胴囲;少なくとも150mg/dLの血清トリグリセリド;男性40mg/dL未満、女性50mg/dL未満のH D L-C;少なくとも130/85mmHgの血圧;ならびに少なくとも110mg/dLの空腹時グルコース。これらの決定因子は、臨床診察により容易に測定され得る(JAMA, 2001, 285: 2486-2497)。

20

【0065】

「脂肪症」は、肝細胞におけるトリグリセリドの過剰な蓄積により特性化される症状を意味する。

【0066】

「脂肪性肝炎」は、炎症を伴う脂肪症を意味する。

30

【0067】

「非アルコール性脂肪性肝疾患(N A F L D)」は、アルコールをほとんど乃至全く消費しない被験者における肝臓中の脂肪の蓄積により特性化される症状を意味する。ある実施形態では、N A F L Dは、インスリン抵抗性および代謝性症候群と関連する。

【0068】

「非アルコール性脂肪性肝炎(N A S H)」は、肝臓における炎症および瘢痕と組合された肝臓中の脂肪の蓄積により特性化される症状を意味する。ある実施形態では、N A S HはN A F L Dの進行悪化に起因する。

【0069】

「アルコール性脂肪性肝炎(A S H)」は、肝臓における炎症および瘢痕と組合された肝臓中の脂肪の蓄積により特性化されるアルコール誘導性症状を意味する。

40

【0070】

「糖耐性試験」または「G T T」は、如何に迅速にグルコースが血液から除去されるかを確定するために実施される試験である。典型的には、試験は、グルコースの投与と、その後の、一定期間に亘る間隔での血中グルコースレベルの測定を含む。「I P G T T」は、グルコースの腹腔内注射後に実施されるG T Tを意味する。「O G T T」は、グルコースの経口投与後に実施されるG T Tを意味する。ある実施形態では、G T Tは、糖尿病前症に関して試験するために用いられる。ある実施形態では、G T Tは、糖尿病を有する被験者を同定するために用いられる。ある実施形態では、G T Tは、糖尿病を発症する危険がある被験者を同定するために用いられる。ある実施形態では、G T Tは、インスリン抵

50

抗性を有する被験者を同定するために用いられる。

【0071】

「インスリン耐性試験（ITT）」は、低血糖値のストレスに対するホルモン応答を通してインスリン感受性を測定するために実施される試験を意味する。ある実施形態では、ITTは、糖尿病前症について試験するために用いられる。ある実施形態では、ITTは、糖尿病を有する被験者を同定するために用いられる。ある実施形態では、ITTは、糖尿病を発症する危険がある被験者を同定するために用いられる。ある実施形態では、ITTは、インスリン抵抗性を有する被験者を同定するために用いられる。

【0072】

「代謝率」は、所定期間における代謝の速度または費やされるエネルギーの量を意味する。<sup>10</sup>「基礎代謝率」は、吸収後状態（消化器系が不活性であることを意味し、これは、ヒトでは、約12時間の絶食を要する）における、中性的温和環境中での安静時の間に費やされるエネルギーの量を意味する；この状態でのエネルギーの放出は、生命維持に不可欠な器官、例えば心臓、肺、脳および神経系の残りの器官、肝臓、腎臓、生殖器、筋肉および皮膚の機能についてのみ十分である。

【0073】

「抗m i R」は、マイクロRNAと相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。ある実施形態では、抗m i Rは修飾オリゴヌクレオチドである。

【0074】

「被験者」は、処置または療法のために選択されるヒトまたは非ヒト動物を意味する。<sup>20</sup>

【0075】

「それを必要とする被験者」は、療法または処置を必要とすると同定される被験者を意味する。ある実施形態では、被験者は肝臓癌を有する。このような実施形態では、被験者は、肝臓癌の1つ以上の臨床的適応症を有するか、あるいは肝臓癌を発症する危険がある。

【0076】

「投与すること」は、被験者に薬学的作用物質または組成物を提供することを意味し、例としては医療専門家による投与および自己投与が挙げられるが、これらに限定されない。

【0077】

「非経口投与」は、注射または注入による投与を意味する。非経口投与としては、皮下投与、静脈内投与または筋肉内投与が挙げられるが、これらに限定されない。<sup>30</sup>

【0078】

「皮下投与」は、皮膚の真下の投与を意味する。

【0079】

「静脈内投与」は、静脈中への投与を意味する。

【0080】

「同時的に投与される」は、少なくとも2つの作用物質の両方の薬理学的作用が同時に被験者において明白である任意の方法で被験者にそれらをともに投与することを指す。同時投与は、両作用物質が単一薬学的組成物中で、同一剤形で、または同一投与経路により投与される、ということを必要としない。作用物質の作用時間は、同一である必要はない。作用は、時間について重複していることだけが必要で、同一範囲である必要はない。「持続時間」は、活性または事象が継続する期間を意味する。ある実施形態では、処置の持続時間は、薬学的作用物質または薬学的組成物の用量が投与される期間である。<sup>40</sup>

【0081】

「療法」は、疾患処置方法を意味する。ある実施形態では、療法としては、化学療法、外科的切除術、肝臓移植および/または化学塞栓療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

「処置」は、疾患の治癒または改善のために用いられる1つ以上の具体的手法の適用を

10

20

30

40

50

意味する。ある実施形態では、具体的手法は、1つ以上の薬学的作用物質の投与である。

【0083】

「改善」は、症状または疾患の少なくとも1つの指標の重症度を減少することを意味する。ある実施形態では、改善は、症状または疾患の1つ以上の指標の進行を遅延することまたは緩慢にすることを包含する。指標の重症度は、当業者に既知である主観的または客観的測定により決定され得る。

【0084】

「発症する危険がある」は、被験者が症状または疾患を発症する素因を有することを意味する。ある実施形態では、症状または疾患を発症する危険がある被験者は、症状または疾患の1つ以上の症候を示すが、しかしその症状または疾患を有すると診断されるに十分な数の症候を示さない。ある実施形態では、症状または疾患を発症する危険がある被験者は、症状または疾患のうちの1つ以上の症候を示すが、しかし症状または疾患を有すると診断されるのに必要とされる程度よりは少ない。

10

【0085】

「～の開始を防止する」は、疾患または症状を発症する危険がある被験者における症状または疾患の発症を防止することを意味する。ある実施形態では、疾患または症状を発症する危険がある被験者は、当該疾患または症状を既に有する被験者が受けている処置と類似の処置を受ける。

20

【0086】

「～の開始を遅延する」は、疾患または症状を発症する危険がある被験者における症状または疾患の発症を遅延することを意味する。ある実施形態では、疾患または症状を発症する危険がある被験者は、当該疾患または症状を既に有する被験者が受けている処置と類似の処置を受ける。

30

【0087】

「治療薬」は、疾患の治癒、改善または防止のために用いられる薬学的作用物質を意味する。

【0088】

「用量」は、単一投与で提供される薬学的作用物質の特定量を意味する。ある実施形態では、用量は、2つ以上のボーラス、錠剤または注射で投与され得る。例えば、皮下投与が所望されるある実施形態では、所望用量は、単一注射により容易に収容されない容積を要する。このような実施形態では、所望用量を達成するために2回以上の注射が用いられる。ある実施形態では、個体における注射部位反応を最小限にするために、用量は2回以上の注射で投与され得る。

30

【0089】

「投与単位」は、薬学的作用物質が提供される形態を意味する。ある実施形態では、投与単位は、凍結乾燥オリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。ある実施形態では、投与単位は再構成オリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。

40

【0090】

「治療的有効量」は、動物に療法的利益を提供する薬学的作用物質の量を指す。

【0091】

「薬学的組成物」は、薬学的作用物質を含む、個体に投与するのに適した物質の混合物を意味する。例えば薬学的組成物は、滅菌水溶液を含み得る。

【0092】

「薬学的作用物質」は、被験者に投与された場合に治療作用を提供する物質を意味する。

【0093】

「活性薬学的成分」は、所望の作用を提供する薬学的組成物中の物質を意味する。

【0094】

「肝機能改善」は正常限界に向けての肝機能における変化を意味する。ある実施形態では、肝機能は、被験者の血液中に見出される分子を測定することにより査定される。例え

50

ば、ある実施形態では、肝機能改善は、血中肝臓トランスアミナーゼレベルの低減により測定される。

【0095】

「許容可能な安全性プロフィール」は、臨床的に許容可能な限界内である副作用の一パターンを意味する。

【0096】

「副作用」は、所望の作用以外の処置に起因する生理学的応答を意味する。ある実施形態では、副作用としては、注射部位反応、肝機能試験異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常および筋疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような副作用は、直接または間接的に検出され得る。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベル増大は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。例えば、ビリルビン増大は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。

10

【0097】

「注射部位反応」は、個体における注射の部位での炎症または異常発赤を意味する。

【0098】

「被験者コンプライアンス」は、被験者による推奨または処方療法に対する厳守を意味する。

【0099】

「応諾する」は、被験者による推奨療法の厳守を意味する。

20

【0100】

「推奨療法」は、疾患の処置、改善または防止のために医療専門家により推奨される処置を意味する。

【0101】

「標的核酸」は、オリゴマー化合物がハイブリダイズするよう意図される核酸を意味する。

【0102】

「ターゲッティング」は、標的核酸とハイブリダイズする核酸塩基配列の設計および選択の過程を意味する。

【0103】

「～に対して標的化される」は、標的核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする核酸塩基配列を有することを意味する。

30

【0104】

「変調」は、機能または活性の摂動を意味する。ある実施形態では、変調は遺伝子発現の増大を意味する。ある実施形態では、変調は遺伝子発現の減少を意味する。

【0105】

「発現」は、遺伝子のコードされた情報が、細胞中に存在し、作動する構造に転換される任意の機能およびステップを意味する。

【0106】

「5'標的部位」は、特定オリゴヌクレオチドの最も5'の核酸塩基と相補的である標的核酸の核酸塩基を指す。

40

【0107】

「3'標的部位」は、特定オリゴヌクレオチドの最も3'の核酸塩基と相補的である標的核酸の核酸塩基を意味する。

【0108】

「領域」は、核酸内の連結ヌクレオシドの一部を意味する。ある実施形態では、a nは、標的核酸の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。例えば、ある種のこのような実施形態では、a nは、m i R N A ステム - ループ配列の一領域と相補的である。ある種のこのような実施形態では、a nはm i R N A ステム - ループ配列の一領域と完全に相補的である。

【0109】

50

「セグメント」は、一領域のうちのより小さい部分またはサブ部分を意味する。

【0110】

「核酸塩基配列」は、任意の糖、連鎖および／または核酸塩基修飾とは関係なく、5'から3'への配向での、連続核酸塩基の順序を意味する。

【0111】

「連続核酸塩基」は、核酸中で互いに直に隣接する核酸塩基を意味する。

【0112】

「核酸塩基相補性」は、水素結合を介して非共有的に対合する2つの核酸塩基の能力を意味する。

【0113】

「相補的な」は、オリゴマー化合物が、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で標的核酸とハイブリダイズし得ることを意味する。

【0114】

「完全に相補的な」は、オリゴマー化合物の各核酸塩基が、標的核酸中の各々の対応する位置で核酸塩基と対合し得ることを意味する。例えば、ある実施形態では、各核酸塩基がm i R N A ステム - ループ配列の一領域内の核酸塩基との相補性を有するオリゴマー化合物は、m i R N A ステム - ループ配列と完全に相補的である。

【0115】

「相補性パーセント」は、標的核酸の等長部分と相補的であるオリゴマー化合物の核酸塩基のパーセンテージを意味する。相補性パーセントは、標的核酸中の対応する位置での核酸塩基と相補的であるオリゴマー化合物の核酸塩基の数を、オリゴマー化合物の総長で割ることにより算定される。ある実施形態では、a n の相補性パーセントは、標的核酸と相補的である核酸塩基の数を修飾オリゴマー長で割った値を意味する。

【0116】

「同一性パーセント」は、第二核酸中の対応する位置の核酸塩基と同一である第一核酸中の核酸塩基の数を、第一核酸中の核酸塩基の総数で割った値を意味する。

【0117】

「ハイブリダイズする」は、核酸塩基相補性により生じる相補性核酸のアニーリングを意味する。

【0118】

「不整合」は、第二核酸の対応する位置の核酸塩基と対合し得ない第一核酸の核酸塩基を意味する。

【0119】

「同一の」は、同一核酸塩基配列を有することを意味する。

【0120】

「m i R - 1 0 3」は、配列番号1 ( A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U G A )で記述される核酸塩基配列を有する成熟m i R N Aを意味する。

【0121】

「m i R - 1 0 7」は、配列番号2 ( A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U C A )で記述される核酸塩基配列を有する成熟m i R N Aを意味する。「m i R - 1 0 3 - 1ステム - ループ配列」は、配列番号3 ( U A C U G C C C U C G G C U U C U U U A C A G U G C U G C C U U G U U G C A U A U G G A U C A A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U G A A A G A A C C A )で記述される核酸塩基配列を有するm i R - 1 0 3前駆体を意味する。

【0122】

「m i R - 1 0 3 - 2」は、配列番号4 ( U U G U G C U U U C A G C U U C U U U A C A G U G C U G C C U U G U A G C A U U C A G G G U C A A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U G A A A G A A C C A )で記述される核酸塩基配列を有するm i R - 1 0 3前駆体を意味する。

【0123】

10

20

30

40

50

「m i R - 1 0 7 ステム - ループ配列」は、配列番号 5 ( C U C U C U G C U U U C A G C U U C U U U A C A G U G U U G C C U U G U G G C A U G G A G U U C A A G C A G C A U U G U A C A G G G C U A U C A A A G C A C A G A ) で記述される核酸塩基配列を有するm i R - 1 0 7 前駆体を意味する。

## 【0 1 2 4】

「m i R - 1 0 3 / m i R - 1 0 7 」は、配列番号 1 または配列番号 2 の核酸塩基配列を有するマイクロRNAを意味する。

## 【0 1 2 5】

「マイクロRNA」は、18 ~ 25 核酸塩基長の非コードRNAを意味し、これは、酵素ダイサー (Dicer) による前m i RNAの切断の産物である。成熟m i RNAの例は、m i R B a s e (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) として既知のm i RNAデータベースに見出される。ある実施形態では、マイクロRNAは、「m i RNA」または「m i R」として短縮される。

10

## 【0 1 2 6】

「プレm i RNA」または「プレm i R」は、ドロシャ (Drosha) として既知の二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼによるプリm i Rの切断の産物であるヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

## 【0 1 2 7】

「ステム - ループ配列」は、ヘアピン構造を有し、成熟m i RNA配列を含有するRNAを意味する。プレm i RNA配列およびステム - ループ配列は、重複し得る。ステム - ループ配列の例は、m i R B a s e (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) として既知のm i RNAデータベースに見出される。

20

## 【0 1 2 8】

「プリm i RNA」または「プリm i R」は、二本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼドロシャに関する基質であるヘアピン構造を有する非コードRNAを意味する。

## 【0 1 2 9】

「m i RNA前駆体」は、ゲノムDNAから生じ、そして1つ以上のm i RNA配列を含む非コード構造RNAを含む転写体を意味する。例えば、ある実施形態では、m i RNA前駆体はプレm i RNAである。ある実施形態では、m i RNA前駆体はプリm i RNAである。

30

## 【0 1 3 0】

「単一シストロン転写物」は、单一m i RNA配列を含有するm i RNA前駆体を意味する。

## 【0 1 3 1】

「多シストロン転写物」は、2つ以上のm i RNA配列を含有するm i RNA前駆体を意味する。

## 【0 1 3 2】

「シード配列」は、成熟m i RNA配列の5'末端からのヌクレオチド2 ~ 6 または2 ~ 7 を意味する。

## 【0 1 3 3】

多数の連結ヌクレオシド「からなるオリゴヌクレオチドを含む化合物」は、特定数の連結ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を意味する。したがって、化合物は、付加的置換基または共役体を含み得る。別記しない限り、化合物は、オリゴヌクレオチドのもの以外に如何なる付加的ヌクレオシドも含まない。「オリゴマー化合物」は、連結モノマーサブユニットのポリマーを含む化合物を意味する。

40

## 【0 1 3 4】

「オリゴヌクレオチド」は、その各々が、互いに独立して、修飾され得るかまたは修飾され得ない連結ヌクレオシドのポリマーを意味する。

## 【0 1 3 5】

「天然ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の3' - 5' ホスホジエステル結合を

50

意味する。

【0136】

「天然糖」は、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)中に見出される糖を意味する。

【0137】

「天然核酸塩基」は、その天然形態に比して修飾されない核酸塩基を意味する。

【0138】

「ヌクレオシド間結合」は、隣接ヌクレオシド間の共有結合を意味する。

【0139】

「連結ヌクレオシド」は、共有結合により繋がれるヌクレオシドを意味する。

10

【0140】

「核酸塩基」は、別の核酸塩基と非共有的に対合し得る複素環式部分を意味する。

【0141】

「ヌクレオシド」は、糖と連結される核酸塩基を意味する。

【0142】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分と共有的に連結されるリン酸器を有するヌクレオシドを意味する。

【0143】

「修飾オリゴヌクレオチド」は、天然の末端、糖、核酸塩基および/またはヌクレオシド間結合に比して1つ以上の修飾を有するオリゴヌクレオチドを意味する。

20

【0144】

「一本鎖修飾オリゴヌクレオチド」は、相補鎖とハイブリダイズされないanを意味する。

【0145】

「ヌクレオシド間結合修飾」は、天然ヌクレオシド間結合からの任意の変化を意味する。

【0146】

「ホスホロチオエートヌクレオシド間結合」は、非架橋原子のうちの1つがイオウ原子であるヌクレオシド間の結合を意味する。

30

【0147】

「糖修飾」は、天然糖からの置換および/または任意の変化を意味する。

【0148】

「核酸塩基修飾」は、天然核酸塩基からの任意の置換および/または変化を意味する。

【0149】

「5'-メチルシトシン」は、5'位置に結合されるメチル基を用いて修飾されたシトシンを意味する。

【0150】

「2'-O-メチル糖」または「2'-OMe糖」は、2'位置にO-メチル修飾を有する糖を意味する。

40

【0151】

「2'-O-メトキシエチル糖」または「2'-MOE糖」は、2'位置にO-メトキシエチル修飾を有する糖を意味する。

【0152】

「2'-O-フルオロ」または「2'-F」は、2'位置のフルオロ修飾を有する糖を意味する。

【0153】

「二環式糖部分」は、2つの非ジェミナル環原子の架橋により修飾される糖を意味する。

【0154】

「2'-O-メトキシエチルヌクレオシド」は、2'-O-メトキシエチル糖修飾を有

50

する 2' - 修飾ヌクレオシドを意味する。

【 0 1 5 5 】

「 2' - フルオロヌクレオシド」は、 2' - フルオロ糖修飾を有する 2' - 修飾ヌクレオシドを意味する。

【 0 1 5 6 】

「 2' - O - メチルヌクレオシド」は、 2' - O - メチル糖修飾を有する 2' - 修飾ヌクレオシドを意味する。

【 0 1 5 7 】

「 二環式ヌクレオシド」は、 二環式糖部分を有する 2' - 修飾ヌクレオシドを意味する。

10

【 0 1 5 8 】

「 モチーフ」は、 オリゴヌクレオチド中の修飾および / または非修飾核酸塩基、 糖および / またはヌクレオシド間結合のパターンを意味する。

【 0 1 5 9 】

「 完全修飾オリゴヌクレオチド」は、 各核酸塩基、 各糖および / または各ヌクレオシド間結合が修飾されることを意味する。

【 0 1 6 0 】

「 均一修飾オリゴヌクレオチド」は、 各核酸塩基、 各糖および / または各ヌクレオシド間結合が修飾オリゴヌクレオチド全体を通して同一修飾を有することを意味する。

20

【 0 1 6 1 】

「 ギャップマー」は、 連結ヌクレオシドの 2 つの外部領域間に配置される連結ヌクレオシドの内部領域を有する修飾オリゴヌクレオチドを意味し、 この場合、 内部領域のヌクレオシドは各外部領域のヌクレオシドのものと異なる糖部分を含む。

【 0 1 6 2 】

「 ギャップセグメント」は、 外部領域間に配置されるギャップマーの内部領域である。

【 0 1 6 3 】

「 ウイングセグメント」は、 内部領域の 5' または 3' 末端に位置するギャップマーの外部領域である。

【 0 1 6 4 】

「 対称性ギャップマー」は、 各外部領域の各ヌクレオシドが同一糖修飾を含むことを意味する。

30

【 0 1 6 5 】

「 非対称性ギャップマー」は、 ある外部領域の各ヌクレオシドが第一糖修飾を含み、 他の外部領域の各ヌクレオシドが第二糖修飾を含むことを意味する。

【 0 1 6 6 】

「 安定化修飾」は、 ホスホジエステルヌクレオシド間結合により連結される 2' - でオキシヌクレオシドにより提供されるものに比して、 ヌクレアーゼの存在下で、 修飾オリゴヌクレオチドに安定性増強を提供するヌクレオシドに対する修飾を意味する。 例えば、 ある実施形態では、 安定化修飾は安定化ヌクレオシド修飾である。 ある実施形態では、 安定化修飾はヌクレオシド間結合修飾である。

40

【 0 1 6 7 】

「 安定化ヌクレオシド」は、 2' - でオキシヌクレオシドにより提供されるものに比して、 オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ安定性増強を提供するよう修飾されるヌクレオシドを意味する。 一実施形態では、 安定化ヌクレオシドは 2' - 修飾ヌクレオシドである。

【 0 1 6 8 】

「 安定化ヌクレオシド間結合」は、 ホスホジエステルヌクレオシド間結合により提供されるものに比してオリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ安定性改善を提供するヌクレオシド間結合を意味する。 一実施形態では、 安定化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。

【 0 1 6 9 】

50

## 大要

代謝障害は、身体の代謝機能における1つ以上の異常により特性化される。ある代謝障害は、身体が血糖を用いる方法における欠陥に関連し、異常に高い血糖値を生じる。代謝障害は、インスリン産生の欠乏、またはインスリンに対する感受性の欠乏によっても特性化され得る。代謝障害は、世界中の数百万の人々に影響を及ぼし、致命的障害であり得る。このようなものとして、代謝障害を治療し、防止し、あるいはその開始を遅延するための方法および組成物が必要とされている。

### 【0170】

本明細書中で例証されるように、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的なオリゴヌクレオチドの投与は、血糖値改善、糖新生低減、インスリン感受性増強、および血漿コレステロール低減を生じた。これらの作用は、糖尿病 / インスリン抵抗性の動物モデルで観察された。体重の低減も観察されたが、これは、体脂肪の低減によるものであった。m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 は1つの核酸塩基が異なるので、m i R - 1 0 3 の核酸塩基配列と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 の両方とハイブリダイズし得るし、それらの活性を抑制し得る。同様に、m i R - 1 0 7 の核酸塩基配列と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 の両方とハイブリダイズし、それらの活性を抑制し得る。このようなものとして、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 のいずれか一方または両方と相補的なオリゴヌクレオチドを用いて、本明細書中に記載される表現型結果を達成し得る。

10

20

### 【0171】

m i R - 1 0 3 、 m i R - 1 0 7 またはそれらの前駆体と相補的なオリゴヌクレオチドを含む化合物の投与は、1つ以上の臨床的に望ましい結果を生じ得る。このような臨床的に望ましい結果としては、血糖値低減、H b A 1 c 値低減、糖耐性改善、インスリン耐性改善および糖新生低減が挙げられるが、これらに限定されない。

30

### 【0172】

したがって、血糖値を低減し、糖新生を減少し、インスリン感受性を改善し、ならびに血漿コレステロールを減少させるための方法および組成物が、本明細書中で提供される。血糖値上昇、糖新生増大、インスリン感受性障害、ならびに血漿コレステロール増大に関連する代謝障害を治療し、防止し、またはその開始を遅延するための方法も提供される。ある実施形態では、代謝障害としては、糖尿病前症、糖尿病、例えば1型または2型糖尿病、代謝性症候群、肥満症、糖尿病性異脂肪血症、高血糖症、低血糖症および高インスリン血症が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、代謝障害を有する被験者は脂肪性肝疾患も有する。ある実施形態では、脂肪性肝疾患としては、非アルコール性脂肪性肝疾患、アルコール性脂肪性肝疾患および非アルコール性脂肪性肝炎が挙げられるが、これらに限定されない。

40

### 【0173】

ある実施形態では、被験者における血糖値の低減方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

40

### 【0174】

ある実施形態では、被験者における血糖値の低減方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

50

### 【0175】

ある実施形態では、本明細書中で提供される方法は、血糖値を測定することを包含する。血糖値は、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物の投与の前

50

および／または後に測定され得る。血糖値は、全血で測定され得るし、あるいは血漿で測定され得る。血糖値は、臨床実験室で測定され得るし、あるいは血糖計を用いて測定され得る。

#### 【0176】

ある実施形態では、血糖値は、被験者が少なくとも8時間絶食した場合に、被験者で測定される。ある実施形態では、血糖値は無作為時に測定され、測定は食物または飲料の摂取によって時間を調節されない。ある実施形態では、血糖値は食後状態で、すなわち被験者が食事を食べた後に測定される。ある実施形態では、血糖値は、被験者が食事を食べた2時間後に被験者で測定される。ある実施形態では、被験者の身体が如何に迅速にグルコースを身体から掃去するかを確定するために、被験者へのグルコースの投与後、決まった間隔で血糖値は測定される。血糖値の任意の測定が、全血で、または血漿でなされ得る。

10

#### 【0177】

ある実施形態では、被験者は血糖値上昇を示す。ある実施形態では、被験者は、血糖値上昇を示すと同定される。このような同定は、典型的には、医療専門家によりなされる。ある実施形態では、上昇血糖値は、100～125mg/dLの空腹時血糖値である。ある実施形態では、上昇血糖値は、126mg/dLより高い空腹時血糖値である。ある実施形態では、上昇血糖値は、140～199mg/dLの食後2時間血糖値である。ある実施形態では、上昇血糖値は、200mg/dL以上の食後2時間血糖値である。

20

#### 【0178】

ある実施形態では、血糖値上昇を示す被験者は糖尿病前症を有する。ある実施形態では、被験者は糖尿病前症を有すると同定される。ある種のこのような実施形態では、被験者は、100～125mg/dLの空腹時血糖値を有する。ある種のこのような実施形態では、被験者は、140～199mg/dLの食後2時間血糖値を有する。糖尿病前症の診断は、典型的には、被験者が糖尿病前症を有するか否かを確定する場合に、血糖値のほかに複数の因子を考察し得る医療専門家によりなされる。

20

#### 【0179】

ある実施形態では、血糖値上昇を示す被験者は糖尿病を有する。ある実施形態では、被験者は、被験者の血糖値によって糖尿病を有すると同定される。ある種のこのような実施形態では、被験者は126mg/dLより高い空腹時血糖値を有する。ある種のこのような実施形態では、被験者は、200mg/dL以上の食後2時間血糖値を有する。糖尿病の診断は、典型的には、被験者が糖尿病を有するか否かを確定する場合に、血糖値のほかに複数の因子を考察し得る医療専門家によりなされる。

30

#### 【0180】

ある実施形態では、本明細書中で提供される方法は、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103および／またはm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物の投与の前に血糖値をモニタリングすることを包含する。ある実施形態では、本明細書中で提供される方法は、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103および／またはm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物の投与の後に血糖値を測定することを包含する。ある実施形態では、被験者は、毎日1回以上、血糖値を測定する。

40

#### 【0181】

ある実施形態では、血糖値を低減するための方法は、米国糖尿病会議または世界保健機関のような医療機関により望ましいと確定された血糖値に被験者の血糖値を下げるなどを包含する。ある実施形態では、被験者が食事を摂る前に測定される場合、血糖値は130mg/dLより低い値に低減される。ある実施形態では、被験者が食事を摂った後に測定される場合、血糖値は180mg/dLより低い値に低減される。

#### 【0182】

ある実施形態では、投与は、少なくとも週1回行なう。ある実施形態では、投与は2週間に1回行なう。ある実施形態では、投与は3週間に1回行なう。ある実施形態では、投与は4週間に1回行なう。投与頻度は、被験者における望ましい血糖値を達成するた

50

めに医療専門家により設定され得る。投与頻度は、被験者の血糖値によって左右され得る。例えば、ある実施形態では、投与は、被験者が血糖値上昇を示す場合により頻度が高くなり得る。

#### 【0183】

HbA1cレベルの測定は、被験者の血糖値が長期間に亘って如何に良好に制御されるかを確定するために用いられ得る。HbA1cレベルは、血中の糖化ヘモグロビンの量の指標であり、被験者の血糖値が、HbA1cレベルの測定前2~3ヶ月に亘って如何に良好に管理されていたかの概算を提供し得る。高HbA1cレベルは、眼性糖尿病、心疾患、腎疾患、神経障害または卒中のような糖尿病に関連した合併症を発症する危険を被験者に課し得る。このようなものとして、ある実施形態では、被験者のHbA1cレベルは、医療専門家により普通に考察される範囲内である、というのが望ましい。ある実施形態では、6%以下のHbA1cレベルが正常である。ある実施形態では、被験者のHbA1cレベルは7%以下である、と医療専門家は推奨し得る。ある実施形態では、投与はHbA1cレベル低減を生じる。

#### 【0184】

ある実施形態では、血糖値上昇を示す被験者は、インスリン抵抗性である。インスリンの主な機能のうちの1つは、血糖値を下げるのことである。その細胞がインスリンの作用に感受性である被験者は、正常範囲に血糖値を保持するために、相対的に少量のインスリンのみを必要とする。インスリン抵抗性である被験者は、同一の血糖低下作用を得るために、より多くのインスリンを要する。インスリン抵抗性は、高インスリン血症を引き起こし得る。高インスリン血症は、高血圧、心疾患および心不全、肥満症（特に腹部肥満）、骨粗鬆症、ならびにある型の癌、例えば結腸癌、脳癌および前立腺癌と関連し得る。

#### 【0185】

インスリン抵抗性は、高インスリン血症性正常血糖クランプとして既知の手法（これは、低血糖血症を引き起こすことなくインスリンレベル増大を補償するために必要なグルコースの量を測定する）を用いて検出され得る。当該手法の間、インスリンは10~120mU/m<sup>2</sup>/分で注入される。インスリン注入を補償するために、グルコースの20%溶液が注入されて、血糖値を5~5.5mmol/Lに保持する。グルコース注入の速度は、5~10分毎に血糖値を点検することにより決定される。低用量インスリン注入は肝臓の応答を査定するためにより有用であり、一方、高用量インスリン注入は末梢（すなわち筋肉および脂肪）インスリン作用を査定するために有用である。試験の最後の30分の間のグルコース注入速度は、インスリン感受性を確定する。高レベル（7.5mg/分以上）が必要とされる場合、被験者はインスリン感受性である。非常に低レベル（4.0mg/分以下）は、被験者がインスリン作用に抵抗性である、ということを示す。4.0~7.5mg/分のレベルは、限定的でなく、糖耐性減損を示唆する。糖耐性減損は、インスリン抵抗性の早期徴候である。グルコーストレーサー、例えば<sup>3</sup>Hグルコース、<sup>6,6<sup>2</sup></sup>H-グルコースまたは<sup>1,1<sup>3</sup></sup>Cグルコースが、当該手法に用いられ得る。他の放射性形態のグルコースは、研究設定で用いられ得る。高インスリン血症期間の開始前に、3時間トレーサー注入は、グルコース産生の基本速度の決定を可能にする。クランプ手法中、血漿トレーサー濃度は、全身インスリン刺激性糖代謝、ならびに身体による糖産生（すなわち、内因性糖産生）の算定を可能にする。

#### 【0186】

ある実施形態では、被験者におけるインスリン抵抗性の改善方法であって、12~30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者はインスリン抵抗性を有する。ある実施形態では、方法は、インスリン抵抗性を有する被験者を選択することを包含する。

#### 【0187】

ある実施形態では、被験者におけるインスリン抵抗性の改善方法であって、7~12連

10

20

30

40

50

結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、血糖値上昇を示す被験者はインスリン抵抗性を有する。

【 0 1 8 8 】

ある実施形態では、糖尿病を有する被験者は、インスリン抵抗性を有する。ある実施形態では、2型糖尿病を有する被験者は、インスリン抵抗性を有する。ある実施形態では、1型糖尿病を有する被験者は、インスリン抵抗性を有する。

【 0 1 8 9 】

ある実施形態では、被験者における糖新生を低減するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 、m i R - 1 0 7 あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者は糖新生上昇を示す。ある実施形態では、被験者は、糖新生上昇を示すと同定される。ある実施形態では、投与することは糖新生の低減を生じる。ある実施形態では、ピルビン酸負荷試験を用いて、被験者における糖新生を測定する。ある実施形態では、血糖値を用いて、被験者における糖新生を測定する。ある実施形態では、糖新生率が被験者において測定される。ある実施形態では、糖新生の低減は、糖新生率の低減である。ある実施形態では、糖新生率は、投与前に被験者において測定される。ある実施形態では、糖新生率は、投与後に被験者において測定される。

10

20

30

40

【 0 1 9 0 】

ある実施形態では、被験者における血漿コレステロールの低減方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 、m i R - 1 0 7 あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者は、血漿コレステロール上昇を示す。ある実施形態では、被験者は血漿コレステロール上昇を示すと同定される。ある実施形態では、投与は、血漿コレステロールを低減する。ある実施形態では、血漿コレステロールは血漿LDLコレステロールである。ある実施形態では、血漿コレステロールは血漿VLDLコレステロールである。

【 0 1 9 1 】

ある実施形態では、被験者における血漿コレステロールの低減方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

30

【 0 1 9 2 】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の治療方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 、m i R - 1 0 7 あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者は代謝障害を有する。ある実施形態では、被験者は、代謝障害を有すると同定される。ある実施形態では、代謝障害としては、糖尿病前症、糖尿病（例えば1型または2型糖尿病）、代謝性症候群、肥満症または糖尿病性異脂肪血症、高血糖症、低血糖症および高インスリン血症が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、被験者は、1つ以上の代謝障害に関して診断される。被験者は、医療専門家に周知の医学的試験を施した後に代謝障害に関して診断され得る。

40

【 0 1 9 3 】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の治療方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

50

## 【0194】

脂肪性肝疾患は、しばしば代謝障害と関連する。ある実施形態では、代謝障害を有する被験者は脂肪性肝疾患も有する。ある実施形態では、脂肪性肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患である。ある実施形態では、脂肪性肝疾患は、アルコール性脂肪性肝疾患である。ある実施形態では、脂肪性肝疾患はアルコール性脂肪性肝炎である。

## 【0195】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の開始を防止するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者は代謝障害を発症する危険がある。ある実施形態では、被験者は、代謝障害を発症する危険があると同定される。ある実施形態では、代謝障害は、糖尿病前症、糖尿病（例えば1型または2型糖尿病）、代謝性症候群、肥満症または糖尿病性異脂肪血症、高血糖症、低血糖症、高インスリン血症、ケトアシドーシスおよびセリアック病である。

10

## 【0196】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の開始を防止するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

20

## 【0197】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の開始を遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、被験者は代謝障害を発症する危険がある。ある実施形態では、被験者は、代謝障害を発症する危険があると同定される。ある実施形態では、代謝障害としては、糖尿病前症、糖尿病（例えば1型または2型糖尿病）、代謝性症候群、肥満症または糖尿病性異脂肪血症、高血糖症、低血糖症および高インスリン血症が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0198】

ある実施形態では、被験者における代謝障害の開始を遅延するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

30

## 【0199】

ある実施形態では、被験者は1つ以上の代謝障害を有する。ある実施形態では、被験者は1つ以上の代謝障害に関して診断されている。被験者は、医療専門家に周知の医学的試験を施した後に代謝障害に関して診断され得る。

## 【0200】

処置に対する被験者の応答は、代謝障害を診断するために用いられるものと類似の試験、例えば血糖値試験、糖耐性試験およびH b A 1 c 試験により評価され得る。処置に対する応答は、処置後試験結果を処置前試験結果と比較することによっても査定され得る。

40

## 【0201】

脂肪性肝疾患は、代謝障害と関連し得る。ある実施形態では、脂肪性肝疾患は非アルコール性脂肪性肝疾患である。ある実施形態では、脂肪性肝疾患はアルコール性脂肪性肝疾患である。ある実施形態では、脂肪性肝疾患はアルコール性脂肪性肝炎である。

## 【0202】

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の治療方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

50

**【0203】**

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の治療方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

**【0204】**

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の防止方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある種のこのような実施形態では、被験者は脂肪性肝疾患を発症する危険がある。10

**【0205】**

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の防止方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

**【0206】**

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の開始を遅延するための方法であって、12～30連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103、m i R - 107あるいはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。ある種のこのような実施形態では、被験者は脂肪性肝疾患を発症する危険がある。20

**【0207】**

ある実施形態では、被験者における脂肪性肝疾患の開始を遅延するための方法であって、7～12連結ヌクレオシドからなり、m i R - 103およびm i R - 107と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を被験者に投与することを包含する方法が、本明細書中で提供される。

**【0208】**

ある実施形態では、m i R - 103および/またはm i R - 107の活性は、m i R - 103および/またはm i R - 107と相補的な核酸塩基を有する1つ以上の配列を含むマイクロRNAスponジの使用により抑制される。「マイクロRNAスponジ」は、当該マイクロRNAとの多重タンデム結合部位を含有する強いプロモーターから発現される転写物の形態でのマイクロRNAの競合的阻害剤を意味する。これらのスponジをコードするベクターが細胞中に誘導される場合、スponジは、化学的修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドと少なくとも同じくらい強力にマイクロRNA標的を抑圧する。それらは、具体的には、単一スponジが完全マイクロRNAシードファミリーを遮断するために用いられ得るよう、相補的ヘプタマーシードでマイクロRNAを抑制する。ある実施形態では、マイクロRNAシードファミリーは、m i R - 103およびm i R - 107を含む。30

**【0209】****ある種の化合物**

本明細書中で提供される化合物は、代謝障害の治療のために有用である。ある実施形態では、化合物はオリゴヌクレオチドを含む。ある種のこのような実施形態では、化合物はオリゴヌクレオチドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは修飾オリゴヌクレオチドである。40

**【0210】**

ある種のこのような実施形態では、化合物は、相補鎖とハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを含み、すなわち、化合物は二本鎖オリゴマー化合物を含む。ある実施形態では、相補鎖とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、少なくとも1つの平滑末端を形成する。ある種のこのような実施形態では、相補鎖とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、二本鎖オリゴマー化合物の各末端に平滑末端を形成する。ある50

実施形態では、オリゴヌクレオチドの末端は、相補鎖の連結ヌクレオシドの数に比して1つ以上の付加的連結ヌクレオシドを含むある実施形態では、1つ以上の付加的ヌクレオシドはオリゴヌクレオチドの5'末端にある。ある実施形態では、1つ以上の付加的ヌクレオシドはオリゴヌクレオチドの3'末端にある。ある実施形態では、1つ以上の付加的ヌクレオシドのうちの1ヌクレオシドの少なくとも1つの核酸塩基は、標的RNAと相補的である。ある実施形態では、各々の1つ以上の付加的ヌクレオシドの各核酸塩基は標的RNAと相補的である。ある実施形態では、相補鎖の一末端は、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数に比して、1つ以上の付加的連結ヌクレオシドを含む。ある実施形態では、1つ以上の付加的連結ヌクレオシドは相補鎖の3'末端にある。ある実施形態では、1つ以上の付加的連結ヌクレオシドは相補鎖の5'末端にある。ある実施形態では、2つの付加的連結ヌクレオシドは一末端に連結される。ある実施形態では、1つの付加的ヌクレオシドは一末端に連結される。

10

## 【0211】

ある実施形態では、化合物は結果的に生じるアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞取込みを増強する1つ以上の部分と共にされるオリゴヌクレオチドを含む。ある種のこの実施形態では、当該部分は、コレステロール部分または脂質部分である。共役のための付加的部として、炭水化物、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンおよび染料が挙げられる。ある実施形態では、共役基は、オリゴヌクレオチドに直接結合される。ある実施形態では、共役基は、アミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和(例えば二重または三重結合)、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(ADO)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、6-アミノヘキサン酸(AHEXまたはAHA)、置換C1~C10アルキル、置換または非置換C2~C10アルケニル、および置換または非置換C2~C10アルキニルから選択される連結部分によりオリゴヌクレオチドと結合される。ある種のこの実施形態では、置換基は、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから選択される。

20

## 【0212】

ある種のこの実施形態では、化合物は、例えばヌクレアーゼ安定性のような特性を増強するためにオリゴヌクレオチドの一方または両方の末端に結合される1つ以上の安定化基を有するオリゴヌクレオチドを含む。安定化基に含まれるのは、キャップ構造である。これらの末端修飾は、エキソヌクレアーゼ分解からオリゴヌクレオチドを保護し、細胞内での送達および/または局在化に役立ち得る。キャップは、5'末端(5'キャップ)にまたは3'末端(3'キャップ)に存在し得るし、あるいは両末端に存在し得る。キャップ構造としては、例えば逆デオキシ脱塩基キャップが挙げられる。

30

## 【0213】

適切なキャップ構造としては、4,5-メチレンヌクレオチド、1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾塩基ヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3,4-セコヌクレオチド、非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3,5-ジヒドロキシベンチルヌクレオチド、3'-3'-逆ヌクレオチド部分、3'-3'-逆脱塩基部分、3'-2'-逆ヌクレオチド部分、3'-2'-逆脱塩基部分、1,4-ブタンジオールホスフェート、3'-ホスホルアミデート、ヘキシルホスフェート、アミノヘキシルホスフェート、3'-ホスフェート、3'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、架橋メチルホスホネート部分および非架橋メチルホスホネート部分、5'-アミノ-アルキルホスホネート、1,3-ジアミノ-2-プロピルホスフェート、3-アミノプロピルホスフェート、6-アミノヘキシルホスフェート、1,2-アミノドデシルホスフェート、ヒドロキシプロピルホスフェート、5'-5

40

50

’ - 逆ヌクレオチド部分、5’ - 5’ - 逆脱塩基部分、5’ - ホスホルアミデート、5’ - ホスホロチオエート、5’ - アミノ、架橋および/または非架橋5’ - ホスホルアミデート、ホスホロチオエートおよび5’ - メルカプト部分が挙げられる。

#### 【0214】

##### ある種の核酸塩基配列

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R N A またはその前駆体と相補的である配列を有する。本明細書中に記載される成熟m i R N Aの核酸塩基配列およびそれらの対応するステム - ループ配列は、<http://microrna.sanger.ac.uk/>で見出されるm i R N A配列および注釈のオンライン検索可能データベースであるm i R B a s eで見出される配列である。m i R B a s e配列データベースにおけるエントリーは、m i R N A転写物の予測ヘアピン部分(ステム - ループ)を、成熟m i R N A配列の一および配列に関する情報とともに表す。データベース中のm i R N Aステム - ループ配列は厳密には前駆体m i R N A(プレm i R N A)ではなく、ある場合には、プレm i R N Aと、推定一次転写物からのいくつかのフランкиング配列とを含み得る。本明細書中に記載されるm i R N A核酸塩基配列は、任意のバージョンのm i R N A、例えば、m i R B a s e配列データベースのリリース10.0に記載された配列、ならびにm i R N A B a s e配列データベースの任意の初期リリースに記載された配列を包含する。配列データベースリリースは、ある種のm i R N Aの改名を生じ得る。本発明の組成物は、本明細書中に記載されるm i R N Aの任意の核酸塩基配列バージョンと相補的である修飾オリゴヌクレオチドを包含する。

10

20

30

40

50

#### 【0215】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R N A またはその前駆体と相補的である核酸塩基配列を有する。したがって、ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、その標的m i R N A または前駆体配列に関して1つ以上の不整合塩基対を有し得るし、依然としてその標的配列とハイブリダイズすることができる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R N A またはその前駆体と完全に相補的である核酸塩基配列を有する。

#### 【0216】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 - 1ステム - ループ配列、m i R - 1 0 3 - 2ステム - ループ配列およびm i R - 1 0 7ステム - ループ配列から選択されるm i R N Aステム - ループ配列の核酸塩基配列と相補的である配列を有する。

#### 【0217】

ある実施形態では、m i R N Aの核酸塩基配列が配列番号1または2から選択される場合、オリゴヌクレオチドは、m i R N Aの核酸塩基配列と相補的である配列を有する。

#### 【0218】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 - 1ステム - ループ配列(配列番号3)の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号3の核酸塩基48～70の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。

#### 【0219】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 - 2ステム - ループ配列(配列番号4)の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号4の核酸塩基48～70の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。

#### 【0220】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 7ステム - ループ配列(配列番号5)の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号5の核酸塩基50～72の領域と相補的である核酸塩基配列を有する。

#### 【0221】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 (配列番号1)の核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 U C A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号6)の核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 U C A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号6)からなる核酸塩基配列を有する。

## 【0222】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 7 (配列番号2)の核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 U G A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号7)の核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 U G A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号7)からなる核酸塩基配列を有する。

10

## 【0223】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 またはm i R - 1 0 7 の核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有し、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 間の配列類似性の結果として、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 の両方の活性を抑制し得る。m i R - 1 0 3 と完全に相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドはm i R - 1 0 7 に比して1つの整合を有するだけであり、したがって、m i R - 1 0 3 と完全に相補的なこのようなオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 の両方の活性を抑制し得る。同様に、m i R - 1 0 7 と完全に相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 に比して1つの不整合を有するだけであり、したがって、m i R - 1 0 7 と完全に相補的なこのようなオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 の両方の活性を抑制し得る。このようなものとして、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 の一方または両方と相補的なオリゴヌクレオチドは、本明細書中で提供される方法に用いられ得る。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1 (m i R - 1 0 3)の核酸塩基1~21と、または配列番号2 (m i R - 1 0 7)の核酸塩基1~21と相補的である核酸塩基配列を有する。このようなオリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 の両方と100%相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号8)を含む。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 A U A G C C C U G U A C A A U G C U G C U (配列番号8)からなる。

20

## 【0224】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 間で共有されるシード配列と相補的である核酸塩基配列を含む。本明細書中に記載される任意の長さを有するオリゴヌクレオチドは、シード整合配列を含み得る。ある種のこのような実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、7連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、8連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、9連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、10連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、11連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、12連結ヌクレオシドからなる。

30

## 【0225】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、核酸塩基配列 A U G C U G C U (配列番号10)を含み、これは、m i R - 1 0 3 (配列番号1)およびm i R - 1 0 7 (配列番号2)のヌクレオチド1~8と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列 A U G C U G C (配列番号11)を含み、これは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 のヌクレオチド1~7と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列 U G C U G C U (配列番号12)を含み、これは、m i R - 1 0 3 およびm i R - 1 0 7 のヌクレオ

40

50

チド1～7と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列A U G C U G C（配列番号13）を含み、これは、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7のヌクレオチド2～8と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列G C U G C U（配列番号14）を含み、これは、m i R - 1 0 3またはm i R - 1 0 7のヌクレオチド1～6と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列U G C U G C（配列番号15）を含み、これは、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7のヌクレオチド2～7と相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は核酸塩基配列A U G C U G（配列番号16）を含み、これは、m i R - 1 0 3およびm i R - 1 0 7のヌクレオチド3～8と相補的である。

10

## 【0226】

7、8、9、10または11連結ヌクレオシドからなり、m i R N Aのヌクレオチド2～8または2～7と相補的な修飾オリゴヌクレオチドは、m i R N Aの活性を抑制することが示されている。8連結ヌクレオシドからなり、m i R N Aのヌクレオチド2～9と相補的な修飾オリゴヌクレオチドも、m i R N Aの活性を抑制することが示されている。これらの修飾オリゴヌクレオチドのあるものは、各ヌクレオシドにL N A糖修飾を有する。このような抑制活性は、P C T公開番号W O / 2 0 0 9 / 0 4 3 3 5 3（m i R N Aシード配列をターゲッティングする修飾オリゴヌクレオチドについてのその記載内容は、参照により本明細書中で援用される）に記載されている。

20

## 【0227】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号3、4および5から選択されるm i Rステム-ループ配列の核酸塩基配列と少なくとも80%の同一性を有する核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号3、4および5から選択されるm i Rステム-ループ配列の核酸塩基配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%の同一性を、または100%の同一性を有する核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。

20

## 【0228】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1および2から選択される核酸塩基配列を有するm i R N Aの核酸塩基配列と少なくとも80%の同一性を有する核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1および2から選択されるm i R N A核酸塩基配列の核酸塩基配列と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%の同一性を、または100%の同一性を有する核酸塩基配列と相補的である核酸塩基配列を有する。

30

## 【0229】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、本明細書中に列挙されるm i R N A核酸塩基配列またはその前駆体と完全に相補的である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、成熟m i R N Aまたはその前駆体の核酸塩基配列に関して1つの不整合を有する核酸塩基配列を有する。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、m i R N Aまたはその前駆体の核酸塩基配列に関して2つの不整合を有する核酸塩基配列を有する。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドは、成熟m i R N Aまたはその前駆体の核酸塩基配列に関して2つ以下の不整合を有する核酸塩基配列を有する。ある種のこのような実施形態では、不整合核酸塩基は連続的である。ある種のこのような実施形態では、不整合核酸塩基は連続的でない。

40

## 【0230】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、それが相補的である成熟m i Rの長さと等しい多数の連結ヌクレオシドからなる。

## 【0231】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数は、それが相補的であ

50

る成熟m i RNAの長さより短い。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数は、それが相補的である成熟m i Rの長さより1つ短い。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'末端に1つ少ないヌクレオシドを有する。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、3'末端に1つ少ないヌクレオシドを有する。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドは5'末端に2つ少ないヌクレオシドを有する。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、3'末端に2つ少ないヌクレオシドを有する。m i RNAの長さより短い多数の連結ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの各核酸塩基がm i RNA中の対応する位置の各核酸塩基と相補的である場合、m i RNA配列の一部と完全に相補的である核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるとみなされる。

10

#### 【0232】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数は、それが相補的であるm i RNAの長さより大きい。ある種のこの実施形態では、付加的ヌクレオシドの核酸塩基は、m i RNAシステム・ループ配列の核酸塩基と相補的である。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数は、それが相補的であるm i RNAの長さより1つ大きい。ある種のこの実施形態では、付加的ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの3'末端にある。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシドの数は、それが相補的であるm i RNAの長さより2つ大きい。ある種のこの実施形態では、2つの付加的ヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの5'末端にある。ある種のこの実施形態では、2つの付加的ヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの3'末端にある。ある種のこの実施形態では、1つの付加的ヌクレオシドはオリゴヌクレオチドの5'末端に位置し、1つの付加的ヌクレオシドはオリゴヌクレオチドの3'末端に位置する。

20

#### 【0233】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列の一部はm i RNAの核酸塩基配列と完全に相補的であるが、しかし全部の修飾オリゴヌクレオチドがm i RNAと完全に相補的であるというわけではない。ある種のこの実施形態では、完全相補的部分を有するオリゴヌクレオチドのヌクレオシドの数は、m i RNAの長さより大きい。例えば、24連結ヌクレオシドからなるオリゴヌクレオチドは、ヌクレオシド1~23の核酸塩基が23核酸塩基長であるm i RNAの対応する部分と各々相補的である場合、m i RNAの核酸塩基配列と完全に相補的である23ヌクレオシド部分を有し、m i RNAの核酸塩基配列と約96%の全体的相補性を有する。

30

#### 【0234】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、m i RNAの核酸塩基配列の一部と完全に相補的である。例えば、22連結ヌクレオシドからなるオリゴヌクレオチドは、ヌクレオシド1~22の核酸塩基が23核酸塩基長であるm i RNAの対応する部分と各々相補的である場合、m i RNAの核酸塩基配列の22核酸塩基部分と完全に相補的である。このようなオリゴヌクレオチドは、全m i RNAの核酸塩基配列と約96%の全体的相補性を有し、そしてm i RNAの22核酸塩基部分と100%の相補性を有する。

40

#### 【0235】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、m i RNAまたはその前駆体の核酸塩基配列の一部と完全に相補的である。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドの15連結核酸塩基は、m i RNAまたはその前駆体の15連結核酸塩基と各々相補的である。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドの16連結核酸塩基は、m i RNAまたはその前駆体の16連結核酸塩基と各々相補的である。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドの17連結核酸塩基は、m i RNAまたはその前駆体の17連結核酸塩基と各々相補的である。ある種のこの実施形態では、オリゴヌクレオチドの18連結核酸塩基は、m i RNAまたはその前駆体の18連結

50

核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 19 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 19 連続核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 20 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 20 連続核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 21 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 21 連続核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 22 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 22 連続核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 23 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 23 連続核酸塩基と各々相補的である。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの 24 連続核酸塩基は、mRNA またはその前駆体の 24 連続核酸塩基と各々相補的である。

10

#### 【0236】

本明細書中で記述される核酸塩基配列（例としては実施例にならびに配列表に見出されるものが挙げられるが、これらに限定されない）は、核酸に対する任意の修飾とは無関係である。このようなものとして、配列番号で明記される核酸は、独立して、1つ以上の糖部分に対する、1つ以上のヌクレオシド間結合に対する、および / または1つ以上の核酸塩基に対する1つ以上の修飾を含み得る。

20

#### 【0237】

このファイルを伴う配列表は、必要に応じて「RNA」または「DNA」として各核酸塩基配列を同定するが、しかし実際には、それらの配列は化学的修飾の任意の組合せで修飾され得る。修飾オリゴヌクレオチドを記載するための「RNA」または「DNA」といったような呼称はある程度随意である、と当業者は容易に理解する。例えば、2' - OH 糖部分およびチミン塩基を含むヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドは、修飾糖を有するDNA（DNAの天然2' - Hに代わる2' - OH）として、または修飾塩基を有するRNA（RNAの天然ウラシルに代わるチミジン（メチル化ウラシル））として記載され得る。

20

#### 【0238】

したがって、本明細書中で提供される核酸配列（例えば配列表中のものが挙げられるが、これらに限定されない）は、天然または修飾RNAおよび / またはDNAの任意の組合せを含有する核酸（例えば、修飾核酸塩基を有する核酸が挙げられるが、これらに限定されない）を包含するよう意図される。さらなる例（限定されない）として、核酸塩基配列「ATCGATCG」を有するオリゴマー化合物は、修飾または非修飾にかかわらず、このような核酸塩基配列を有する任意のオリゴマー化合物を包含し、例としては、RNA塩基を含む化合物、例えば配列「AUCGaucg」を有するもの、ならびにいくつかのDNA塩基およびいくつかのRNA塩基、例えば「AUCGATCG」を有するもの、他の修飾塩基、例えば「AT<sup>m e</sup>CGaucg」（ここで、<sup>m e</sup>Cは5位置にメチル基を含むシトシン塩基を示す）を有するオリゴマー化合物が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0239】

##### ある種の修飾オリゴヌクレオチド

40

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、7 ~ 25 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、7 ~ 11 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12 ~ 30 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15 ~ 30 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、19 ~ 24 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、21 ~ 24 連結ヌクレオシドからなる。

#### 【0240】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 7 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 8 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 9 連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは 1

50

【 0 2 4 1 】

## ある種の修飾

ある実施形態では、本明細書中で提供されるオリゴヌクレオチドは、核酸塩基、糖および／またはヌクレオシド間結合に対する1つ以上の修飾を含み得るし、このようなものとして、修飾オリゴヌクレオチドである。例えば細胞取込み増強、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的に対する親和性増強、ならびにヌクレアーゼの存在下での安定性増大といったような望ましい特性のため、非修飾型のものより修飾型の核酸塩基、糖および／またはヌクレオシド間結合が選択され得る。

【 0 2 4 2 】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。ある種のこのような実施形態では、修飾ヌクレオシドは安定化ヌクレオシドである。安定化ヌクレオシドの一例は、糖修飾ヌクレオシドである。

〔 0 2 4 3 〕

ある実施形態では、修飾ヌクレオシドは糖修飾ヌクレオシドである。ある種のこのよう  
な実施形態では、糖修飾ヌクレオシドはさらに、天然または修飾複素環式塩基部分および  
/または天然または修飾ヌクレオシド間結合を含み得るし、糖修飾とは関係なくさらなる  
修飾を包含し得る。ある実施形態では、糖修飾ヌクレオシドは2'-修飾ヌクレオシドで  
あり、この場合、糖環は天然リボースまたは2'-デオキシ-リボースから2'炭素で修  
飾される。

【 0 2 4 4 】

ある実施形態では、2'-修飾ヌクレオシドは二環式糖部分を有する。ある実施形態では、二環式糖部分はアルファ立体配置のD糖である。ある実施形態では、二環式糖部分はベータ立体配置のD糖である。ある実施形態では、二環式糖部分はアルファ立体配置のL糖である。ある実施形態では、二環式糖部分はベータ立体配置のL糖である。

【 0 2 4 5 】

ある実施形態では、二環式糖部分は、2'、および4' - 炭素原子間に架橋基を含む。ある種のこのような実施形態では、架橋基は1~8連結ビラジカル基を含む。ある実施形態では、二環式糖部分は1~4連結ビラジカル基を含む。ある実施形態では、二環式糖部分は2または3連結ビラジカル基を含む。ある実施形態では、二環式糖部分は2連結ビラジカル基を含む。ある実施形態では、連結ビラジカル基は、-O-、-S-、-N(R<sub>1</sub>)-、-C(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)-、-C(R<sub>1</sub>)=C(R<sub>1</sub>)-、-C(R<sub>1</sub>)=N-、-C(=N R<sub>1</sub>)-、-S i(R<sub>1</sub>)(R<sub>2</sub>)-、-S(=O)-、-S(=O)-、-C

( = O ) - および - C ( = S ) - から選択され；この場合、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、各々独立して、H、ヒドロキシル、C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキル、置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルケニル、置換 C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキニル、置換 C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキニル、C<sub>5</sub> - C<sub>2,0</sub> アリール、置換 C<sub>5</sub> - C<sub>2,0</sub> アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C<sub>5</sub> - C<sub>7</sub> 脂環式ラジカル、置換 C<sub>5</sub> - C<sub>7</sub> 脂環式ラジカル、ハロゲン、置換オキシ(-O-)、アミノ、置換アミノ、アジド、カルボキシル、置換カルボキシル、アシル、置換アシル、CN、チオール、置換チオール、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub> - H)、置換スルホニル、スルホキシル(S(=O) - H)または置換スルホキシルであり；ならびに置換基は、各々独立して、ハロゲン、C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキル、置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキル、C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルケニル、置換 C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルケニル、C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキニル、置換 C<sub>2</sub> - C<sub>1,2</sub> アルキニル、アミノ、置換アミノ、アシル、置換アシル、C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アミノアルキル、C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アミノアルコキシ、置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アミノアルキル、置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,2</sub> アミノアルコキシまたは保護基である。

10

## 【0246】

いくつかの実施形態では、二環式糖部分は、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-O-CH(アルキル)-、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-N(アルキル)- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-O-CH(アルキル)-、- (CH(アルキル))- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-NH-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-N(アルキル)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-または-O-N(alkyl)- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>- (ここで、pは1、2、3、4または5であり、各アルキル基はさらに置換され得る)から選択されるピラジカル基により2'および4'炭素原子間に架橋される。ある実施形態では、pは1、2または3である。ある実施形態では、二環式糖部分は-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> であって、「ロックド核酸」または「LNA」としても既知である。

20

## 【0247】

ある実施形態では、2' - 修飾ヌクレオシドは、ハロ、アリル、アミノ、アジド、SH、CN、OCN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、O-、S- または N(R<sub>m</sub>) - アルキル；O-、S- または N(R<sub>m</sub>) - アルケニル；O-、S- または N(R<sub>m</sub>) - アルキニル；O-アルキレニル-O-アルキル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、O-アラルキル、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> SCH<sub>3</sub>、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) または O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) から選択される2' - 置換基を含み、この場合、R<sub>m</sub> および R<sub>n</sub> は、各々独立して、H、アミノ保護基あるいは置換または非置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,0</sub> アルキルである。これらの2' - 置換基はさらに、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、チオール、チオアルコキシ(S-アルキル)、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルから独立して選択される1つ以上の置換基で置換され得る。

30

## 【0248】

ある実施形態では、2' - 修飾ヌクレオシドは、F、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>、O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>、OC<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)、-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> および N-置換アセトアミド(O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)) から選択される2' - 置換基を含み、この場合、R<sub>m</sub> および R<sub>n</sub> は、各々独立して、H、アミノ保護基あるいは置換または非置換 C<sub>1</sub> - C<sub>1,0</sub> アルキルである。

40

## 【0249】

ある実施形態では、2' - 修飾ヌクレオシドは、F、OCF<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> および O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub> から選択される2' - 置換基を含む。

50

## 【0250】

ある実施形態では、2' - 修飾ヌクレオシドは、F、O - CH<sub>3</sub> およびOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> から選択される2' - 置換基を含む。

【0251】

ある実施形態では、糖修飾ヌクレオシドは、4' - チオ修飾ヌクレオシドである。ある実施形態では、糖修飾ヌクレオシドは4' - チオ-2' - 修飾ヌクレオシドである。4' - チオ修飾ヌクレオシドは、-D-リボヌクレオシドを有し、この場合、4' - Oは4' - Sに置き換えられる。4' - チオ-2' - 修飾ヌクレオシドは、2' 置換基に取り替えられる2' OHを有する4' - チオ修飾ヌクレオシドである。適切な2' - 置換基としては、2' - OCH<sub>3</sub>、2' - O - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - OCH<sub>3</sub> および2' - Fが挙げられる。

10

【0252】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは1つ以上のヌクレオシド間修飾を含む。ある種のこのような実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合はリン原子を含む。

【0253】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチド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。

20

【0254】

ある実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合はリン原子を含まない。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合は、短鎖アルキルヌクレオシド間結合により形成される。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合はシクロアルキルヌクレオシド間結合により形成される。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合は混合異種原子およびアルキルヌクレオシド間結合により形成される。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合は、混合異種原子およびシクロアルキルヌクレオシド間結合により形成される。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合は、1つ以上の短鎖異種原子性ヌクレオシド間結合により形成される。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合はアミド主鎖を有する。ある種のこのような実施形態では、ヌクレオシド間結合は、混合N、O、S およびCH<sub>2</sub>構成成分部分を有する。

30

【0255】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは1つ以上の修飾核酸塩基を含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは1つ以上の5 - メチルシトシンを含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各シトシンは5 - メチルシトシンを含む。

【0256】

ある実施形態では、修飾核酸塩基は、5 - ヒドロキシメチルシトシン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニンから選択される。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジンおよび2 - ピリドンから選択される。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンおよびN - 2、N - 6 およびO - 6 置換プリン、例えば2アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンから選択される。

40

【0257】

ある実施形態では、修飾核酸塩基は多環式複素環を含む。ある実施形態では、修飾核酸塩基は三環式複素環を含む。ある実施形態では、修飾核酸塩基はフェノキサジン誘導体を含む。ある実施形態では、フェノキサジンはさらに修飾されて、G - クランプとして既知の核酸塩基を形成し得る。

【0258】

ある種のオリゴヌクレオチドモチーフ

本発明の修飾オリゴヌクレオチドに関する適切なモチーフとしては、完全修飾、均一修飾、位置修飾およびギャップマーが挙げられるが、これらに限定されない。均一修飾モチ

50

ーフを含めた完全修飾モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドは、成熟m i RNAを標的にするよう意図され得る。代替的には、均一修飾モチーフを含めた完全修飾モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドは、プリm i RNAまたはプレm i RNAのある部位を標的にして、成熟m i RNAへのm i RNAの前駆体のプロセシングを遮断するよう意図される。完全修飾モチーフまたは均一修飾モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドは、m i RNA活性の有効な阻害剤である。

## 【0259】

ある実施形態では、完全修飾オリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドに糖修飾を含む。ある種のこの実施形態では、過半数のヌクレオシドは2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、残りのヌクレオシドは2'-フルオロヌクレオシドである。ある実施形態では、複数のヌクレオシドの各々は2'-O-メトキシエチルヌクレオシドであり、複数のヌクレオシドの各々は二環式ヌクレオシドである。ある種のこの実施形態では、完全修飾オリゴヌクレオチドはさらに、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある種のこの実施形態では、完全糖修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、完全糖修飾オリゴヌクレオチドはさらに、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。ある種のこの実施形態では、完全糖修飾オリゴヌクレオチド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

## 【0260】

ある実施形態では、完全修飾オリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシド間結合で修飾される。ある種のこの実施形態では、完全修飾オリゴヌクレオチド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。

20

## 【0261】

ある実施形態では、均一修飾オリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドで同一糖修飾を含む。ある種のこの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル糖修飾を含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'-O-メチル糖修飾を含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、2'-フルオロ糖修飾を含む。ある種のこの実施形態では、均一修飾オリゴヌクレオチドはさらに、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある種のこの実施形態では、均一糖修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、均一糖修飾オリゴヌクレオチドはさらに、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。ある種のこの実施形態では、均一糖修飾オリゴヌクレオチド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。

30

## 【0262】

ある実施形態では、均一修飾オリゴヌクレオシドは、全体にわたって同一ヌクレオシド間結合修飾を含む。ある種のこの実施形態では、均一修飾オリゴヌクレオチド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。

40

## 【0263】

ある実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチドは連結ヌクレオシドの領域を含み、この場合、各領域の各ヌクレオシドは同一糖部分を含み、そして各領域の各ヌクレオシドは隣接領域のものとは異なる糖部分を含む。

## 【0264】

ある実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも10の2'-フルオロ修飾ヌクレオシドを含む。このような位置修飾オリゴヌクレオチドは、以下の式Iにより表され得る：

5' - T<sub>1</sub> - (N<sub>u</sub><sub>1</sub> - L<sub>1</sub>)<sub>n</sub><sub>1</sub> - (N<sub>u</sub><sub>2</sub> - L<sub>2</sub>)<sub>n</sub><sub>2</sub> - N<sub>u</sub><sub>2</sub> - (L<sub>3</sub> - N<sub>u</sub><sub>3</sub>)<sub>n</sub><sub>3</sub> - T<sub>2</sub> - 3' :  
(式中、N<sub>u</sub><sub>1</sub>およびN<sub>u</sub><sub>3</sub>は、各々独立して、安定化ヌクレオシドであり；  
少なくとも10のN<sub>u</sub><sub>2</sub>は2'-フルオロヌクレオシドであり；

50

$L_1$ 、 $L_2$  および  $L_3$  は、各々独立して、ヌクレオシド間結合であり；  
 $T_1$  および  $T_2$  は、各々独立して、H、ヒドロキシル保護基、任意連結共役基またはカップリング基であり；

$n_1$  は、0～約3であり；  
 $n_2$  は、約14～約22であり；  
 $n_3$  は、0～約3であるが；

但し、 $n_1$  が0である場合には、 $T_1$  はHまたはヒドロキシル保護基ではなく、そして $n_3$  が0である場合には、 $T_2$  はHまたはヒドロキシル保護基ではない)。

#### 【0265】

ある種のこのような実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  は、各々独立して、1～約3である。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  は、各々独立して、2～約3である。ある実施形態では、 $n_1$  は1または2であり、 $n_3$  は2または3である。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  は、各々2である。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  の少なくとも一方は0より大きい。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  は、各々0より大きい。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  の一方は0より大きい。ある実施形態では、 $n_1$  および  $n_3$  の一方は1より大きい。

#### 【0266】

ある実施形態では、 $n_2$  は16～20である。ある実施形態では、 $n_2$  は17～19である。ある実施形態では、 $n_2$  は18である。ある実施形態では、 $n_2$  は19である。ある実施形態では、 $n_2$  20である。

#### 【0267】

ある実施形態では、 $Nu_2$  ヌクレオシドのうちの約2～約8は安定化ヌクレオシドである。ある実施形態では、 $Nu_2$  ヌクレオシドのうちの約2～約6は安定化ヌクレオシドである。ある実施形態では、 $Nu_2$  ヌクレオシドのうちの約3～約4は安定化ヌクレオシドである。ある実施形態では、 $Nu_2$  ヌクレオシドのうちの3つは安定化ヌクレオシドである。

#### 【0268】

ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドの各々は、2～約8の2' - フルオロヌクレオシドにより $Nu_3$  安定化ヌクレオシドから分離される。ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドの各々は、3～約8の2' - フルオロヌクレオシドにより $Nu_3$  安定化ヌクレオシドから分離される。ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドの各々は、5～約8の2' - フルオロヌクレオシドにより $Nu_3$  安定化ヌクレオシドから分離される。

#### 【0269】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは2～約6の $Nu_2$  安定化ヌクレオシドを含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは3つの $Nu_2$  安定化ヌクレオシドを含む。

#### 【0270】

ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドの各々は、1連続配列で一緒に連結される。ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドのうちの少なくとも2つは、2' - フルオロヌクレオシドのうちの少なくとも1つにより分離される。ある実施形態では、 $Nu_2$  安定化ヌクレオシドのうちの各々は、2' - フルオロヌクレオシドのうちの少なくとも1つにより分離される。

#### 【0271】

ある実施形態では、 $Nu_2$  2' - フルオロヌクレオシドのうちの少なくとも2連続配列は安定化ヌクレオシドのうちの少なくとも1つにより分離され、この場合、連続配列の各々が同数の2' - フルオロヌクレオシドを有する。

#### 【0272】

ある実施形態では、 $T_1$  および  $T_2$  は、各々独立して、Hまたはヒドロキシル保護基である。ある実施形態では、 $T_1$  および  $T_2$  のうちの少なくとも1つは4, 4' - ジメトキ

10

20

30

40

50

シトリチルである。ある実施形態では、 $T_1$  および  $T_2$  のうちの少なくとも 1 つは任意に連結される接合基である。ある実施形態では、 $T_1$  および  $T_2$  のうちの少なくとも 1 つはキャッピング基である。ある実施形態では、キャッピング基は逆デオキシ脱塩基基である。

【0273】

ある実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある種のこのような実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である。ある実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの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。ある種のこのような実施形態では、位置修飾オリゴヌクレオチド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

【0274】

ある実施形態では、位置修飾モチーフは、以下の式 I I により表され、これは、連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを表す：

$T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$  :

(式中、 $Nu_1$  および  $Nu_5$  は、独立して、2' 安定化ヌクレオシドであり；

$Nu_2$  および  $Nu_4$  は、2' - フルオロヌクレオシドであり；

$Nu_3$  は、2' - 修飾ヌクレオシドであり；

$n_1$  および  $n_5$  は、各々独立して、0 ~ 3 であり；

$n_2 + n_4$  の合計は、10 ~ 25 であり；

$n_3$  は、0 ~ 5 であり；そして

20

$T_1$  および  $T_2$  は、各々独立して、H およびヒドロキシル保護基、任意連結共役基またはキャッピング基である)。

【0275】

ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 16 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 17 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 18 である。ある実施形態では、 $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 または 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

【0276】

ある実施形態では、 $Nu_1$  および  $Nu_5$  は、独立して、2' - 修飾ヌクレオシドである。ある実施形態では、各ヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である。ある種のこのような実施形態では、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

30

【0277】

ある実施形態では、ヌクレオシドは修飾核酸塩基を含む。ある実施形態では、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドがシトシンを含む場合、シトシンは 5 - メチルシトシンである。

【0278】

ある実施形態では、 $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、そして  $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  である。

40

【0279】

ある実施形態では、 $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $T_1$  は H であり、そして  $T_2$  は H である。

【0280】

ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 13 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 14 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 15 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 16 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 17 である。ある実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 18 である。

【0281】

ある実施形態では、 $n_1$ 、 $n_2$  および  $n_3$  は、各々独立して、1 ~ 3 である。ある実施

50

形態では、 $n_1$ 、 $n_2$  および  $n_3$  は、各々独立して、2 ~ 3 である。ある実施形態では、 $n_1$  は 1 または 2 であり； $n_2$  は 2 または 3 であり；そして  $n_3$  は 1 または 2 である。ある実施形態では、 $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 または 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある実施形態では、 $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある実施形態では、 $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

#### 【0282】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、20 連結ヌクレオシドからなる。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 13 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 14 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

10

#### 【0283】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、21 連結ヌクレオシドからなる。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 14 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 15 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

#### 【0284】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、22 連結ヌクレオシドからなる。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 15 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 16 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

20

#### 【0285】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、23 連結ヌクレオシドからなる。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 16 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 17 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

#### 【0286】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、24 連結ヌクレオシドからなる。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 17 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 3 であり；そして  $n_5$  は 2 である。ある種のこののような実施形態では、 $n_2$  と  $n_4$  の合計は 18 であり； $n_1$  は 2 であり； $n_3$  は 2 であり；そして  $n_5$  は 2 である。

30

#### 【0287】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、23 連結ヌクレオシドからなる； $n_1$  は 2 であり； $n_2$  は 10 であり； $n_3$  は 3 であり； $n_4$  は 6 であり； $n_5$  は 2 であり； $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり；そして  $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  である。

#### 【0288】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、23 連結ヌクレオシドからなる； $n_1$  は 2 であり； $n_2$  は 10 であり； $n_3$  は 3 であり； $n_4$  は 6 であり； $n_5$  は 2 であり； $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり；そして  $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり；そして各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

40

#### 【0289】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、23 連結ヌクレオシドからなり；配列番号 6 の核酸塩基配列を有する； $n_1$  は 2 であり； $n_2$  は 10 であり； $n_3$  は 3 であり； $n_4$  は 6 であり； $n_5$  は 2 であり； $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2$  であり；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；核酸塩基 2 のシトシンは 5 - メチルシトシンであり；位置 14 のシトシンは 5 - メチルシトシンであり；そして核酸塩基 22 のシトシンは 5 - メチルシトシンである。

#### 【0290】

50

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、2 3 連結ヌクレオシドからなり；配列番号 7 の核酸塩基配列を有する； $n_1$  は 2 であり； $n_2$  は 1 0 であり； $n_3$  は 3 であり； $n_4$  は 6 であり； $n_5$  は 2 であり； $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_5$  は  $O - (CH_2)$  であり；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；核酸塩基 2 のシトシンは 5 - メチルシトシンであり；位置 1 4 のシトシンは 5 - メチルシトシンであり；そして核酸塩基 2 2 のシトシンは 5 - メチルシトシンである。

## 【0291】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、2 1 連結ヌクレオシドからなり；配列番号 8 の核酸塩基配列を有する； $n_1$  は 2 であり； $n_2$  は 8 であり； $n_3$  は 3 であり； $n_4$  は 6 であり； $n_5$  は 2 であり； $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり； $Nu_5$  は  $O - (CH_2)$  であり；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；核酸塩基 2 のシトシンは 5 - メチルシトシンであり；位置 1 4 のシトシンは 5 - メチルシトシンである。

## 【0292】

ある実施形態では、m i R N A と相補的で、2 1 連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドは、表 2 から選択される式 I I を有し、この場合、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。ある実施形態では、表 2 から選択される式 I I を有する修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 8 の核酸塩基配列を有する。

## 【表 2】

表 2

配列番号	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$Nu_1$	$Nu_3$	$Nu_5$	$T_1$	$T_2$
8	2	17	0	0	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	2	2	13	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	3	2	12	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	4	2	11	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	5	2	10	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	6	2	9	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	7	2	8	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	8	2	7	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	9	2	6	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	10	2	5	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	11	2	4	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	12	2	3	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	13	2	2	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	2	3	12	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	3	3	11	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	4	3	10	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	5	3	9	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	6	3	8	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	7	3	7	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	8	3	6	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	9	3	5	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	10	3	4	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	11	3	3	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	12	3	2	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H
8	2	8	6	3	2	2' - MOE	2' - MOE	2' - MOE	H	H

## 【0293】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、m i R N A と相補的で、2 2 連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドは、表 3 から選択される式 I I を有し、この場合、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。ある実施形態では、表 3 から選択される式 I I を有する修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 6、7 または 8 の 2 2 連結ヌクレオシドを含む。

【表 3】

表 3

n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	n <sub>3</sub>	n <sub>4</sub>	n <sub>5</sub>	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【0 2 9 4】

ある実施形態では、m i R N A と相補的で、2 3 連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドは、表 4 から選択される式 I I を有し、この場合、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。ある実施形態では、表 4 から選択される式 I I を有する修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 6、7 または 8 から選択される核酸塩基配列を含む。

10

20

30

40

【表4】

表4

$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$Nu_1$	$Nu_3$	$Nu_5$	$T_1$	$T_2$
2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【0295】

ある実施形態では、mRNAと相補的で、24連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドは、表5から選択される式IIを有し、この場合、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。ある実施形態では、表5から選択される式IIを有する修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号6、7または8の核酸塩基配列を含む。

10

20

30

【表5】

表5

$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$Nu_1$	$Nu_3$	$Nu_5$	$T_1$	$T_2$
2	20	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	16	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	15	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	16	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	15	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	6	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【0296】

ある実施形態では、mRNAと相補的で、2'連結ヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドは、表6から選択される式IIを有し、この場合、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。ある実施形態では、表6から選択される式IIを有する修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号6、7または8の核酸塩基配列を含む。

10

20

30

40

## 【表6】

表6

$n_1$	$n_2$	$n_3$	$n_4$	$n_5$	$Nu_1$	$Nu_3$	$Nu_5$	$T_1$	$T_2$
2	21	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	17	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	2	16	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	15	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	16	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	17	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	16	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	3	3	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	4	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	5	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	6	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	7	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	9	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	10	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	11	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	12	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	13	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	14	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	15	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	16	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	8	6	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40

## 【0297】

ある実施形態では、化合物は次式 I I I で表される：

## 【化1】



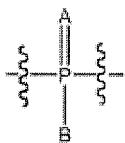
## 【0298】

ある実施形態では、Qは2'-O-メチル修飾ヌクレオシドである。ある実施形態では、xはホスホロチオエートである。ある実施形態では、yはホスホジエステルである。ある実施形態では、z1、z2、z3およびz4は、各々独立して、ホスホロチオエートまたはホスホジエステルである。ある実施形態では、nは6～17である。ある実施形態では、Lはコレステロールである。ある実施形態では、nは12～17である。

## 【0299】

ある実施形態では、xは、

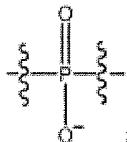
## 【化2】



(式中、AおよびBの一方はSであり、他方はOである)。

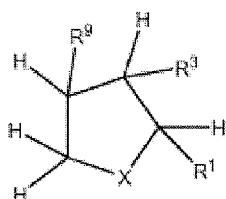
であり、yは、

## 【化3】



であり、z1、z2、z3およびz4は、各々独立して、xまたはyであり；nは6～17であり、Lは、

## 【化4】



10

20

30

(式中、Xは、N(CO)R<sup>7</sup>またはNR<sup>7</sup>であり；

R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>9</sup>は、各々独立して、H、OHまたはCH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>であるが、但し、R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>9</sup>のうちの少なくとも1つはOHであり、そしてR<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>9</sup>のうちの少なくとも1つはCH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>であり；

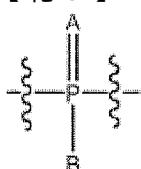
R<sup>7</sup>は、R<sup>d</sup>またはC<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>アルキル(NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>またはNHCOOR<sup>d</sup>で置換される)であり；

R<sup>c</sup>は、HまたはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキルであり；

R<sup>d</sup>は、炭水化物ラジカルであるか；またはステロイドラジカルであって、これは、任意に、少なくとも1つの炭水化物ラジカルにつなぎとめられ；そして

R<sup>b</sup>は、

## 【化5】



(式中、AおよびBの一方はSであり、他方はOである)である。

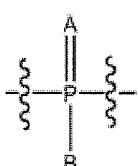
である。

## 【0300】

40

ある実施形態では、R<sup>d</sup>はコレステロールである。ある実施形態では、z<sup>1</sup>、z<sup>2</sup>、z<sup>3</sup>およびz<sup>4</sup>は、

## 【化6】



(式中、AおよびBの一方はSであり、他方はOである)である。

## 【0301】

50

ある実施形態では、R<sup>1</sup>は-CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>である。ある実施形態では、R<sup>9</sup>はOHである。ある実施形態では、R<sup>1</sup>およびR<sup>9</sup>はトランスである。ある実施形態では、R<sup>9</sup>はOHである。ある実施形態では、R<sup>1</sup>およびR<sup>3</sup>はトランスである。ある実施形態では、R<sup>3</sup>は-CH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>である。ある実施形態では、R<sup>1</sup>はOHである。ある実施形態では、R<sup>1</sup>およびR<sup>3</sup>はトランスである。ある実施形態では、R<sup>9</sup>はOHである。ある実施形態では、R<sup>3</sup>およびR<sup>9</sup>はトランスである。ある実施形態では、R<sup>9</sup>はCH<sub>2</sub>OR<sup>b</sup>である。ある実施形態では、R<sup>1</sup>はOHである。ある実施形態では、R<sup>1</sup>およびR<sup>9</sup>はトランスである。ある実施形態では、XはNC(O)R<sup>7</sup>である。ある実施形態では、R<sup>7</sup>は-CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)R<sup>d</sup>である。

## 【0302】

10

ある実施形態では、位置修飾モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドはLNAを含む。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、以下に列挙するモチーフの1つから選択されるモチーフを有する（ここで、L=LNAヌクレオシド、d=DNAヌクレオシド、M=2'-MOEヌクレオシドおよびF=2'-フルオロヌクレオシド）。ある実施形態では、カッコ内のヌクレオシドは、修飾ヌクレオチド中に任意に含まれる。言い換えれば、モチーフは、カッコ内の多数のヌクレオシドがどのように含まれるかによって、種々の長さの修飾オリゴヌクレオチドを包含する。

L d L d d L L d d L d L d L L  
 L d L d L L L d d L L L d L L  
 L M L M M L L M M L M L M L L  
 L M L M L L L M M L L L M L L  
 L F L F F L L F F L F L F L L  
 L F L F L L L F F L L L F L L  
 L d d L d d L d d L (d) (d) (L) (d) (d) (L) (d)  
 d L d d L d d L d d (L) (d) (d) (L) (d) (d) (L)  
 d d L d d L d d L d (d) (L) (d) (d) (L) (d) (d)  
 L M M L M M L M M L (M) (M) (L) (M) (M) (L) (M)  
 M L M M L M M L M M (L) (M) (M) (L) (M) (M) (L)  
 M M L M M L M M L M (M) (L) (M) (M) (L) (M) (M)  
 L F F L F F L F F L (F) (F) (L) (F) (F) (L) (F)  
 F L F F L F F L F F (L) (F) (F) (L) (F) (F) (L)  
 F F L F F L F F L F (F) (L) (F) (F) (L) (F) (F)  
 d L d L d L d L d L (d) (L) (d) (L) (d) (L) (d)  
 L d L d L d L d L (d) (L) (d) (L) (d) (L) (d)  
 M L M L M L M L M L (M) (L) (M) (L) (M) (L) (M)  
 L M L M L M L M L (M) (L) (M) (L) (M) (L) (M) (L)  
 F L F L F L F L F L (F) (L) (F) (L) (F) (L) (F)  
 L F L F L F L F L (F) (L) (F) (L) (F) (L) (F) (L)

20

30

## 【0303】

40

付加的モチーフは、PCT公開番号WO/2007/112754（オリゴヌクレオチド修飾およびオリゴヌクレオチド修飾のパターンについての説明に関するその記載内容は、参照により本明細書中で援用される）に開示されている。

## 【0304】

50

ギャップマー モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドは、連結2'-デオキシヌクレオチドからなる内部領域、ならびに連結2'-修飾ヌクレオシドからなる外部領域を有し得る。このようなギャップマーは、mRNA前駆体のRNアーゼH切断を引き出すよう設計され得る。内部2'-デオキシヌクレオシド領域は、RNアーゼHのための基質として役立ち、修飾オリゴヌクレオチドが標的にされるmRNA前駆体の切断を可能にする。ある実施形態では、各外部領域の各ヌクレオシドは、同一2'-修飾ヌクレオシドを含む。ある実施形態では、一方の外部領域は第一2'-修飾ヌクレオシドで均一に構成され

、他方の外部領域は第二2' - 修飾ヌクレオシドで均一に構成される。

【0305】

ギャップマー モチーフを有する修飾オリゴヌクレオチドは、各ヌクレオシドに糖修飾を有し得る。ある実施形態では、内部領域は、第一2' - 修飾ヌクレオシドで均一に構成され、外部領域の各々は第二2' - 修飾ヌクレオシドで均一に構成される。ある種のこのような実施形態では、内部領域は2' - フルオロヌクレオシドで均一に構成され、各外部領域は2' - O - メトキシエチルヌクレオシドで均一に構成される。

【0306】

ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は連結2' - O - メトキシエチルヌクレオシドからなる。ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は連結2' - O - メチルヌクレオシドからなる。ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は2' - フルオロヌクレオシドからなる。ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は連結二環式ヌクレオシドからなる。

10

【0307】

ある実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メトキシエチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは異なる2' - 修飾を含む。ある種のこのような実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メトキシエチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メチルヌクレオシドを含む。ある種のこのような実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メトキシエチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - フルオロヌクレオシドを含む。ある種のこのような実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - フルオロヌクレオシドを含む。ある種のこのような実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メトキシエチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは二環式ヌクレオシドを含む。ある種のこのような実施形態では、ギャップマーの一方の外部領域の各ヌクレオシドは2' - O - メチルヌクレオシドを含み、他方の外部領域の各ヌクレオシドは二環式ヌクレオシドを含む。

20

【0308】

ある実施形態では、一方の外部領域のヌクレオシドは2つ以上の糖修飾を含む。ある実施形態では、各外部領域のヌクレオシドは2つ以上の糖修飾を含む。ある実施形態では、外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - O - メトキシエチル糖を含み、同一外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - フルオロ糖を含む。ある実施形態では、外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - O - メトキシエチル糖を含み、同一外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - O - メチル糖を含み、同一外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - フルオロ糖を含む。ある実施形態では、外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - O - メチル糖を含み、同一外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - フルオロ糖を含む。ある実施形態では、外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは2' - フルオロ糖を含み、同一外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは二環式糖部分を含む。ある実施形態では、外部領域の少なくとも1つのヌクレオシドは二環式糖部分を含む。

30

【0309】

ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は同数の連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、ギャップマーの各外部領域は、他の外部領域のものとは異なる多数の連結ヌクレオシドからなる。

40

【0310】

ある実施形態では、外部領域は、独立して、1~6ヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は1つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は2つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は3つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は4つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は5つのヌ

50

クレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は6つのヌクレオシドを含む。ある実施形態では、外部領域は17～28連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は17～21連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は17連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は18連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は19連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は20連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は21連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は22連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は23連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は24連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は25連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は26連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は27連結ヌクレオシドからなる。ある実施形態では、内部領域は28連結ヌクレオシドからなる。

10

#### 【0311】

##### ある種の付加的療法

代謝障害のための治療は、1つより多くの療法を含み得る。このようなものとして、ある実施形態では、本発明は、代謝障害の治療方法であって、それを必要とする被験者に、m i R - 103および/またはm i R - 107またはその前駆体と相補的なオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを包含し、そしてさらに少なくとも1つの付加的薬学的作用物質を投与することを包含する方法を提供する。

20

#### 【0312】

##### ある実施形態では、付加的薬学的作用物質は血糖降下薬である。

#### 【0313】

ある実施形態では、血糖降下薬は、P P A R アゴニスト（ガンマ、デュアルまたはパン）、ジペプチジルペプチダーゼ（I V）阻害薬、G L P - I 類似体、インスリンまたはインスリン類似体、インスリン分泌促進物質、S G L T 2 阻害薬、ヒトアミリン類似体、ビグアニド、アルファ - グルコシダーゼ阻害薬、メグリチニド、チアゾリジンジオンまたはスルホニル尿素である。

30

#### 【0314】

ある実施形態では、血糖降下薬はG L P - I 類似体である。ある実施形態では、G L P - I 類似体はエキセンジン - 4またはリラグルチドである。

#### 【0315】

ある実施形態では、血糖降下薬はスルホニル尿素である。ある実施形態では、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、グリビジド、グリブリドまたはグリクラジドである。

#### 【0316】

ある実施形態では、血糖降下薬はビグアニドである。ある実施形態では、ビ津兄度はメトフォルミンである。ある実施形態では、メトフォ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て、乳酸アシドーシス増大を伴わずに、血糖値は低減される。

40

#### 【0317】

ある実施形態では、血糖降下薬はメグリチニドである。ある実施形態では、メグリチニドはナテグリニドまたはレパグリニドである。

#### 【0318】

ある実施形態では、血糖降下薬はチアゾリジンジオンである。ある実施形態では、チアゾリジンジオンは、ピオグリタゾン、ロシグリタゾンまたはトログリタゾンである。ある実施形態では、ロシグリタゾン処置単独で観察されるよりも大きい体重増加を伴わずに、血糖値は低減される。

50

#### 【0319】

ある実施形態では、血糖降下薬はアルファ - グルコシダーゼ阻害薬である。ある実施形態では、アルファ - グルコシダーゼ阻害薬はアカルボースまたはミグリトールである。

#### 【0320】

ある実施形態では、血糖降下薬は、P T P 1 B 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である。

【0321】

ある実施形態では、付加的療法は抗肥満薬である。ある実施形態では、抗肥満薬はオルリストット、シブトラミンまたはリモナバントである。

【0322】

ある実施形態では、付加的療法は治療的ライフスタイルの変化である。ある実施形態では、治療的ライフスタイル変化は、運動レジメンおよび／または食餌療法を包含する。

【0323】

ある実施形態では、付加的薬学的作用物質の用量は、付加的薬学的作用物質が単独で投与された場合に施される用量と同一である。

【0324】

ある実施形態では、付加的薬学的作用物質の用量は、付加的薬学的作用物質が単独で投与された場合に施される用量より低い。ある実施形態では、付加的薬学的作用物質の用量は、付加的薬学的作用物質が単独で投与された場合に施される用量より高い。

【0325】

付加的薬学的作用物質のさらなる例としては、コルチコステロイド、例えばプレドニゾン（これに限定されない）；免疫グロブリン、例えば静脈内免疫グロブリン（I V I g）（これに限定されない）；鎮痛薬（例えばアセトアミノフェン）；抗炎症薬、例えば非ステロイド系抗炎症薬（例えば、イブプロフェン、C O X - I 阻害薬およびC O X - 2 阻害薬）（これらに限定されない）；サリチル酸誘導体；抗生物質；抗ウイルス薬；抗真菌薬；抗糖尿病薬（例えば、ビグアニド、グルコシダーゼ阻害薬、インスリン、スルホニル尿素およびチアゾリデンジオン）；アドレナリン作動性修飾因子；利尿薬；ホルモン（例えば、同化ステロイド、アンドロゲン、エストロゲン、カルシトニン、プロゲスチン、ソマトスタンおよび甲状腺ホルモン）；免疫調節薬；筋弛緩薬；抗ヒスタミン薬；骨粗鬆症薬（例えば、ビホスホネート、カルシトニンおよびエストロゲン；プロスタグラジン、抗新生物薬；精神治療薬；鎮静薬；有毒オーケまたはドクウルシ製品；抗体；ならびにワクチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0326】

ある実施形態では、付加的療法は、脂質低下療法である。ある種のこのような実施形態では、脂質低下療法は、治療的ライフスタイル変化である。ある種のこのような実施形態では、脂質低下療法はL D Lアフェレーシスである。

【0327】

ある種の薬学的組成物

オリゴヌクレオチドを含む薬学的組成物が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、このような薬学的組成物は、代謝障害ならびに関連症状の治療のために用いられる。ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、1 2 ~ 3 0 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 、m i R - 1 0 7 またはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む化合物を含む。ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、1 2 ~ 3 0 連結ヌクレオシドからなり、m i R - 1 0 3 、m i R - 1 0 7 またはその前駆体と相補的な核酸塩基配列を有するオリゴヌクレオチドからなる化合物を含む。

【0328】

適切な投与経路としては、経口、直腸、経粘膜、腸、経腸、局所、坐薬、吸入による、くも膜下腔内、脳室内、腹腔内、鼻内、眼内、腫瘍内および非経口（例えば、静脈内、筋肉内、髄内および皮下）が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、薬学的くも膜下腔内薬は、全身曝露というよりむしろ局所的曝露を達成するために投与される。例えば、薬学的組成物は、所望作用の領域に（例えば肝臓中に）直接注射され得る。

【0329】

ある実施形態では、薬学的組成物は、投与単位（例えば、錠剤、カプセル、ボーラス剤

10

20

30

40

50

等)の形態で投与される。ある実施形態では、このような薬学的組成物は、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg、60 mg、65 mg、70 mg、75 mg、80 mg、85 mg、90 mg、95 mg、100 mg、105 mg、110 mg、115 mg、120 mg、125 mg、130 mg、135 mg、140 mg、145 mg、150 mg、155 mg、160 mg、165 mg、170 mg、175 mg、180 mg、185 mg、190 mg、195 mg、200 mg、205 mg、210 mg、215 mg、220 mg、225 mg、230 mg、235 mg、240 mg、245 mg、250 mg、255 mg、260 mg、265 mg、270 mg、270 mg、280 mg、285 mg、290 mg、295 mg、300 mg、305 mg、310 mg、315 mg、320 mg、325 mg、330 mg、335 mg、340 mg、345 mg、350 mg、355 mg、360 mg、365 mg、370 mg、375 mg、380 mg、385 mg、390 mg、395 mg、400 mg、405 mg、410 mg、415 mg、420 mg、425 mg、430 mg、435 mg、440 mg、445 mg、450 mg、455 mg、460 mg、465 mg、470 mg、475 mg、480 mg、485 mg、490 mg、495 mg、500 mg、505 mg、510 mg、515 mg、520 mg、525 mg、530 mg、535 mg、540 mg、545 mg、550 mg、555 mg、560 mg、565 mg、570 mg、575 mg、580 mg、585 mg、590 mg、595 mg、600 mg、605 mg、610 mg、615 mg、620 mg、625 mg、630 mg、635 mg、640 mg、645 mg、650 mg、655 mg、660 mg、665 mg、670 mg、675 mg、680 mg、685 mg、690 mg、695 mg、700 mg、705 mg、710 mg、715 mg、720 mg、725 mg、730 mg、735 mg、740 mg、745 mg、750 mg、755 mg、760 mg、765 mg、770 mg、775 mg、780 mg、785 mg、790 mg、795 mg および 800 mg から選択される用量でオリゴヌクレオチドを含む。ある種のこのような実施形態では、薬学的組成物は、25 mg、50 mg、75 mg、100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg および 800 mg から選択される修飾オリゴヌクレオチドの用量を含む。

### 【0330】

ある実施形態では、薬学的作用物質は、適切な希釈剤、例えば注射用の滅菌水または注射用の滅菌生理食塩水で再構成される滅菌凍結乾燥化修飾オリゴヌクレオチドである。再構成物質は、生理食塩水中に希釈後に、皮下注射として、または静脈内注入として投与される。凍結乾燥薬剤物質は、注射用に水中で、または注射用に生理食塩水中で調製され、調製中に酸または塩基で pH 7.0 ~ 9.0 に調整され、次いで凍結乾燥されたオリゴヌクレオチドからなる。凍結乾燥修飾オリゴヌクレオチドは、25 ~ 800 mg のオリゴヌクレオチドであり得る。これは、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775 および 800 mg の修飾凍結乾燥オリゴヌクレオチドを包含する、と理解される。凍結乾燥薬剤物質は、プロモブチルゴム栓で栓をされて、アルミニウム製フリップ・オフ(登録商標)オーバーシールで密閉される 2 mL タイプ I 透明ガラスバイアル(硫酸アンモニウム処理)中に包装され得る。

### 【0331】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、それらの技術分野で確立された使用量レベルで、薬学的組成物中に慣用的に見出される他の付加物構成成分を付加的に含有し得る。したがって、例えば氏瀬は、付加的な相溶性の薬学的に許容可能な物質

10

20

30

40

50

、例えば鎮痙薬、収斂剤、局所麻酔薬または抗炎症薬を含有し得るし、あるいは本発明の組成物の種々の剤形を物理的に処方するのに有用な付加的物質、例えば染料、風味剤、防腐剤、酸化防止剤、不透明剤、濃化剤および安定化剤を含有し得る。しかしながら、このような物質は、付加された場合、本発明の組成物の構成成分の生物学的活性を過度に妨害すべきでない。処方物は、滅菌され、所望により、処方物のオリゴヌクレオチド（単数または複数）と有害に相互作用しない補助剤、例えば滑剤、防腐剤、安定化剤、潤滑剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、緩衝剤、着色剤、風味および/または芳香性物質等と混合され得る。

### 【0332】

脂質部分は、種々の方法で核酸療法に用いられてきた。一方法において、核酸は、予備成形リポソーム、あるいは陽イオン性脂質および中性脂質の混合物から作られるリポプレックス中に導入される。別の方法では、モノまたはポリ陽イオン性脂質とのDNA複合体が、中性脂質の存在を伴わずに形成される。ある実施形態では、脂質部分は、特定の細胞または組織への薬学的作用物質の分布を増大するために選択される。ある実施形態では、脂質部分は、脂肪組織への薬学的作用物質の分布を増大するために選択される。ある実施形態では、脂質部分は、筋肉組織への薬学的作用物質の分布を増大するために選択される。

10

### 【0333】

ある実施形態では、INTRALIPIDは、オリゴヌクレオチドを含む薬学的組成物を調製するために用いられる。intralipidは、静脈内投与のために調製される脂肪乳濁液である。それは、10%のダイズ油、1.2%の卵黄リン脂質、2.25%のグリセリン、および注射用の水から作られる。さらに、水酸化ナトリウムが付加されて、最終生成物のpH範囲が6~8.9となるよう、pHを調整する。

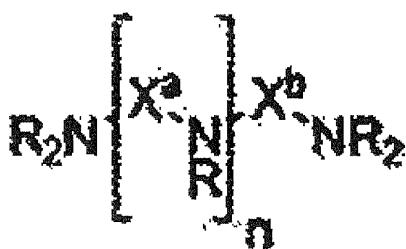
20

### 【0334】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、ポリアミン化合物または核酸と複合される脂質部分を含む。ある実施形態では、このような調製物は、式(I)により限定される構造を有する1つ以上の化合物またはその製薬上許容可能な塩を各々独立して含む。

### 【化7】

30



式(I)

(式中、X<sup>a</sup>およびX<sup>b</sup>は、各々の出現に関して、各々独立して、C<sub>1</sub>~<sub>6</sub>アルキレンであり；nは、0、1、2、3、4または5であり；Rは、各々独立して、Hであり（ここで、調製における式(I)の化合物の分子の少なくとも約80%を置いてR部分の少なくともn+2は水素でない）；mは、1、2、3または4であり；Yは、O、NR<sup>2</sup>またはSであり；R<sup>1</sup>は、アルキル、アルケニルまたはアルキニルであり；その各々は1つ以上の置換基で任意に置換されるが；但し、n=0である場合には、R部分の少なくともn+3はHでない。このような調製物は、PCT公開WO/2008/042973（脂質調製の開示に関する記載内容は、参照により本明細書中で援用される）に記載されている。ある種の付加的調製物は、Akinc et al.、Nature Biotechnology 26, 561-569 (01 May 2008)（脂質調製の開示に関する記載内容は、参照により本明細書中で援用される）に記載されている。

40

50

## 【0335】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、1つ以上の修飾オリゴヌクレオチドおよび1つ以上の賦形剤を含む。ある種のこの実施形態では、賦形剤は、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミラーゼ、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロースおよびポリビニルピロリドンから選択される。

## 【0336】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、既知の技法、例えば混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、水籠、乳化、カプセル封入、エントラッピングまたは錠剤成形法（これらに限定されない）を用いて調製される。

10

## 【0337】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、液体（例えば、懸濁液、エリキシルおよび/または溶液）である。ある種のこの実施形態では、液体薬学的組成物は、当該技術分野で既知の成分、例えば水、グリコール、油、アルコール、風味剤、防腐剤および着色剤（これらに限定されない）を用いて調製される。

## 【0338】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、固体（例えば、粉末、錠剤および/またはカプセル）である。ある種のこの実施形態では、1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む固体薬学的組成物は、当該技術分野で既知の成分、例えばデンプン、糖、希釀剤、顆粒化剤、滑剤、結合剤および崩壊剤（これらに限定されない）を用いて調製される。

20

## 【0339】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、デポー製剤として処方される。ある種のこのデポー製剤は、典型的には、非デポー製剤より長く作用する。ある実施形態では、このような製剤は、移植により（例えば皮下にまたは筋肉内に）、または筋肉内注射により投与される。ある実施形態では、デポー製剤は、適切な高分子または疎水性物質（例えば、許容可能な油中の乳濁液）、あるいはイオン交換樹脂を用いて、あるいは難溶性誘導体として、例えば難溶性塩として、調製される。

## 【0340】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、送達系を含む。送達系の例としては、リポソームおよび乳濁液が挙げられるが、これらに限定されない。ある種の送達系は、ある種の薬学的組成物、例えば疎水性化合物を含むものを調製するために有用である。ある実施形態では、ある種の有機溶媒、例えばジメチルスルホキシドが用いられる。

30

## 【0341】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、特定の組織または細胞型に本発明の1つ以上の薬学的作用物質を送達するよう意図された1つ以上の組織特異的送達分子を含む。例えば、ある実施形態では、薬学的組成物は、組織特異的抗体で被覆されたリポソームを包含する。

## 【0342】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、共溶媒系を含む。ある種のこの共溶媒系は、例えば、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性有機ポリマーおよび水性相を含む。ある実施形態では、このような共溶媒系は疎水性化合物のために用いられる。このような共溶媒系の非限定例はV P D共溶媒系であり、これは、3% w / v ベンジルアルコール、8% w / v の非極性界面活性剤ポリソルベート80（商標）および6.5% w / v ポリエチレングリコール300を含む無水エタノールの溶液である。このような共溶媒系の割合は、それらの溶解性および毒性特質を有意に変えることなく、かなり変更され得る。さらに、共溶媒構成成分の同一性が変更され得る；例えば、他の界面活性剤がポリソルベート80（商標）の代わりに用いられ得る；ポリエチレングリコールの分画サイズが変更され得る；他の生体適合性ポリマー、例えばポリビニルピロリ

40

50

ドンが、ポリエチレングリコールに取って代わり得る；そして、他の糖または多糖がデキストロースを置換し得る。

【0343】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、徐放系を含む。このような徐放系の非限定例は、固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスである。ある実施形態では、徐放系は、それらの化学的性質によって、数時間、数日間、数週間または数ヶ月に亘って薬学的作用物質を放出し得る。

【0344】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、経口投与のために調製される。ある種のこのような実施形態では、薬学的組成物は、オリゴヌクレオチドを含む1つ以上の化合物を、1つ以上の製薬上許容可能な担体と組合せることにより処方される。ある種のこのような担体は、被験者が経口摂取するための錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として、処方物を処方させる。ある実施形態では、経口使用のための薬学的組成物は、オリゴヌクレオチドおよび1つ以上の固体賦形剤を混合することにより得られる。適切な賦形剤としては、充填剤、例えば糖、例えばラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトール；セルロース調製物、例えばトウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよび/またはポリビニルピロリドン(PVP)が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、このような混合物は任意に粉碎され、補助剤が任意に付加される。ある実施形態では、薬学的組成物は、錠剤または糖衣錠コアを得るために形成される。ある実施形態では、崩壊剤(例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天あるいはアルギン酸またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウム)が付加される。

10

20

30

40

【0345】

ある実施形態では、糖衣錠コアはコーティングとともに提供される。ある種のこのような実施形態では、濃縮糖溶液が用いられ得るが、これは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび/または二酸化チタン、ラッカー溶液、ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を任意に含有し得る。染料または色素が、錠剤または糖衣錠コーティングに付加され得る。

【0346】

ある実施形態では、経口投与のための薬学的組成物は、ゼラチン製のプッシュ・フィットカプセルである。ある種のこのようなプッシュ・フィットカプセルは、1つ以上の充填剤、例えばラクトース、結合剤、例えばデンプン、および/または滑剤、例えばタルクまたはステアリン酸マグネシウム、ならびに任意に安定化剤と混合して、本発明の1つ以上の薬学的作用物質を含む。ある実施形態では、経口投与用の薬学的組成物は、ゼラチンおよび可塑剤、例えばグリセロールまたはソルビトールから作られる軟質密閉カプセルである。ある軟質カプセルでは、本発明の1つ以上の薬学的作用物質が、適切な液体、例えば脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール中に溶解されるかまたは懸濁される。さらに、安定化剤が付加され得る。

【0347】

ある実施形態では、薬学的組成物は頬投与のために調製される。ある種のこのような薬学的組成物は、慣用的方法で処方される錠剤またはロゼンジである。

【0348】

ある実施形態では、薬学的組成物は、注射(例えば、静脈内、皮下、筋肉内等)による投与のために調製される。ある種のこのような実施形態では、薬学的組成物は担体を含み、水溶液中、例えば水または生理学的適合性緩衝液、例えばハンクス溶液、リンガー溶液または生理学的食塩緩衝液中で処方される。ある実施形態では、他の成分(例えば、溶解性を手助けするかまたは防腐剤として役立つ成分)が含まれる。ある実施形態では、適切な液体担体、懸濁剤等を用いて、注射用懸濁液が調製される。注射用のある種の薬学的組

50

成物は、単位剤形で、例えばアンプルで、または複数回用量容器中に存在する。注射用のある薬学的組成物は、油状または水性ビヒクリル中の懸濁液、溶液または乳濁液であり、処方剤、例えば懸濁安定化剤および/または分散剤を含有し得る。注射用の薬学的組成物中に用いるのに適したある種の溶媒としては、親油性溶媒および脂肪油、例えばゴマ油、合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチルまたはトリグリセリド、ならびにリポソームが挙げられるが、これらに限定されない。水性注射用懸濁液は、懸濁液の粘性を増大する物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランを含有し得る。任意に、このような懸濁液は、適切な安定化剤、または高濃縮溶液の調製を可能にするために薬学的作用物質の溶解性を増大する作用物質も含有し得る。

## 【0349】

10

ある実施形態では、薬学的組成物は、経粘膜投与のために調製される。ある種のこのような実施形態では、透過されるべきバリアに適した浸透剤が、処方物中に用いられる。このような浸透剤は、当該技術分野で一般的に既知である。

## 【0350】

20

ある実施形態では、薬学的組成物は、吸入による投与のために調製される。吸入のためのある種のこのような薬学的組成物は、加圧パックまたはネブライザー中にエーロゾル噴霧剤の形態で調製される。ある種のこのような薬学的組成物は、噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の適切な気体を含む。加圧エーロゾルを用いるある実施形態では、投与単位は、計測量を送達するバルブで確定され得る。ある実施形態では、吸入器または散布器で用いるためのカプセルおよびカートリッジが処方され得る。ある種のこのような処方物は、本発明の薬学的作用物質および適切な粉末基剤、例えばラクトースまたはデンブンの粉末混合物を含む。

## 【0351】

ある実施形態では、薬学的組成物は、直腸投与、例えば坐薬または停留浣腸のために処方される。ある種のこのような薬学的組成物は、既知の成分、例えばココアバターおよび/または他のグリセリドを含む。

## 【0352】

30

ある実施形態では、薬学的組成物は局所投与のために調製される。ある種のこのような薬学的組成物は、低刺激性保湿基剤、例えば軟膏またはクリームを含む。適切な軟膏基剤の例としては、ワセリン、ワセリン+揮発性シリコーン、ならびにラノリンおよび油中水エマルションが挙げられるが、これらに限定されない。適切なクリーム基剤の例としては、コールドクリームおよび親水性軟膏が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0353】

ある実施形態では、本明細書中で提供される薬学的組成物は、治療的有効量でオリゴヌクレオチドを含む。ある実施形態では、治療的有効量は、疾患の症候を防止し、軽減し、または改善するのに、あるいは治療されている被験者の生存を延長するのに十分である。治療的有効量の決定は、当業者の能力内で十分になされ得る。

## 【0354】

40

ある実施形態では、本明細書中で提供される1つ以上の修飾オリゴヌクレオチドは、プロドラッグとして処方される。ある実施形態では、*in vivo*投与時に、プロドラッグは、生物学的、薬学的または治療的により活性な形態のオリゴヌクレオチドに、化学的に転化される。ある実施形態では、プロドラッグは、対応する活性形態より投与が容易であるため、有用である。例えば、ある場合には、プロドラッグは、対応する活性形態より(例えば、経口投与によって)生物学的利用可能であり得る。ある場合には、プロドラッグは、対応する活性形態と比較して、改善された溶解性を有し得る。ある実施形態では、プロドラッグは、対応する活性形態より低水溶性である。ある場合には、このようなプロドラッグは、細胞膜に対する優れた透過性を保有する(この場合、水溶性は移動の障害となる)。ある実施形態では、プロドラッグはエステルである。ある種のこのような実施形態では、エステルは、投与時に、代謝によりカルボン酸に加水分解される。ある場合には、カル

50

ポン酸含有化合物は、対応する活性形態である。ある実施形態では、プロドラッグは、酸基と結合される短いペプチド（ポリアミノ酸）を含む。ある種のこのような実施形態では、ペプチドは投与時に切断されて、対応する活性形態を形成する。

### 【0355】

ある実施形態では、活性化合物が *in vivo* 投与時に再生されるよう製薬上許容可能な化合物を修飾することにより、プロドラッグは產生される。プロドラッグは、薬剤の代謝的安定性または運搬特質を変更し、副作用または毒性を遮蔽し、薬剤の風味を改良し、あるいは薬剤のその他の特質または特性を変更するよう設計され得る。 *in vivo* での薬力学的過程および薬剤代謝の知識に基づいて、当業者は、一旦薬物学的活性化合物が既知になれば、化合物のプロドラッグを設計し得る（例えば、Nogradi (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392 参照）  
10

。

### 【0356】

#### ある種のキット

本発明は、キットも提供する。いくつかの実施形態では、キットは修飾オリゴヌクレオチドを含む 1 つ以上の本発明の化合物を含み、この場合、オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は m i R - 1 0 3 および / または 1 0 7 と相補的である。m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物は、本明細書中に記載される化合物のいずれかであり得るし、本明細書中に記載される修飾のいずれかを有し得る。いくつかの実施形態では、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物は、バイアル内に存在する。複数のバイアル、例えば 1 0 本のバイアルが、例えば、分配パック中に存在し得る。いくつかの実施形態では、バイアルは、注射器で到達可能であるよう製造される。キットは、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物を用いるための使用説明書も含有し得る。  
20

### 【0357】

いくつかの実施形態では、キットは、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物を被験者に投与するために用いられ得る。このような場合、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物のほかに、キットはさらに、以下のもののうちの 1 つ以上を含み得る：注射器、アルコール綿、綿球および / またはガーゼパッド。いくつかの実施形態では、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物は、バイアル中よりもむしろ、充填済み注射器（例えば、例えは 2 7 ゲージ、1/2 インチ針（ニードルガード付き）を有する 1 回用量注射器）中に存在し得る。複数（例えは 1 0 本）の充填済み注射器が、例えは分配パック中に存在する。キットは、m i R - 1 0 3 および / または m i R - 1 0 7 と相補的な化合物を投与するための使用説明書も含有し得る。  
30

### 【0358】

#### ある種の実験モデル

ある実施形態では、本発明は、実験モデルにおいて本発明の修飾オリゴヌクレオチドを使用し、および / または試験する方法を提供する。当業者は、本発明の薬学的作用物質を評価するために、このような実験モデルに関するプロトコールを選択し、修正し得る。  
40

### 【0359】

一般的には、修飾オリゴヌクレオチドは、先ず、培養細胞中で試験される。適切な細胞型としては、オリゴヌクレオチドの送達が *in vivo* で所望される細胞型に関連したものが挙げられる。例えば、本明細書中に記載される方法の試験のために適せた細胞型としては、一次肝細胞、一次脂肪細胞、前脂肪細胞、分化脂肪細胞、H e p G 2 細胞、H u h 7 細胞、3 T 3 L 1 細胞および C 2 C 1 2 細胞（ネズミ筋芽細胞）が挙げられる。

### 【0360】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドが m i R N A の活性を妨害する程度が、培養細胞で査定される。ある実施形態では、m i R N A 活性の抑制は、m i R N A のレベルを測定することにより査定され得る。代替的には、予測されるかまたは確認される m i R N A  
50

標的のレベルが測定され得る。m i R N A 活性の抑制は、m i R N A 標的のm R N A および / またはタンパク質における増大を生じ得る。さらに、ある実施形態では、ある種の表現型結果が測定され得る。例えば、適切な表現型結果としては、インスリンシグナル伝達が挙げられる。

#### 【 0 3 6 1 】

本明細書中に記載される方法の試験のための適切な実験動物モデルとしては、以下のものが挙げられる：o b / o b マウス（糖尿病、肥満症およびインスリン抵抗性に関するモデル）、d b / d b マウス（糖尿病、肥満症およびインスリン抵抗性に関するモデル）、高脂肪餌 C 5 7 B 1 6 / J マウス、Z u c k e r 糖尿病ラットおよび P 2 - S R E B P トランスジェニックマウス。

10

#### 【 0 3 6 2 】

##### ある種の定量的検定

修飾オリゴヌクレオチドの投与後のm i R N A のアンチセンス抑制の効果は、当該技術分野で既知の種々の方法により査定され得る。ある実施形態では、これらの方は、in v itro または in vivo での細胞または組織におけるm i R N A を定量するために用いられる。ある実施形態では、m i R N A の変化は、マイクロアレイ分析により測定される。ある実施形態では、m i R N A レベルの変化は、いくつかの市販 P C R 検定のうちの 1 つ、例えば T a q M a n (登録商標) マイクロ R N A 検定 (Applied Biosystems) により測定される。ある実施形態では、m i R N A のアンチセンス抑制は、m i R N A の標的のm R N A および / またはタンパク質レベルを測定することにより査定される。m i R N A のアンチセンス抑制は、一般的に、m i R N A の標的のm R N A および / またはタンパク質のレベルの増大を生じる。

20

#### 【 0 3 6 3 】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をさらに詳細に例証するために提示される。しかしながら、それらは、如何なる点でも、本発明の広範な範囲を限定するよう意図されるべきでない。

#### 【 0 3 6 4 】

実施例全体を通して、別記しない限り、統計学的有意は以下のように示される：\* = p < 0 . 0 5 ; \*\* = p < 0 . 0 1 ; \*\*\* = p < 0 . 0 0 1 。

30

#### 【 0 3 6 5 】

##### (実施例)

###### 実施例 1：インスリン感受性組織におけるマイクロ R N A の発現

インスリンシグナル伝達および応答に関するマイクロ R N A を同定するために、インスリン感受性組織をマイクロ R N A 発現に関してスクリーニングした。マイクロアレイ分析を実施して、その療法が肥満症、インスリン抵抗性および糖尿病の動物モデルである o b / o b および高脂肪餌誘導性肥満 (D I O) C 5 7 B 1 6 / J マウスの肝臓中で異常調節されるマイクロ R N A を同定した。マイクロ R N A m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 、2 つの保存され、遍在的に発現されるマイクロ R N A (図 1 E、F 参照) は、o b / o b マウスおよび高脂肪餌マウス (D I O マウス) を含めたこれらのモデルのいくつかにおける肝臓中で上方調節されることが判明した。

40

#### 【 0 3 6 6 】

ノーザンプロッティングはこの結果を確証し、o b / o b および高脂肪餌誘導性肥満マウスの両方の肝臓における 2 ~ 3 倍上方調節を実証した (図 1 A 参照)。実時間 P C R を用いて、m i R - 1 0 3 を、位置 2 1 の 1 つの塩基が異なる m i R - 1 0 7 と区別した (表 7 および図 1 B 参照)。m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 はともに、o b / o b および高脂肪餌誘導性肥満マウスの肝臓において上方調節された (表 8 参照)。

## 【表7】

表7: 実時間PCRによるmiR-103とmiR-107の区別

	0.5 nM 合成 miR-107		0.5 nM 合成 miR-103	
	+	-	-	+
実時間 107 レベル	1	No CT	No CT	0.016
実時間 103 レベル	0.0002	No CT	No CT	1

## 【表8】

表8: ob/obおよびDIO肝臓におけるmiR-103およびmiR-107の上方調節

	wt	ob/ob	正常通常餌	DIO
相対 miR-103 発現値	1	1.9194	1	2.272
相対 miR-107 発現値	1	2.1753	1	2.3992

10

## 【0367】

20

マイクロRNA発現を、健常個体、HBV-およびHCV-感染個体、ならびにアルコール性脂肪性肝炎（ASH）、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）および非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を有するヒト患者の肝臓生検においても分析した。miR-103およびmiR-107は、正常被験者、ならびにHBV-およびHCV-感染被験者において類似していた。しかしながら、miR-103およびmiR-107レベルは、糖尿病にしばしば関連した症状であるASH、NAFLDおよびNASHを有する被験者の肝臓試料中で増大された（表9参照）。

## 【表9】

表9: ヒト被験者の肝臓試料におけるmiR-103およびmiR-107発現

	被験番号	miR-103 相対発現レベル	miR-107 相対発現レベル
対照	8	1.0222	1.1253
HBV	7	1.106	0.9555
HCV	7	0.9652	0.9565
ASH	7	1.516	1.2226
NAFLD	15	1.3033	1.3277
NASH	13	1.7141*	1.628*
<hr/>			
対照+HBV+HCV	22	1.0307	1.0176
ASH	7	1.516**	1.2226
NAFLD	15	1.3033**	1.3277**
NASH	13	1.7141***	1.628***

30

## 【0368】

40

実施例2: miR-103またはmiR-107の抑制は動物における高血糖症を軽減する

miR-103またはmiR-107の抑制は、糖尿病またはインスリン抵抗性を有する被験者において治療的利益を生じ得る。肥満、インスリン抵抗性ob/obマウスは一般に、糖尿病および肥満症に関するモデルとして用いられる。高脂肪餌を与えられたマウスを、糖耐性減損および2型糖尿病のモデルとして用いる。したがって、ob/obマウスおよびDIOマウスにおいて、miR-103またはmiR-107の抑制を査定した。

## 【0369】

50

別記しない限り、用いる抗miRは、以下のように修飾される：

- 配列番号6の配列を有する抗miR-103、各糖での2'-O-メチル修飾、最初の4つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾（5'末端で）、最後の2つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾（3'末端で）、お

およびヒドロキシプロリノール結合により 3' 末端と連結されるコレステロール

・ 配列番号 7 の配列を有する抗 m i R - 1 0 7 、 各糖での 2' - O - メチル修飾、 最初の 4 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 ( 5' 末端で ) 、 最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 ( 3' 末端で ) 、 およびヒドロキシプロリノール結合により 3' 末端と連結されるコレステロール

・ 核酸塩基配列 T C A T T G G C A T G T A C C A T G C A G C T ( 配列番号 9 ) を有する対照抗 m i R 抗 - m m - 1 0 7 、 各糖での 2' - O - メチル修飾、 最初の 4 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾、 最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾、 およびヒドロキシプロリノール結合により 3' 末端と連結されるコレステロール。 m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 は單一ヌクレオチドが異なるので、 抗 m m - 1 0 7 は m i R - 1 0 3 ( 合計 4 つの不整合 ) および m i R - 1 0 7 ( 合計 5 つの不整合 ) の両方に関して不整合化される ; そして

・ 配列番号 1 9 の核酸塩基配列を有する対照抗 m i R 抗 m i R - 1 2 4 ； 各糖での 2' - O - メチル修飾、 最初の 4 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾、 最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾、 およびヒドロキシプロリノール結合により 3' 末端と連結されるコレステロール。

### 【 0 3 7 0 】

別記しない限り、 野生型マウスは 6 ~ 8 週齢野生型雄 C 5 7 B 1 / 6 マウス ( ~ 2 0 g ) であった ; o b / o b マウスは 6 ~ 8 週齢雄マウスであった ; そして D I O マウスは 8 週間高脂肪餌であった 1 2 週齢雄マウスであった。 マウスに、 P B S 、 抗 m i R - 1 0 7 ( 1 × 1 5 m g / k g ) 、 抗 m i R - 1 0 3 ( 2 × 1 5 m g / k g ) 、 抗 m m - 1 0 7 ( 2 × 1 5  $\mu$  g / k g ) または抗 m i R - 1 2 4 ( 2 × 1 5  $\mu$  g / k g ) のいずれかを注射した。

### 【 0 3 7 1 】

#### 野生型マウス

野生型マウスに、 1 5 m g / k g の抗 m i R - 1 0 3 または抗 m m - 1 0 7 を、 腹腔内に 2 回注射した。 P B S を、 対照処置として投与した。 抗 m i R - 1 0 3 は、 無関連マイクロ R N A m i R - 1 6 の発現に作用を及ぼすことなく、 脂肪中の m i R - 1 0 7 をサイレンシングする、 ということを、 m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 のノーザン分析は実証した ( 図 1 d 参照 ) 。

### 【 0 3 7 2 】

処置後、 隨意摂餌および絶食状態の両方で、 血糖値に関してマウスを試験した。 m i R - 1 0 3 / 1 0 7 のサイレンシングは、 野生型マウスにおいては血糖値に如何なる有意の変化も明示しなかった。 野生型マウスは、 腹腔内グルコースチャレンジに対しても良好に応答した。 さらに、 抗 m i R - 1 0 3 または抗 m i R - 1 0 7 による処置は、 A L T レベルにより判定した場合 ( P B S および抗 m i R - 1 0 7 で処置したマウスにおいて、 それぞれ ~ 2 5 I U / L および ~ 1 9 I U / L ; P B S および抗 m i R - 1 0 3 で処置したマウスでは、 それぞれ ~ 1 7 I U / L および ~ 1 8 I U / L ) 、 顕在性毒性を引き起こさなかった。

### 【 0 3 7 3 】

#### o b / o b マウス

o b / o b マウスに、 1 5 m g / k g の抗 m i R - 1 0 3 または抗 m i R - 1 0 7 を、 腹腔内に 2 回注射した。 P B S を、 対照処置として投与した。 処置後、 血糖値 ( 絶食ありおよびなし ) 、 I P G T T 、 I T T およびピルビン酸耐性に関して、 マウスを試験した。 各処置群は、 5 ~ 6 匹の 8 週齢マウスを含有した。 対照処置は、 P B S 、 抗 m i R - 1 2 4 または抗 m m - 1 0 7 であった。 抗 m i R - 1 0 3 および抗 m i R - 1 0 7 が、 無関連マイクロ R N A m i R - 1 6 の発現に作用を及ぼすことなく、 肝臓および脂肪中の m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 の両方を有效地にサイレンシングする、 ということを、 m i R - 1 0 3 および m i R - 1 0 7 のノーザン分析は実証した ( 図 1 C 、 D 参照 ) 。

### 【 0 3 7 4 】

10

20

30

40

50

随意摂餌状態での血糖値を試験するために、抗 miR - 103 または抗 miR - 107 の 2 回目用量投与後 2、3 および 5 日目に、血糖を測定した。miR - 103 の抑制は、PBS 処置と比較して、血糖の統計学的有意の低減を生じた。miR - 107 の抑制も、PBS 処置と比較して、統計学的有意の低減を生じた（表 10 参照（N. D. は「確定されず」を意味する））。

## 【表 10】

表 10

miR-103/107 の抗 miR 抑制後の血糖の統計学的有意の低減

処置	無作為血糖 (mM)			8 時間絶食血糖 (mM)	
	2 日目	3 日目	5 日目	3 日目	5 日目
PBS	9.73	11.61	10.10	11.85	11.10
抗 miR-103	7.67	6.77*	7.25*	6.69**	6.61**
抗 miR-107	6.96**	7.03*	6.27**	N. D.	N. D.
抗 miR-124	N. D.	N. D.	N. D.	11.82	11.22

10

## 【0375】

血糖の有意の低減は、抗 mm - 107 処置と比較した場合に、抗 miR - 103 により 20 処置の 3 または 6 日後にも観察された（表 11 参照）。

## 【表 11】

表 11

miR-103/107 の抗 miR 抑制後の血糖の統計学的有意の低減

処置	無作為血糖 (nM)		
	0 日目	3 日目	6 日目
抗-miR-103	8.58	5.50*	6.33*
抗-mm-107	8.29	7.30	8.44

30

## 【0376】

I P G T T も実施した。16 時間絶食後、マウス (n = 5) に、抗 miR - 103 または抗 miR - 107 の注射後 6 日目に、体重 1 kg 当たり 2 g のグルコースを腹腔内注射した。0、15、30、60、120 および 180 分で、採血した。PBS 対照処置と比較して、抗 miR - 103 または抗 miR - 107 で処置したマウスにおいて、糖耐性の統計学的に有意の改善が観察された（表 12 参照）。抗 miR - 103 処置マウスからの I P G T T 結果を抗 miR - 124 処置マウスからの I P G T T 結果と比較した場合にも、糖耐性の統計学的に有意の改善は明白である（表 13 参照）。

## 【表 12】

表 12

IPGTT: miR-103/107 の抗 miR 抑制は糖耐性を改善する

	0 分	指示時間後の血糖 (nM)					
		15 分	30 分	60 分	120 分	180 分	
PBS	7.69	21.41	26.76	22.53	17.13	14.64	
抗-miR-103	6.13	16.66	22.83*	19.70	11.28**	9.73**	
抗-miR-107	5.46	17.87*	21.52*	18.75	11.89**	9.34**	

40

## 【表13】

表13

IPGTT: miR-103 の抗 miR 抑制は糖耐性を改善する

	指示時間後の血糖 (nM)					
	0 分	15 分	30 分	60 分	120 分	180 分
抗-miR-124	7.65	21.43	26.54	22.74	17.03	14.49
抗-miR-103	6.13	16.66*	22.83*	19.70	11.28**	9.73**

## 【0377】

抗 miR 処置後 9 日目に、抗 miR - 103 処置マウス (n = 5) においてインスリン耐性試験 (ITT) も実施した。6 時間絶食後に、2 U インスリン / 体重 1 kg を投与した。0、15、30、60、90 および 120 分に採血した；0 分での値を 100 に正規化した。PBS による対照処置 (表 14 参照) に比して、あるいは抗 miR - 124 による対照処置 (表 15 参照) に比して、血糖値の統計学的に有意の低減が観察されたが、これは、インスリン感受性における改善を示す。

## 【表14】

表 14

ITT: 抗-miR-103 処置は ob/ob マウスにおけるインスリン耐性を改善する

	四時時間後の血糖 (nM)					
	0 分	15 分	30 分	60 分	90 分	120 分
PBS	100.00	111.79	104.84	82.89	75.19	77.12
抗-miR-103	100.00	102.17	53.10***	43.00***	44.19**	58.91

## 【表15】

表 15

ITT: 抗-miR-103 による処置は ob/ob マウスにおけるインスリン耐性を改善する

	四時時間後の血糖 (nM)					
	0 分	15 分	30 分	60 分	90 分	120 分
抗-miR-124	100.00	121.66	110.72	86.92	77.80	80.24
抗-miR-103	100.00	101.25	52.66	40.44	43.57	57.05

## 【0378】

糖新生 (新規の肝臓グルコース産生としても知られている) の測定として、ピルビン酸耐性試験を実施した (n = 5)。対照または抗 miR - 103 による処置後 12 日目に、一晩 (16 時間) 絶食後、マウス (n = 5) に 2 g のピルビン酸塩 / 体重 1 kg を腹腔内注射した。血糖値の統計学的有意の低減を観察した (表 16 参照)。対照マウス (抗 mm - 107 ; n = 5) と比較した場合、糖新生の減少は、抗 miR - 103 処置マウス (n = 5) における G - 6 - P アーゼ、PC および FBP アーゼの肝臓レベルの低減によっても支持された (表 17 参照)。

## 【表16】

表 16: 抗-miR-103 による処置は糖新生を低減する

	四時時間後の血糖 (nM)				
	0 分	15 分	30 分	60 分	120 分
PBS	6.78	16.48	16.35	12.40	10.20
抗-miR-124	7.24	18.46	18.12	14.26	10.23
抗-miR-103	5.53*	13.65***	11.37	9.22*	6.28**

10

20

30

40

## 【表17】

表 17: 抗-miR-103 による処置は糖新生に関与する遺伝子の発現を低減する

	相対発現 レベル		
	G6Pc	PC	FBPase
抗-mm-107	1.03	1.02	1.01
抗-miR-103	0.68**	0.67**	0.23***

## 【0379】

肝臓グリコーゲン含量も測定し (n = マウス 5 匹) 、 PBS 処置マウス (246  $\mu$ mol) に比して、抗 miR - 103 (367  $\mu$ mol) 処置マウスの肝臓で増大されることが判明した (メーカーの使用説明書に従って、BioVisionグリコーゲン検定キット)。 10

## 【0380】

一晩絶食後に血漿インスリンを測定し (n = マウス 10 匹) 、対照処置マウス (抗 mm - 107 ; 34 ng / mL) と比較して、抗 miR - 103 (26 ng / mL, p < 0.05) で処置したマウスでは低減されることが判明した。

## 【0381】

ALT の測定値は、明白な毒性を示さなかった。ob / ob マウスでは、ALT レベルは、PBS、抗 miR - 124、抗 miR - 107 および抗 miR - 103 で処置したマウスにおいて、それぞれ 125 IU / L、107 IU / L、98 IU / L であった。 20

## 【0382】

## 高脂肪餌肥満マウス

抗 miR - 103 も、グルコース耐性減損および 2 型糖尿病のモデルである高脂肪餌肥満マウス (餌誘導性肥満マウスまたは DIO マウスとも呼ばれる) に投与した。4 週齢で開始して、12 週間、マウスを高脂肪餌に保持した。マウスに、15 mg / kg の抗 miR - 103 を 2 回注射した。PBS を、対照処置として投与した。付加的対照処置は、抗 miR - 124 または抗 mm - 107 であった。各処置群は、4 ~ 5 匹のマウスを含有した。

## 【0383】

3 日後、血糖を測定し、PBS 対照 (n = 4 ; 10.5 nM 隨意、8 時間絶食後 9.5 nM) に比して、抗 miR - 103 処置マウス (n = 5 ; ~8 nM 隨意、8 時間絶食後 ~7.5 nM) において、摂餌および絶食状態の両方において、有意に低減されることを観察した。抗 miR - 103 処置マウスにおける血糖も、抗 mm - 107 処置マウスと比較して、摂餌および絶食状態の両方で有意に低減されることが判明した (表 18 参照)。 30

## 【表18】

表 18: 抗-miR-103 処置は DIO マウスにおける摂餌および空腹時血糖を低減する

処置	指示日での血糖 (nM) (べきしない限り隨時)						
	3	4	5	9	16	3 6 時間 絶食	17 12 時間絶食
抗-miR-124	8.55	9.38	8.93	9.35	9.10	7.33	9.10
抗-miR-103	4.26***	5.14**	6.70**	7.92**	7.92**	3.64**	7.62**

## 【0384】

抗 miR または PBS 処置後 8 日目に、一晩 (16 時間) 絶食後、2 g / kg のグルコースを投与することにより、IPGTT も実施した (n = マウス 5 匹)。PBS 対照処置と比較した場合、糖耐性は、統計学的に改善された (表 19 参照)。 40

## 【表19】

表 19: 抗-miR-103 処置は DIO マウスに置ける糖耐性を改善する

	0 分	指示時間後の血糖 (nM)				
		15 分	30 分	60 分	120 分	180 分
PBS	7.55	24.68	31.10	29.10	18.98	12.53
抗-miR-103	6.80	24.80	30.25	23.98*	13.65**	10.00*

## 【0385】

血漿インスリンレベルの測定値 (n = 5 匹のマウス) は、対照処置マウス (7 ng / ml、抗 miR - 107) に比して、抗 miR - 103 処置マウス (5.4 ng / ml) における血漿インスリンの低減を明示した。10

## 【0386】

同時に、糖尿病および肥満症の動物モデルにおけるこれらのデータは、miR - 103 / 107 の抑制がインスリン感受性を増強することを実証する。インスリン感受性を増強する化合物は、代謝障害、例えば糖尿病、糖尿病前症、代謝性症候群、高血糖症およびインスリン抵抗性の治療および / または防止のために有用である。

## 【0387】

実施例 3 : miR - 107 の過剰発現は動物における高血糖症を誘導する miR - 107 の役割をさらに調べるために、8 週齢雄野生型マウスを、miR - 107 を発現するアデノウイルスベクターで処置して (ad - 107 / GFP; n = 5)、種々の細胞型および組織、例えば肝臓において miR - 107 の過剰発現を生じた。アデノウイルスベクター発現緑色蛍光タンパク質 (GFP) で処置したマウス (ad - GFP; n = 5) を、対照動物として用いた。各動物に、 $5 \times 10^9$  ウィルス粒子を注射した。20

## 【0388】

ノーザンブロッティングは、ob / ob マウスで観察されたレベルと同様の miR - 107 のレベル増大を明示した (図 2 A 参照)。

## 【0389】

血糖は、摂餌および絶食動物の両方において、ad - GFP で処置したマウスに比して、ad - 107 / GFP で処置したマウスで増大されることが判明した (表 20 参照)。これらのデータは、miR - 107 発現増大が血糖増大をもたらす、ということを実証する。30

## 【表20】

表 20: miR-103 のウイルス発現は血糖を上げる

	指示時間後の血糖 (nM)			
	5 日目	7 日目	8 日目	8 日目 8 時間絶食
ad-GFP	5.93	5.60	5.66	5.02
ad-107/GFP	7.30**	7.52***	7.65**	6.97***

## 【0390】

腹腔内糖耐性試験 (IPGTT) は、身体からの腹腔内注射グルコースのクリアランスを測定する。この試験を用いて、ad - 107 / GFP で処置した動物が糖耐性減損を示すか否かを同定した。動物を約 15 時間絶食させて、グルコースの溶液を 2 g / kg で腹腔内 (IP) 注射して、注射後の異なる時点で血糖を測定する。IPGTT 中、0、30、60 および 120 分に、尾放血からの血中で、糖 (mg / dl) を測定した。0、30、60 および 120 分でのグルコース測定から台形方式により、曲線下糖面積 (AUC、mg / dl 分) を、糖耐性減損の指標として算定した。ad - 107 / GFP で処置した動物は、ad - GFP を注射した動物に比して、グルコースに対する耐性減損を示した (表 21 参照)。40

## 【表 2 1】

表 21: miR-107 のウイルス過剰発現は糖耐性を減損する

	指示時間での血糖 (mM)				
	0 分	15 分	30 分	60 分	120 分
ad-GFP	3.78	11.68	8.38	6.40	4.23
ad-miR-107/GFP	4.13	17.07***	13.48***	8.90***	5.28

## 【0 3 9 1】

インスリン耐性試験 (ITT) は、インスリンに対する感受性を測定する。この試験を用いて、miR-107 の過剰発現がインスリンに対する感受性を生じるか否かを同定した。ad-107/GFP または ad-GFP での処置の 5 日後に、マウスを約 6 時間絶食させ、次いで、0.75U/kg のインスリンを腹腔内注射した。ITT 中、0、15、30、60、90 および 120 分に、尾放血からの血中で、血糖を測定した。60 分時点で、ad-107/GFP 処置動物は、ad-GFP 処置動物に比して、この時点でのより高量の血糖で測定されるような、インスリンに対する感受性減少を示した (表 2 2 参照)。

## 【表 2 2】

表 22: miR-107 のウイルス過剰発現はインスリン感受性を低減する

	指示時間での血糖 (mM)					
	0 分	15 分	30 分	60 分	90 分	120 分
ad-GFP	100.00	57.48	35.05	22.20	27.80	100.00
ad-107/GFP	100.00	66.85	48.62	34.62*	26.52	100.00

## 【0 3 9 2】

ピルビン酸耐性試験は、de novo 肝臓グルコース産生としても既知である糖新生を測定する。この試験を用いて、miR-107 の過剰発現が糖新生に悪影響を及ぼすか否かを査定した。ad-107/GFP または ad-GFP での処置の 10 日後に、マウスを約 15 時間絶食させ、次いで、2g/kg のピルビン酸塩を腹腔内注射した。試験中、0、20、30、60 および 120 分に、尾放血からの血中で、血糖を測定した。30 分時点および 60 分時点で、ad-107/GFP 処置動物は、ad-GFP 処置動物に比して、血糖増大を示したが、これは、miR-107 の過剰発現の結果としての糖新生の増大を示す (表 2 3 参照)。

## 【表 2 3】

表 23: miR-107 のウイルス過剰発現は糖新生を増大する

	指示時間での血糖 (mM)				
	0 分	15 分	30 分	60 分	120 分
ad-GFP	3.72	6.70	7.84	6.74	4.30
ad-107/GFP	3.33	7.00	9.07	8.76***	5.08

## 【0 3 9 3】

実時間 PCR を用いて、糖新生に関連する遺伝子のレベルを測定した；レベルを 36B4 に正規化した；n = 5 匹のマウス。さらに、肝臓グルコース産生の増大には、グルコース 6-ホスフェート (G6PC)、ホスホエノールビルベートカルボキシナーゼ (PEPCK)、ピルベートカルボキシラーゼ (PC) およびフルクトース 1,6 ピスクファターゼ (FBPase) の発現増大が同時に生じたが、これは、糖新生増大がグルコースレベル上昇の主因である、ということを示唆する (表 2 4 参照)。これらのデータは、miR-107 の過剰発現が de novo 肝臓グルコース産生を増強する、ということを実証した。

10

20

30

40

## 【表24】

表 24: miR-107 のウイルス過剰発現は糖新生に関連する遺伝子の発現を低減する

	指示時間での血糖 (mM)			
	G6Pc	Pepck	PC	FBPase
ad-GFP	0.98	1.07	1.01	1.10
ad-107/GFP	2.00***	1.39*	1.23*	1.73*

## 【0394】

非エステル化脂肪酸 (NEFAs) も測定し、miR-107 が過剰発現されると低減されることが判明した (ad-GFP 処置マウスでは ~0.25 nmol/uL; ad-107/GFP 処置マウスでは ~0.30 nmol/uL, p < 0.05)。 10

## 【0395】

これらの結果は、miR-107 の発現増大が、グルコースに対する耐性減損、インスリンに対する感受性減少および糖新生増大を生じる、ということを実証する。miR-107 および miR-103 は、シード配列を共有し、類似の標的を調節すると予測され、miR-107 の過剰発現後に観察される作用は、miR-103 の過剰発現時にも観察され得る。したがって、miR-107 および miR-103 は、代謝障害、例えば糖尿病およびインスリン抵抗性 (これらに限定されない) の治療のための標的である。

## 【0396】

実施例 4: miR-103 または miR-107 の抑制は血漿コレステロールを低減する 20

野生型 (C57BL/6、8 週齢) および ob/ob マウス (12 週齢、8 週間の高脂肪餌で) の両方における血中脂質レベルに及ぼすその作用に関して、miR-103 または miR-107 の抑制をさらに試験した。各処置群は、マウス 5 匹を含有した。この実験では、抗 miR-103 は配列番号 6 の配列、各糖での 2'-O-メチル修飾、最初の 4 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 (5' 末端で)、最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 (3' 末端で)、およびコレステロール共役体を含んだ。抗 miR-107 は、配列番号 7 の配列、各糖での 2'-O-メチル修飾、最初の 4 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 (5' 末端で)、最後の 2 つのヌクレオシド間結合の各々でのホスホロチオエート修飾 (3' 末端で)、およびコレステロール共役体を含んだ。 30

## 【0397】

野生型マウスに、PBS 注射、15 mg/kg の用量での抗 miR-107 の腹腔内 1 回注射、または 15 mg/kg の用量での抗 miR-103 の腹腔内 2 回注射を施した。 ob/ob マウスには、PBS 注射、15 mg/kg の用量での抗 miR-107 の腹腔内 1 回注射、または 15 mg/kg の用量での抗 miR-103 の腹腔内 2 回注射を施した。

## 【0398】

総血漿コレステロールを測定し、PBS 処置マウス (2.67 ug/uL; n = 5) に比して、抗 miR-103 (1.75 ug/uL, p < 0.001; n = 5) または抗 miR-107 (1.86 ug/uL, p < 0.001; n = 5) 処置 ob/ob マウスでは有意に低下されることが判明した。総血漿コレステロールの HDL および LDL 分画を、血漿 200 uL からの FPLC ゲル濾過により測定し、LDL コレステロールにおける優先的低減を明示した (表 25 参照)。LDL および HDL 粒子の数を測定するために、免疫プロッティングを実施して、アポリポタンパク質 B 検出を用いて LDL 粒子の数を測定し、アポリポタンパク質 A 1 検出を用いて HDL 粒子の数を測定した (図 3A 参照)。 40

## 【表25】

表 25: 抗-miR-103 処置は ob/ob マウスにおける LDL cholesterol を優先的に低減する

分画	PBS	抗-miR-103	分画	PBS	抗-miR-103
1	0.68	0.70	31	5.83	3.81
2	0.72	0.69	32	5.81	3.82
3	0.70	0.72	33	5.58	3.84
4	0.68	0.68	34	5.47	3.91
5	0.65	0.68	35	5.34	3.99
6	0.71	0.71	36	5.19	4.16
7	0.70	0.68	37	5.24	4.72
8	0.66	0.70	38	5.71	3.66
9	0.67	0.67	39	6.49	6.55
10	0.70	0.68	40	7.86	7.94
11	0.72	0.68	41	8.74	8.37
12	0.69	0.68	42	8.89	7.88
13	0.63	0.66	43	8.10	6.82
14	0.69	0.69	44	6.47	5.19
15	0.69	0.83	45	4.91	3.95
16	0.70	0.89	46	3.53	2.92
17	0.77	0.93	47	2.56	2.19
18	0.80	0.96	48	1.91	1.70
19	0.87	1.01	49	1.43	1.30
20	1.00	1.09	50	1.06	0.98
21	1.18	1.22	51	0.94	0.85
22	1.42	1.39	52	0.81	0.78
23	1.81	1.70	53	0.82	0.78
24	2.34	2.04	54	0.83	0.76
25	2.99	2.58	55	0.86	0.82
26	3.74	3.13	56	0.83	0.82
27	4.52	3.62	57	0.82	0.79
28	5.20	3.96	58	0.80	0.80
29	5.67	3.92	59	0.81	0.79
30	5.86	3.93	60	0.77	0.74

## 【0399】

10

20

30

40

非エステル化脂肪酸も測定し、PBS 処置 (~ 0.35 nmol / u1) に比して、miR-103 (~ 0.5 nmol / u1) または miR-107 (~ 0.45 nmol / u1) の抑制後に増大されることを観察した (各群に関して n = 5)。

## 【0400】

8 週齢 LDL - 受容体欠損マウス (LDLR - / - マウス) も、抗 miR-103 または PBS で処置し (n = 3)、主要リポタンパク質分画を、血漿 150 u1 からの FPLC ゲル濾過により分離して、VLDL、HDL および LDL 分画に関して検定した。コレステロールに関して検定した分画でウエスタンブロッティングも実施し、アポリポタンパク質 B 抗体を用いて、LDL 粒子の数を検出し、アポリポタンパク質 A1 抗体を用いて HDL 粒子の数を検出した (図 3B 参照)。LDL コレスチロールの優先的低減を観察した (表 26 参照)。VLDL の減少は、トリグリセリドの減少を示す (図 3C 参照)。

## 【表26】

表 26: LDLR -/-マウスにおける LDL コレステロールの優先的低減

分画	PBS	抗-miR-103	分画	PBS	抗-miR-103
1	-0.02	-0.08	31	8.68	6.67
2	-0.03	0.16	32	7.36	5.67
3	-0.06	-0.06	33	5.85	4.55
4	-0.09	-0.12	34	4.62	3.63
5	-0.08	-0.08	35	3.58	2.84
6	-0.05	0.00	36	2.78	2.23
7	-0.08	-0.02	37	2.35	1.89
8	-0.06	-0.03	38	2.18	1.80
9	-0.07	-0.03	39	2.18	1.91
10	-0.06	-0.04	40	2.56	2.44
11	-0.05	-0.05	41	3.33	3.38
12	-0.06	-0.07	42	4.67	4.99
13	-0.10	-0.11	43	6.31	6.75
14	-0.05	-0.08	44	7.46	7.74
15	0.28	-0.07	45	8.00	7.90
16	0.75	-0.07	46	7.50	6.70
17	0.84	0.03	47	6.06	5.25
18	0.83	0.19	48	4.23	3.73
19	1.14	0.39	49	2.97	2.55
20	0.97	0.55	50	1.82	1.58
21	1.18	0.83	51	1.06	0.89
22	1.65	1.21	52	0.62	0.50
23	2.46	1.89	53	0.38	0.28
24	3.69	2.84	54	0.30	0.17
25	5.29	3.95	55	0.28	0.19
26	6.88	5.28	56	0.24	0.19
27	8.67	6.51	57	0.23	0.18
28	10.06	7.24	58	0.20	0.18
29	10.23	7.72	59	0.23	0.15
30	9.82	7.49	60	0.14	0.09

10

20

20

30

## 【0401】

これらのデータは、miR-103またはmiR-107の抑制が、血糖値低減、インスリン感受性改善、糖新生低減および糖耐性改善のほかに、コレステロールレベル、優先的にはLDLコレステロールレベルを低減する、ということをさらに実証する。

## 【0402】

実施例5：miR-103またはmiR-107による遺伝子発現調節の分析

miR-103およびmiR-107がインスリン感受性を調節する考え得るメカニズムを検討するために、RNA発現分析を実施して、miR-103/107が抑制されるかまたは過剰発現される組織中で遺伝子を測定した。実時間PCRを実行して、miR-103またはmiR-107の標的であると予測される遺伝子のRNAレベルを測定した。マイクロアレイ分析を実施して、遺伝子発現におけるゲノム幅変化を測定した。miR-103およびmiR-107の配列は1つの核酸塩基のみが異なるので、それらは標的遺伝子の重複組を有すると予期される。

40

## 【0403】

miR-103およびmiR-107がインスリン感受性を調節する考え得るメカニズムを検討するために、Affymetrixマイクロアレイを用いてゲノム幅発現分析を実施して、ウイルス投与の10日後に、Ad-107/GFPおよびAd-GFPに感染したC57BL/6マウスからの肝臓を比較した(n=5/処置)。Ad-107/GFPマウスの肝臓では、3'UTR中にmiR-107に対するシード整合を保有するmRNAは、その3'UTRがmiR-107シード整合を保有しないmRNAと比較して、有意に下方調節され、下方調節は、進化的選択圧下にあると推測されるシード整合を保有

50

するmRNAのサブセットに関してより健著であった(図2B)。データは、miR-107を発現する組換えアデノウイルスに感染したC57BL/6マウスの肝臓から収集したRNAで実施した実時間PCR(表27参照)によるmiR-107標的遺伝子のサブセットに関して確認された(実施例2におけると同様)。対照ウイルスAd-GFPに比して、miR-107を発現するアデノウイルスの存在下でのRNAレベルの低減は、RNAがmiR-103/107の標的である、ということを示す。下方調節化遺伝子の機能的注釈の分析は、代謝がmiR-103/107により影響を及ぼされる、ということを示した。

【表27】

表27: miR-107のウイルス過剰発現後の遺伝子発現における変化

LIVER C57BL/6	ad-GFP	ad-107/GFP
G6Pc	0.98	2.00***
PEPCK	1.07	1.39*
ピルベートカルボキシラーゼ	1.01	1.23*
フルクトース1,6ビスホスファターゼ	1.10	1.73*
Cav1	1.0000	0.7066**
Gpnmb	0.9548	0.1521***
Prom1	1.0934	0.4454**
LPL	1.0564	0.4401***
Pla2 (g4)	1.0345	0.3492***
Pla2 (g7)	1.0982	0.4065***
LYPLA2	1.0000	0.8787*
LYPLA3	1.0050	0.5679***
Pld1	1.0000	0.7548**
Pld3	1.0274	0.5772***
アポBEC1	1.0055	0.5709***
アポB48r	1.1630	0.3833***

10

20

30

40

50

【0404】

抗miR-103または抗miR-107で処置したob/obマウス(実施例1と同様; n=5匹のマウス)の肝臓から収集したRNAで、実時間PCRを実施した。PBS対照に比して、抗miR-103または抗miR-107の存在下でのRNAレベルの増大は、RNAがmiR-103またはmiR-107の標的である、ということを示す(表28ならびに付加的遺伝子発現データの図4Aを参照)。

【表28】

表28: ob/obマウスにおけるmiR-103の抑制後の肝臓遺伝子発現の変化

	PBS	抗-miR-103
Cav1	1.0021	1.2232
Gpnmb	1.0037	2.5821
Prom1	0.9992	1.5617
LPL	1.0040	1.2673
Pla2 (g7)	1.0002	1.3347
ApoBEC1	1.0031	1.2115
BCKDHA	1.0003	0.3698
SAA1	1.0020	0.4313
SAA3	1.1023	0.4360
LCN2	1.0020	0.4044

【0405】

抗miR-103で処置したLDLR-/マウス(実施例4と同様)の肝臓から収集したRNAで、実時間PCRを実施した。PBS対照に比して、抗miR-103の存在下でのRNAレベルの増大は、RNAがmiR-103の標的である、ということを示す(表29参照)。

## 【表29】

表 29: 抗-miR-103 は LDLR-/マウスの肝臓における遺伝子発現を増大する

	PBS	抗-miR-103
LPL	1.0026	1.8160***
Pla2g4	1.0123	1.7222***
Pla2g7	1.0690	3.0274***
アボ BEC1	1.0223	1.8388***
LYPLA3	1.0300	1.4017**
アボ B48r	1.0891	1.3525*
リピン1	0.9896	1.3751**

10

## 【0406】

抗miR-103または抗miR-107で処置したob/obまたはC57B1/6マウス（実施例1と同様）の脂肪から収集したRNAで、実時間PCRを実施した。PBS対照に比して、抗miR-103または抗miR-107の存在下でのRNAレベルの増大は、RNAがmiR-103またはmiR-107の標的である、ということを示す（表30ならびに付加的遺伝子発現データの図4Bを参照）。

## 【表30】

表 30: mRNA は抗-miR-103 処置後の ob/ob マウスの脂肪中で増大する

	ob/ob		C57B1/6	
	PBS	抗-miR-103	PBS	抗-miR-103
LPL	1.0241	1.7775**	1.0937	2.3323***
リピン1	1.0238	1.5320**	1.2662	2.1105**
Cav1	0.9860	3.4585***	1.5891	2.3680*
Pla2(g7)	0.9851	1.4429*	N.D.	N.D.

20

## 【0407】

抗miR-103で処置したob/obまたはC57B1/6マウス（実施例1と同様）の筋肉から収集したRNAで、実時間PCRを実施した。PBS対照に比して、抗miR-103の存在下でのRNAレベルの増大は、RNAがmiR-103またはmiR-107の標的である、ということを示す（表31ならびに付加的遺伝子発現データの図4Cを参照）。

30

## 【表31】

表 31: 抗-miR-103 処置後の ob/ob マウスの筋肉中の mRNA 変化

	ob/ob	
	PBS	抗-miR-103
LPL	1.0215	1.4497**
Cav1	1.0238	1.4333**
G6Pc	0.9538	0.5288*
PC	0.9840	0.1578***
BCAT2	1.0199	1.5041***

40

## 【0408】

脂肪細胞中のカベオラの主要構成成分であり、インスリンシグナル伝達の媒介因子であるカベオリン1（Cav1）は、miR-107過剰発現およびサイレンシング後のインスリン感受性組織中でそれぞれ下方または上方調節される遺伝子を含有するmiR-103/107シードの1つであった。上記の表中で例示したように、Cav1転写物レベルは、ad-107/GFPを注射したC57B1/6マウスの肝臓中で約30%低減され（ad-GFPマウスに対して、ad-107/GFPマウスにおいて0.71の相対的発現）、抗miR-103注射ob/obマウスの肝臓では約22%増大された（PBS処置マウスに対して、1.22の相対発現）。C57B1/6マウスの抗miR-103処置は、脂肪Cav1 mRNAレベルの1.5倍増大をもたらす（PBS処置マウスの1.59に対して、2.37の相対発現）。特に、ob/obマウスの脂肪におけるmi

50

R - 103 サイレンシングは Cav1 mRNA レベルを約 3.5 倍に増大し (PBS 処置マウスに対して 3.45 の相対発現)、筋肉中の miR - 103 サイレンシングは、Cav1 mRNA レベルの約 1.4 倍の上方調節を生じた (PBS 処置マウスに対して 1.43 の相対発現)。

【0409】

Cav1 発現が miR - 103 / 107 により直接的に調節されるかを試験するために、コード配列および 3' UTR を、機能的結合部位に関して分析した。ネズミ Cav1 (mCav1) は、3 つの miR - 103 シードモチーフを 3' 中に含有し、一方、ヒト Cav1 (hCav1) は、3 つの 6-mer シードモチーフ (1 つは 5'、2 つは 3' UTR 中) を有する (図 9)。

10

【0410】

遺伝子が miR - 103 / 107 により調節されるということの付加的確証として、ルシフェラーゼ検定を用いて、miR - 103 / 107 標的遺伝子の全長または部分的 3' UTR を含有する構築物を試験した。3' UTR マウスおよびヒト Cav1 (それぞれ、mCav1 および hCav1) を含有するプラスミド構築物でトランスフェクトした HEK293 細胞からのルシフェラーゼ活性の測定値は、miR - 103 の存在下でのこれらのレポーター構築物の発現低減を示した (表 32 参照)。シードの突然変異化 (マウスにおいても保存される) (NM\_001753、RefSeq、2004-2009 (ATGCTG)) は、両 hCav1 3' UTR 構築物 (NM\_001753、1505-2679 nt (L) および 1749-2679 nt (S)) におけるルシフェラーゼ活性の miR - 103 誘導性低減の完全逆転を生じた。さらに、突然変異体 3' UTR hCav1 における総ルシフェラーゼ活性は、同様に、内因的発現 miR - 103 による抑圧のため、野生型 3' UTR hCav1 と比較して増大された。

20

【表 32】

表 32: カベオリン 1 は miR-103 の標的である

	相対ルシフェラーゼ活性 (ホタル/ウミシイタケ)		
	擬似	miR-103	スクランブル 1
mCav1 長鎖	1	0.76*	0.96
hCav1 短鎖	1	0.8	0.93
hCav1 長鎖	1	0.86*	0.98
hCav1 mut 短鎖	1	1.1	0.98
hCav1 mut 長鎖	1	1.05	0.99
Total hCav1 mut/wt 短鎖		1.16**	
総 hCav1 mut/wt 長鎖		1.21**	

30

【0411】

他の RNA の中で、カベオリン 1 およびリピンを、miR - 103 / 107 の標的として同定した。これらの遺伝子は、抗 miR - 103 および / または抗 miR - 107 の作用を媒介する標的に関する候補である。

40

【0412】

実施例 6 : miR - 103 または miR - 107 標的タンパク質発現の分析

miR - 103 または miR - 107 による標的遺伝子の調節をさらに理解するために、抗 miR 処置マウスからの試料を、タンパク質発現に関して分析した。

【0413】

PBS または抗 miR - 103 で処置した ob / ob マウスの脂肪組織からのタンパク質抽出物に関して、ウエスタンプロットティングを実施した (実施例 1 に記載)。カベオリン 1、インスリン受容体ベータ、pAKT、AKT および ガンマ・チューブリンに関して膜をプローブした。リン酸化 pAKT は、増大されることが観察された。pAKT はインスリンシグナル伝達により活性化されるキナーゼであるので、同様の血漿インスリンレベルでの p - AKT レベル増大は、インスリン感受性増大を示した (図 5A 参照)。

50

## 【0414】

HEK293細胞も抗m i R - 103で処置し、抗m i R処置の3日後に細胞を収穫した。ウエスタンプロットティングを実施して、カベオリン1およびガンマ・チューブリンを検出した。カベオリン1タンパク質レベルは抗m i R - 103の濃度増大に伴って増大したが、これは、カベオリン1がm i R - 103の抑制により抑制解除されたことを示す(図5Bおよび5D参照)。

## 【0415】

ノーザンプロットティングを用いて、図5Bにおけると同様に処置したHEK293細胞においてm i R - 103を検出した(図5C参照)。

## 【0416】

細胞へのm i R - 103の付加の作用を評価するために、HEK293細胞をm i R - 103 siRNAでトランスフェクトした。対照 siRNAも用いた。m i R - 103の付加は、カベオリン1タンパク質のレベル低減を引き起こした(図5Eおよび5F参照)。

## 【0417】

細胞へのm i R - 103の付加の作用を評価するために、3T3細胞をm i R - 103 siRNAでトランスフェクトした。対照 siRNAも用いた。m i R - 103の付加は、カベオリン1タンパク質のレベル低減を引き起こした(図5G参照)。

## 【0418】

m RNA発現に関する結果と合わせて解釈すると、これらのデータは、Cav1が、マウスおよびヒトの両方において、m i R - 103の直接的標的である、ということを実証する。

## 【0419】

実施例7：インスリン感受性に及ぼすm i R - 103媒介性作用に対する肝臓の関与  
インスリン感受性に及ぼす作用に関する肝臓の相対的関与を試験するために、リポソーム処方物を用いて、抗m i Rを主に肝臓に送達した。抗m i Rの肝臓標的化脂質ナノ粒子(LNP)処方物を、新規イオン化可能脂質DLin-KC2-DMAを用いて調製した(Semple et al., Nature Biotechnology, 28, 172-176 (2010))。LNPは、DLin-KC2-DMA、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロールおよびmPEG2000-DMG(50:10:38.5:1.5のモル比で使用)で構成された。約11:1の総脂質:抗m i R重量比で、LNP中で抗m i Rを処方した。

## 【0420】

リポソーム中に処方した抗m i R - 103または抗m i R - 107を、15mg/kgの抗m i Rの用量でマウスに投与した(抗m i R - 103に関してはn=8、抗m m - 107に関してはn=7)。マウスに、2日間、1日1回注射した。肝臓、脂肪または筋肉からの総RNA30ugを用いて、ノーザンプロットティングを実施した。リポソーム処方抗m i R - 103は、肝臓における(しかし脂肪および筋肉ではなく)特異的且つ強力なサイレンシングを誘導したが、しかしリポソーム処方抗m m - 107は誘導しなかった(図6参照)。ob/obマウスの肝臓におけるm i R - 103/107のサイレンシングは、ランダムおよび絶食状態での血糖値に有意の作用を及ぼさなかつたし(表33参照)、この処置はインスリン感受性改善も生じなかつた。この観察は、m i R - 103/107のインスリン感作作用が脂肪および筋肉のような肝臓外組織により主に媒介される、ということを示す。

10

20

30

40

## 【表33】

表 33: リポソーム処方抗-miR-103 は血糖に有意に影響を及ぼさない

	血糖 (mM)						
	D0 6hfast	D3 random	D3 6h fast	D5 random	D5 6h fast	D8 12h fast	D9 12h fast
ob/ob							
Lip-抗-mm-107	7.4429	13.7857	7.7000	7.5833	9.7667	6.4000	10.4286
Lip-抗-miR-103	7.4125	9.6250	7.1000	7.1625	7.9000	5.0750	8.3000

## 【0421】

## 実施例8：脂肪組織におけるmiR-103抑制の作用

10

miR-103の発現は、肝臓および筋肉と比較して脂肪組織中では約8倍高いため、脂肪組織におけるmiR-103/107のサイレンシングの作用を、さらに詳細に検査した。

## 【0422】

肥満 (ob/ob) マウスは、対照処置マウスと比較して、抗miR-103を用いてmiR-103/107が全身的にサイレンシングされた場合、体重のわずかな減少を示した(表34参照)。これに対比して、リポソーム処方抗miR-103またはAd-107/GFPを用いた肝臓におけるmiR-103/107発現の操作は、対照処置マウスと比較して、体重に影響を及ぼさなかった。この観察にかんがみて、高脂肪餌肥満およびob/ob動物の両方の脂肪分布を、抗miRまたは対照による処置の13日後に、コンピューター断層撮影(CT)により調べた(図7A参照)。抗miR-103で処置した高脂肪餌およびob/obマウスはともに、皮下(SC)および内臓(V)脂肪の両方の減少のため、総脂肪低減を示した(表34および35参照)。

20

## 【表34】

表 34: 抗-miR-103 は皮下および内臓脂肪を低減する

	コンピューター断層撮影 13日目			総	D10	
	皮下		内臓			
	ob/ob	D10	ob/ob	D10	ob/ob	
抗-MM-103	8.16	5.44	16.58	12.06	30.18	34.07
抗-miR-103	7.46	3.87	15.38	10.18	26.71*	29.43*

30

## 【表35】

表 35: 抗-miR-107 は非マン ob/ob マウスの体重を低減する

	体重 (g)					
	0日目	3日目	6日目	12日目	15日目	16日目
ob/ob	44.21	46.10	47.84	50.17	49.76	48.80
抗-MM-107	43.94	45.55	46.16	47.89	47.10	46.14*
抗-miR-103						

40

## 【0423】

この低減が細胞数が少ないためかまたは脂肪細胞が小さいためかを調べるために、脂肪組織切片からの平均脂肪細胞サイズを、自動画像分析ソフトウェアを用いて定量した。抗miR-103処置高脂肪餌肥満およびob/ob動物は、抗mm-107注射対象と比較して、より小さい脂肪細胞を有した(図7B、7C; 表36で定量化)。

## 【表36】

表 36: 抗-miR-103 処置はより小さい脂肪細胞サイズを生じる

	D10		ob/ob		
	SC	V	SC	V	
抗-miR-124	N. D.	N. D.	23533.66	25163.76	
抗-MM-107	23794.78	25325.03	24193.78	24890.49	
抗-miR-103	19523.82***	20822.32***	19520.48***	20822.43***	

50

## 【0424】

小脂肪細胞の数の有意の増大ならびに大型脂肪細胞の減少も観察された(表37および

3 8 参照；値は総細胞数に対して正規化される)。

【表 37】

表 37

DIO マウス：抗-miR-103 は小脂肪細胞数を増大し大型脂肪細胞数を低減する

	SC		V	
	抗-MM-107	抗-miR-103	抗-mm-107	抗-miR-103
1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	0.0490	0.0680	0.0308	0.0641*
3	0.1194	0.1392	0.0576	0.1171*
4	0.1057	0.1386***	0.1033	0.1200
5	0.1015	0.1239	0.1054	0.1075
6	0.0949	0.0918	0.0985	0.1053
7	0.0873	0.0845	0.0781	0.0837
8	0.0619	0.0639	0.0870	0.0850
9	0.0594	0.0501	0.0671	0.0648
10	0.0443	0.0522	0.0556	0.0431**
11	0.0410	0.0393	0.0574	0.0400*
12	0.0348	0.0333	0.0474	0.0329
13	0.0276	0.0296	0.0438	0.0340
14	0.0227	0.0188	0.0256	0.0186
15	0.0223	0.0162	0.0172	0.0209
16	0.0183	0.0122	0.0222	0.0112***
17	0.0217	0.0100*	0.0220	0.0137
18	0.0155	0.0073	0.0144	0.0087
19	0.0166	0.0058*	0.0181	0.0046**
20	0.0166	0.0050**	0.0128	0.0051*
21	0.0110	0.0035*	0.0100	0.0075
22	0.0099	0.0037	0.0096	0.0046*
23	0.0059	0.0023	0.0081	0.0026*
24	0.0057	0.0008**	0.0060	0.0017
25	0.0033	0.0000	0.0014	0.0000
26	0.0016	0.0000	0.0007	0.0000
27	0.0016	0.0000	0.0000	0.0000
28	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000

抗-mm-107 に関しては n = 6 ; 抗-miR-103 に関しては n = 7

10

20

30

## 【表 38】

表 38:

0b/ob マウス：抗-miR-103 は小脂肪細胞数を増大し、大型脂肪細胞数を低減する

	SC		V	
	抗-mm-107	抗-miR-103	抗-mm-107	抗-miR-103
1	0.0000	0.0006	0.0000	0.0000
2	0.0524	0.0860**	0.0518	0.0767**
3	0.0965	0.1275**	0.0862	0.1016**
4	0.1005	0.1302***	0.0878	0.1118**
5	0.0927	0.1129**	0.0868	0.1000
6	0.0900	0.0958	0.0871	0.1044**
7	0.0886	0.0883	0.0858	0.0922
8	0.0697	0.0687	0.0741	0.0786
9	0.0601	0.0592	0.0672	0.0735
10	0.0555	0.0451**	0.0571	0.0524
11	0.0484	0.0384*	0.0452	0.0442
12	0.0388	0.0313	0.0478	0.0397
13	0.0282	0.0250	0.0438	0.0256***
14	0.0299	0.0239	0.0390	0.0252***
15	0.0307	0.0154***	0.0255	0.0167*
16	0.0243	0.0139**	0.0224	0.0128**
17	0.0185	0.0112**	0.0191	0.0139*
18	0.0178	0.0097**	0.0163	0.0100***
19	0.0160	0.0083**	0.0134	0.0087*
20	0.0125	0.0065*	0.0126	0.0058**
21	0.0091	0.0010***	0.0103	0.0020***
22	0.0083	0.0003***	0.0084	0.0028***
23	0.0074	0.0003***	0.0071	0.0008***
24	0.0042	0.0003**	0.0051	0.0006***
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

抗-mm-107 に関しては n = 4 ; 抗-miR-103 に関しては n = 5

## 【0425】

CT で測定した脂肪パッドの低減を、脂肪細胞サイズの平均的低減と比較した結果は、抗 miR - 103 マウスが抗 mm - 107 対照より約 10 ~ 20 % 多い脂肪細胞を有する、ということを示した。これが前死脂肪細胞分化の変化によるものか否かを調べるために、間質・血管分画 (SVF) を野生型マウスの V および SC 脂肪から単離して、抗 miR - 103 または抗 mm - 107 の存在下で分化を誘導した。培養中で 8 日後、抗 miR - 103 トランスフェクト化細胞は、抗 mm - 107 からの細胞より多い成熟脂肪細胞を有した (図 7D) が、これは、miR - 103 の非存在が細胞自律的に脂肪細胞分化を増強する、ということを示す。高含量画像処理による脂肪細胞数の定量は、それぞれ V または SC 脂肪由来の抗 miR - 103 処置 SVF における分化脂肪細胞の約 2 および 2.5 倍の増大を実証した (表 39 参照)。逆に、Ad - 107 / GFP 媒介性 miR - 103 過剰発現は、Ad - GFP 対照感染 SVF と比較して、分化脂肪細胞数の 3.7 倍低減をもたらした (表 39 参照)。

10

20

30

40

## 【表39】

表 39: 抗-miR-103 処置は分化脂肪細胞を増大する

	分化細胞の相対数	
	SC	V
抗-mm-107	1.00	1.00
抗-miR-103	1.75***	2.51**
ad-GFP	N.D.	1.00
ad-107/GFP	N.D.	0.28***

## 【0426】

前脂肪細胞分化におけるmiR-103の負の調節は、脂肪細胞分化マーカーAp2およびPPAR-ガンマの遺伝子発現分析によりさらに裏付けられた。両マーカーは、抗mm-107対照と比較してmiR-103/107が抗miR-103でサイレンシングされる分化SVFでのmRNAレベル増大を示した（表40参照）。

10

## 【表40】

表 40: 脂肪細胞分化マーカーはmiR-103/107の抑制後増大する

	AP2 相対遺伝子発現				PPAR $\gamma$ 相対遺伝子発現			
	0h	24h	48h	96h	0h	24h	48h	96h
擬似	0.96	3.80	12.62	37.16	0.99	1.69	2.15	5.68
抗-mm-107	0.96	3.80	14.92	57.24	0.99	1.71	2.12	7.36
抗-miR-103	0.96	3.85	19.31	92.78***	0.99	1.91	2.92*	9.34*

20

## 【0427】

## 実施例9: miR-103媒介性グルコース取込み

小型脂肪細胞は、ヒトおよび齧歯類モデルにおいて、インスリン感受性増大に関連する。脂肪細胞におけるインスリン刺激性グルコース取込みがmiR-103抑制により影響を及ぼされるか否かを調べるために、一次脂肪細胞を抗miR-103または対照処置o b / o bマウスから単離して、インスリン刺激性<sup>14</sup>C-グルコース取込みをin vitroで測定した。

30

## 【0428】

一試験において、一次脂肪細胞を、PBSまたは抗miR-103（各々15mg/kgの2回注射）で処置した7ヶ月齢o b / o bマウスから単離した。抗miR-124または抗mm-107を、対照抗miRとして用いた。15日間絶食後の注射の6日後にマウスを屠殺し、一次皮下（SC）または内臓（V）脂肪細胞分画を、20nMインスリンを用いた場合と用いない場合とで、10分間予備インキュベートして、次に、1mMの<sup>14</sup>C標識グルコースとともにさらに1時間インキュベートした。抗miR-103は、PBSまたは抗miR-124に比して、脂肪細胞におけるインスリン刺激性グルコース取込みを改善したが、これは、インスリン感受性の増大を示す（表41参照）。20nMインスリンでの刺激後のグルコース取込みは、対照（抗mm-107またはPBS）と比較して、抗miR-103において有意に高かった（表41）。

30

## 【表41】

表 41: 抗-miR-103はインスリン刺激性グルコース取込みを改善する（図7h）

	一次脂肪細胞における <sup>14</sup> C-標識グルコース取込み				
	SC	SC	V	V	V
	抗-mm-107	抗-miR-103	抗-mm-107	抗-miR-103	PBS
無インスリン	1.00	1.12	1.00	1.63	0.82
20nMインスリン	1.27	1.78	1.29	2.61	1.05

40

SC: p&lt;0.01: 無インスリン、抗-miR-103（抗-mm-107に比して）

SC: p&lt;0.001: 20nMインスリン、抗-miR-103（抗-mm-107に比して）

V: p&lt;0.001: 無インスリン、抗-miR-103（抗-mm-107に比して）

V: p&lt;0.01: 20nMインスリン、抗-miR-103（抗-mm-107に比して）

50

## 【0429】

さらに、インスリン感受性と正の相関を示すアディポネクチンレベルは、抗m i R - 103処置ob / obマウスで増大され（表42）、ad - 107 / GFPを注射したC57B1 / 6マウスでは低減された。

## 【表42】

表42: 抗-miR-103はob / obマウスにおけるアディポネクチンレベルを増大する

処置	系統	アディポネクチン ug/ml
抗-mm-107	ob / ob	6.20
抗-miR-103	ob / ob	8.11
ad-GFP	C57B1 / 6	8.98
ad-107/GFP	C57B1 / 6	6.79

10

## 【0430】

合わせて考えると、これらのデータは、m i R - 103 / 107のサイレンシングが脂肪細胞におけるインスリン感受性を増大する、ということを実証する。

## 【0431】

実施例10：m i R - 103媒介性リポタンパク質リパーゼヒドロラーゼ活性  
P B S または抗m i R - 103で処置したC57B1 / 6マウスまたはob / obマウスの脂肪におけるLPLヒドロラーゼ活性を、酵素検定を用いて測定した。抗m i R - 103処置マウスにおけるLPLヒドロラーゼ活性の増大は、インスリン感受性の増大を示した（表43参照）。

20

## 【表43】

表43: 抗-miR-103処置はLPL活性を増大する

	c57b1/6	ob / ob
抗-mm-107	0.34	0.22
抗-miR-103	0.38	0.31*

30

## 【0432】

インスリン感受性増大は、インスリン抵抗性の改善を生じる。したがって、m i R - 103および / またはm i R - 107の活性を抑制することにより、インスリン感受性を増大し、したがってインスリン抵抗性を改善するための方法が、本明細書中で提供される。

## 【0433】

実施例11：カベオリン1遺伝子を欠くm i R - 103抑制マウスの作用  
C a v 1は、カベオラ（形質膜での別個の非イオン性界面活性剤不溶性、脂質およびコレステロール濃化血管嵌入）の主要タンパク質である。C a v 1は、カベオラおよびその関連I Rを安定化することによりほぼ同様にインスリンシグナル伝達を活性化する。具体的には、C a v - 1および - 3由来の足場ドメインに対応するペプチドが、インスリン受容体基質 - 1 ( I R S - 1 )に対するインスリン受容体キナーゼ活性を強力に刺激する。C a v 3過剰発現は、293T細胞におけるI R S - 1のインスリン刺激性リン酸化を増大し、インスリン刺激に応答して肝臓I Rリン酸化を増大し、それにより、糖尿病マウスの全体的グルコース代謝を改善する。無C a v 1 ( C a v 1 K O )マウスは、通常餌で表現型正常である。しかしながら、高脂肪餌にすると、総脂肪I Rタンパク質レベルの90%低減により立証されるように、I Rシグナル伝達減少のため、インスリン抵抗性を発症する。インスリンシグナル伝達がC a v 1発現におけるm i R - 103 / 107媒介性変化と相關するか否かを調べた。ob / obマウスの脂肪細胞において、抗m i R - 107を用いたm i R - 103 / 107のサイレンシングは、抗mm - 107処置マウス（図8C）と比較して、C a v 1タンパク質レベル増大（図8C）、I R b発現増大、ならびにp A k tレベル増強を生じた。これに対比して、分析の8日前にad - 107 / GFPを腹腔脂肪に注射された野生型マウスは、C a v 1発現の低減ならびにI R bおよびp A K

40

50

T レベル低減を示した（図 8 B ; a d - G F P 注射に対する a d - 1 0 7 / G F P 注射後の相対 C a v 1 発現 0 . 4 ）。組換えアデノウイルスによる肝臓中の m i R - 1 0 7 の過剰発現が肝臓インスリン抵抗性および糖耐性減損をもたらしたため、それらの動物における下流分子インスリンシグナル伝達事象を試験した。C a v 1 のタンパク質レベルおよび p A K T レベルは、 a d - 1 0 7 / G F P 感染野生型マウスの肝臓において減少し、 I R b タンパク質レベルにおいては変化は観察されなかった（図 8 A ）。この結果は、 m i R - 1 0 3 の過剰発現が肝臓インスリン抵抗性を誘導し得ることを示す表現型知見と、ならびに肝臓における I R b レベル低減を示さないが、脂肪細胞における I R b および p A k t レベル低減を示す C a v 1 K O マウスからのデータと一致する。最後に、 C a v 1 発現の変調が m i R - 1 0 3 / 1 0 7 サイレンシング時のインスリンシグナル伝達の増大に関与することを示すために、高脂肪餌肥満マウスまたは C a v 1 K O マウスを、抗 m i R - 1 0 3 または抗 m m - 1 0 7 ( 1 5 m g / k g 抗 m i R 、 1 日 1 回腹腔内、 2 連続日間 ) で処置して、インスリン刺激後のインスリンシグナル伝達の活性化を試験した。 C A V 1 K O マウスの高脂肪餌肥満野生型同腹の脂肪中の m i R - 1 0 3 / 1 0 7 のサイレンシングは I R b の発現増大をもたらしたが、一方、インスリンシグナル伝達の活性化は、抗 m i R - 1 0 3 で処置した高脂肪餌肥満 C a v 1 K O マウスの脂肪においては観察されなかった（図 8 D ）。合わせて考えると、これらのデータは、 m i R - 1 0 3 / 1 0 7 がカベオリン媒介性過程によりインスリン感受性を調節する、ということを実証する。

10

20

30

40

50

#### 【 0 4 3 4 】

##### 実施例 1 2 : 実験方法

統計学的分析 バーは全て、平均  $\pm$  S D を示すが、但し、表 1 0 では、バーは平均  $\pm$  S T E を示す。スチュードント t 検定を用いて、有意を算定した ( p < 0 . 0 5 ; p < 0 . 0 1 ; p < 0 . 0 0 1 ) 。実施例全体を通して、別記しない限り、統計学的有意は、表に示されている : \* = p < 0 . 0 5 ; \*\* = p < 0 . 0 1 ; \*\*\* = p < 0 . 0 0 1 。

#### 【 0 4 3 5 】

R N A 単離およびノーザンプロッティング分析 トリゾール試薬 ( Invitrogen ) を用いて、総 R N A を単離した。 5 ~ 3 0  $\mu$  g の R N A を、 1 5 W o n 1 4 % ポリアクリルアミドゲル上で 1 5 W で分離した ( Krutzfeldt et al ., Nature, 2005, 438, 685-689 ) 。

30

#### 【 0 4 3 6 】

実時間 P C R 2  $\mu$  g の総 R N A を、 Super Script III 逆転写酵素 ( Invitrogen ) を用いて、無作為六量体プライマーでの c D N A 調製のために用いた。 L i g h t C y c l e r 4 8 0 S Y B R G r e e n M a s t e r I M i x ( Roche ) を M  $\times$  3 0 0 5 P 実時間 P C R 系 ( Stratagene ) とともに用いて、定量的実時間 P C R により、定常状態 m R N A 発現を測定した。転写物レベルを、 G A P D H または 3 6 B 4 に正規化した。実時間 P C R に関するプライマー配列は、申し込み次第、入手可能である。 T a q M a n マイクロ R N A 検定を用いて、 m i R - 1 0 3 、 m i R - 1 0 7 または U 6 ( Applied Biosystem ) に関して、 m a R N A レベルを測定して、 P C R 結果を U 6 レベルに正規化した。

#### 【 0 4 3 7 】

ルシフェラーゼ活性の検定 マウスまたはヒト 3 ' U T R 配列を、特定のプライマーで P C R 増幅し、その後、 a t t B アダプタ P C R 処理して、 B P クロナーゼ ( Invitrogen ) を用いて p D O N R 2 2 1 エントリーベクター中にクローン化した。次に、陽性クローンを、二重リビン 1 / ホタル・ルシフェラーゼ p E M 3 9 3 デスティネーションベクター中のホタルルシフェラーゼの停止コドンの後にさらにクローン化した。 H E K - 2 9 3 細胞を、 2 4 ウェルプレート中で培養し、各ウェルを 1 0 0 n g の最終構築物を、 P B S 、あるいは 5 0 n m o l の対照または s i - 1 0 3 二本鎖 s i R N A ( Sigma ) とともに用いて、四重反復実験で、トランスフェクトした。細胞を収穫し、二元的ルシフェラーゼポーター検定系 ( Promega ) を用いてトランスフェクト後 4 2 ~ 4 8 時間に検定した。結

果をリピン 1 ルシフェラーゼ対照に正規化して、対照 P B S の平均値に比して表した。

【 0 4 3 8 】

動物 動物モデルはすべて、無菌動物施設中で、12時間明暗周期で、C 5 7 B 1 / 6 マウスバックグラウンドで保持した。6~8週齢野生型またはレプチン欠乏 (o b / o b) 、あるいは12週齢高脂肪餌 (D I O) マウス (60% 脂肪 (Pvolimi Kliba AG) を8週間給餌) に、P B S 、抗m i R 、a d - G F P またはa d - 1 0 7 / G F P (指示通りに) を尾静脈注射した。抗m i R を、15m g / 体重1k g の用量で、0.2m l / 注射で2連続日、投与した。P B S 0.2m l 中に  $5 \times 10^9$  ブラーク形成単位 (P F U) で、尾静脈を通してアデノウイルスをマウスに注射した。

【 0 4 3 9 】

組換えアデノウイルスの生成 プライマー :

5' - A A T A C C C G C A T G G A A G C A G G C T A A - 3' (配列番号 1 7 ) 10  
および

5' - A A C A T G T C T C A A G G A G G A C G G T - 3' (配列番号 1 8 )  
を有するP C R 増幅m i R N A 前駆体配列を、G F P 発現シャトルベクターA d 5 C M V K - N p A に挿入することにより、m i R - 1 0 7 およびG F P (A d - 1 0 7 / G F P ) を発現するために用いられる組換えアデノウイルスを生成した。導入遺伝子を含有しないA d - G F P (ViraQuest) を、対照として用いた。

【 0 4 4 0 】

アデノウイルス脂肪注射 A d - G F P またはa d - 1 0 7 / G F P を、外科的曝露後に40 $\mu$  l のP B S 中に  $1 \times 10^9$  p f u の濃度で、腹腔脂肪中に注射した。 20

【 0 4 4 1 】

コンピューター断層撮影 皮下および内臓脂肪パッドを、動物C T スキャナー (LaTheta a) を用いてスキャンした。画像を補正し、LaThetaソフトウェアを用いて分析した。

【 0 4 4 2 】

間質 - 血管 (S V ) 分画および一次脂肪細胞の単離 皮下および内臓脂肪からの一次脂肪細胞および (S V ) 分画を、前に記載されたように調製した (Hansen et al. , Mol. Endocrinol. , 1998, 12, 1140-1149 およびTozzo et al. , Am. J. Physiol. , 1995, 268, E95 6-964) 。S V 細胞が80% 集密になったら、インスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチンおよびロシグリタゾンで、脂肪細胞分化を誘導した (Tozzo et al. )。抗m i R を用いて、2および3日目に、5.5 $\mu$  g / 誘導期間の濃度で抗m i R を用いて、細胞を処置した。 30

【 0 4 4 3 】

脂肪細胞分化の自動分析 分化細胞を5% ホルムアルデヒドで固定した後、脂質小滴に關してB O D I P Y で、核に關してヘキストで、サイトゾル染色のためにS y t o 6 0 で染色した (Invitrogen) 。ウェル当たり25枚の画像を自動顕微鏡画像処理システム (CellWorx) で撮影した。細胞プロファイラーソフトウェアを用いて、写真を分析した。

【 0 4 4 4 】

グルコース取込み [ $^{14}$  C ] スパイクグルコース取込みを、20n M インスリン刺激を用いた場合と用いない場合とで、記載されたように (Tozzo et al) 測定した。 40

【 0 4 4 5 】

脂肪細胞サイズ 標準手法 (例えば、Chen and Farese, J. Lipid. Res. , 2002, 43, 9 86-989) に従って、10 $\mu$  m 切片 5% パラホルムアルデヒド固定脂肪組織のヘマトキシリンおよびエオシン染色を実施し、細胞プロファイラーソフトウェアを用いて画像を解析した。少なくとも2000個 / 動物の脂肪細胞を測定して、脂肪細胞サイズを確定した。

【 0 4 4 6 】

グルコース、インスリン、コレステロール、T G およびN E F A 測定 自動糖モニター (Glucometer Elite, Bayer) を用いて、血糖値を測定した。感受性ラットインスリンR I A キット (Linco) を用いて、血漿からインスリンを測定した。標準としてc. f. a. s. (Roche/Hitachi) を用いて、それぞれC h o l またはT r i g / G B 試薬を用い

10

20

30

40

50

て、コレステロールおよびT A Gを測定した。N E F A - H R ( 2 ) R 1 / R 2 S e t (Wako)を用いて、N E F Aを定量した。

【0447】

グルコース、インスリンおよびピルビン酸耐性試験 グルコースおよびピルビン酸塩に関する一晩絶食後(図に示したように)、インスリンに関しては6時間絶食後に、それぞれ、グルコース(生理食塩水中2g/体重1kg)、インスリン(0.75単位/体重1kg)またはピルビン酸塩(生理食塩水中2g/体重1kg)の腹腔内注射により、グルコース、インスリンまたはピルビン酸耐性を試験した。注射前(時間=0)、ならびに注射後15、30、60および120分に、血糖値を測定した。

【0448】

細胞培養、感染およびトランスフェクション H e p a 1 - 6、3 T 3 - L 1またはH E K 2 9 3細胞を、4.5g/リットルのグルコースを含有し、10%F B Sおよびペニシリン/ストレプトマイシンを補足した増殖培地ダルベッコ変法イーグル培地(Invitrogen)中に保持した。H e p a 1 - 6および3 T 3 - L 1を、コラーゲン被覆プレート上に保持した。H e p a 1 - 6を、増殖培地中で36時間、5×10 P F Uウイルスprepの1:1000希釈でa d - G F Pまたはa d - 1 0 7 / G F Pに感染させた。H E K 2 9 3細胞を、増殖培地中で5.5μg/mlの濃度で抗m i Rで、あるいはP B S、s i - 1 0 3またはs i - 1 4 1で、リポフェクタミン2 0 0 0 (Invitrogen)を用いて、トランスフェクトした。

【0449】

ウェスタンブロッティングおよび抗体 細胞を氷冷P B Sで洗浄し、溶解緩衝液(10 mMトリス-H C l、p H 8.0、140 mM N a C l、1%トリトンX-1 0 0、1 mM E D T Aおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche))ならびにH a l tホスファターゼ阻害剤(Thermo Scientific)で4で抽出した。8~12%S D S - P A G Eによりタンパク質を分離し、ニトロセルロースフィルター上に移して、以下の抗体で検出した:マウスモノクローナル抗y-チューブリン(Sigma-Aldrich)、ウサギポリクローナル抗インスリン受容体bサブユニット(C - 1 9):s c - 7 1 1 (I R b);抗-p-インスリン受容体bサブユニット(T y r 1 1 6 2 / 1 1 6 3):s c 2 5 1 0 3 (p-I R b);抗カベオリン1(N 2 0):s c - 8 9 4;および抗-G M 1 0 3(B 1 0):s c - 5 5 5 9 1 (Santa Cruz Biotechnology);抗-p-A K T、抗-A K T、抗-p-S 6 B P;抗-p-G C K 3 (Cell Signaling)。

【0450】

スクロース密度勾配分別およびインスリン刺激 A d - G F Pまたはa d - 1 0 7 / G F P感染H e p a 1 - 6細胞を、増殖培地中で15分間、500 n Mインスリンで刺激した場合としない場合とで、ウシ胎仔血清を含有しないダルベッコ変法イーグル培地中で12時間、血清不足にして、氷冷P B S中に擦り取って、1.5ml均質化緩衝液(250 mMスクロース、4 mM H E P E S、p H 7.4およびプロテアーゼ含有)およびH a l tホスファターゼ阻害剤(Thermo Scientific)中に再懸濁した。細胞懸濁液を密閉加圧容器中で25分間加圧し、1 0 0 0 r p mで10分後に、核周囲上清(P N S)を0.4~2 M連続スクロース密度勾配で上部から負荷し(例えば、Ort et al., Eur. J. Cell Biol., 2000, 79, 621-630)、ベックマン遠心分離器で2 5 0 0 0 r p m(1 0 0 0 0 0 g)で4で18時間、遠心分離した。限界水頭勾配実験のために、P N Sを1:1で8.5%スクロースと混合し、混合物1mlを不連続スクロース勾配で底部から負荷して、最終5%(2ml)、30%(5ml)および42.5%(1ml)スクロースとして、ベックマン遠心分離器を用いて、S W 4 1ローター中で3 9 0 0 0 r p mで4で19時間、遠心分離した。上部から0.5ml分画を収集し、1.5容積のエタノールとともに-80で一晩沈澱させて、70%エタノールで洗浄し、ローディング緩衝液を含有する2×S D S中に再懸濁した。

【0451】

具体的実施形態についての前述の説明は、一般的知識を適用することにより、他の者が

10

20

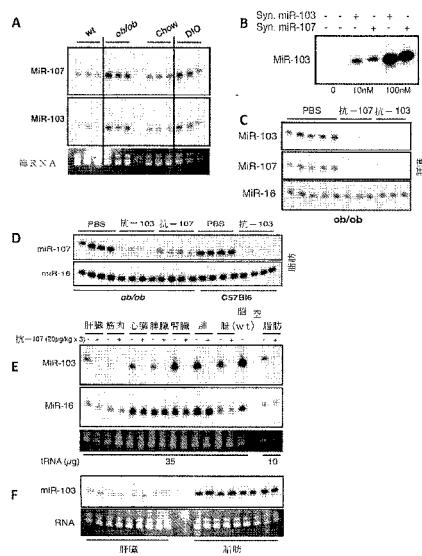
30

40

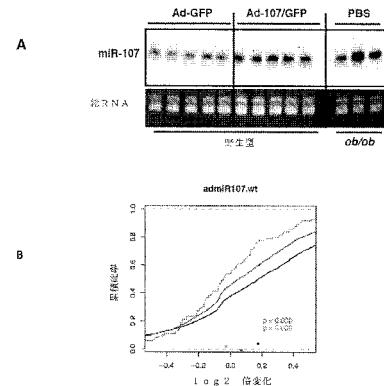
50

、過度の実験を行なうことなく、そして一般的概念を逸脱せずに、種々の用途のためにこのような具体的実施形態を容易に修正し、および／または適合し得るよう、本発明の一般的性質を詳細に明示している。したがって、このような適合および修正は、開示された実施形態と等価の意味および範囲内に包含されるべきであり、そのように意図される。本発明を、具体的実施形態を用いて記載してきたが、多くの代替物、修正および変更がなされ得ることは当業者には明らかである。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広範な範囲内のこののような代替物、修正および変更は全て本発明に包含されるものとする。

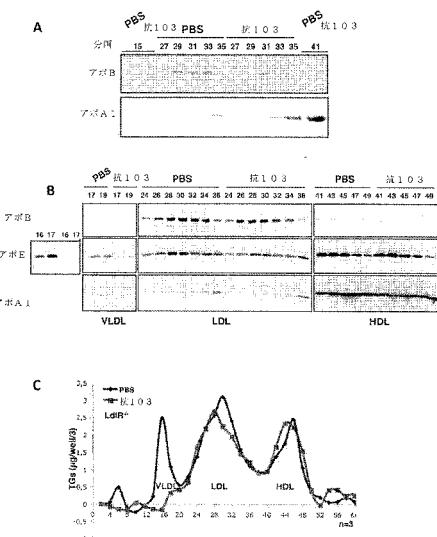
【図1】



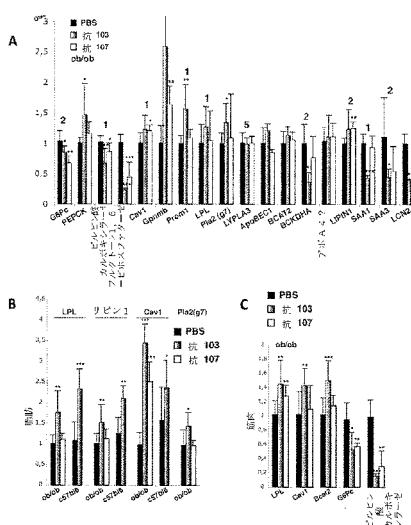
【図2】



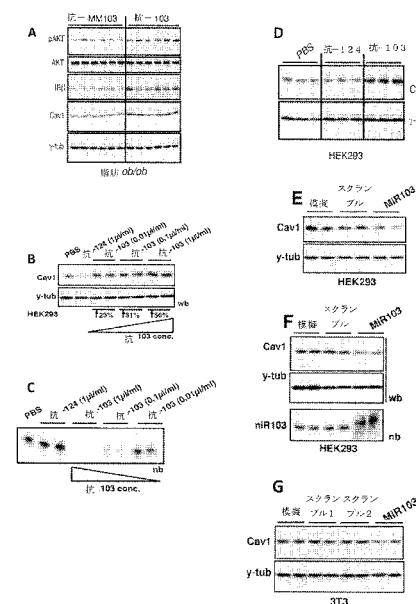
【図3】



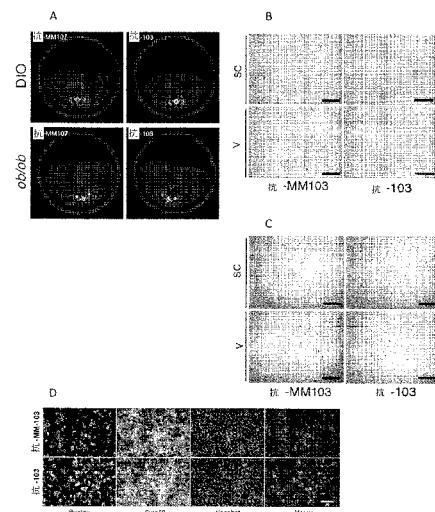
【図4】



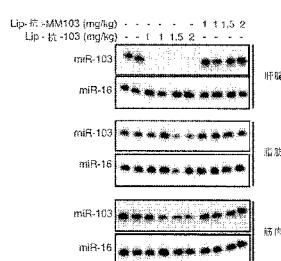
【図5】



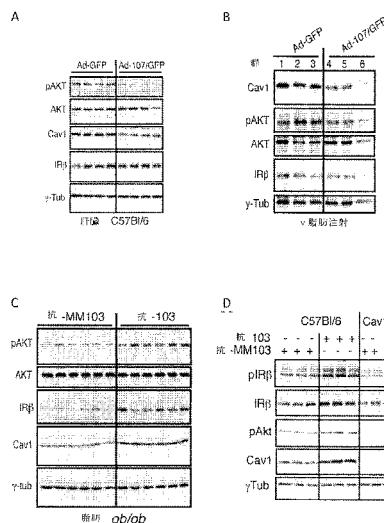
【図7】



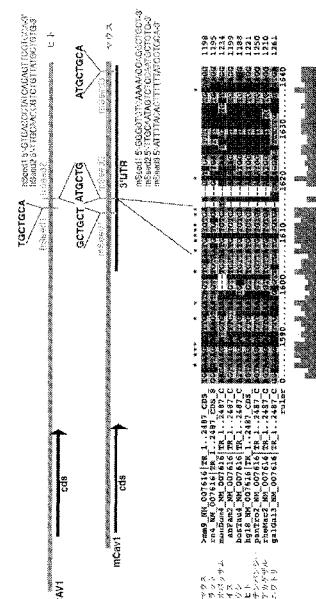
【図6】



【図8】



【図9】



【配列表】

[2012527444000001.app](http://2012527444000001.app)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2010/001384
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N15/113 A61K31/712 A61K31/7125 C1201/68 ADD. C07H21/00 A61P3/06 A61P3/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12N A61K</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) <b>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/013901 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; ESAU CHRISTINE [US]; LOLLO BRIDGET [US]) 17 February 2005 (2005-02-17) page 427; example 40; sequences 324, 328 page 131; example 4	35-44, 55, 61-100
Y	TANG XIAOQING ET AL: "Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic beta cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription" RNA (COLD SPRING HARBOR), vol. 15, no. 2, February 2009 (2009-02), pages 287-293, XP002598119 ISSN: 1355-8382 the whole document	1-37, 45-60, 106-121
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  <b>26 August 2010</b>		Date of mailing of the international search report  <b>07/09/2010</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Andres, Serge</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2010/001384

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIN X ET AL: "MicroRNA expression pattern in different stages of nonalcoholic fatty liver disease" DIGESTIVE AND LIVER DISEASE, vol. 41, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 289-297, XP025983450 ISSN: 1590-8658 the whole document	101-105
Y	WO 2009/043353 A2 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; OBAD SUSANNA [SE]; KAUPPINEN SAKARI [DK]; ELM) 9 April 2009 (2009-04-09) cited in the application the whole document	29-34
Y	WO 2009/043353 A2 (SANTARIS PHARMA AS [DK]; OBAD SUSANNA [SE]; KAUPPINEN SAKARI [DK]; ELM) 9 April 2009 (2009-04-09) cited in the application the whole document	106-121
X	XIE HUANGMING ET AL: "MicroRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity" DIABETES, vol. 58, no. 5, May 2009 (2009-05), pages 1050-1057, XP002598120 ISSN: 0012-1797 the whole document	101-105
A	WILFRED ET AL: "Energizing miRNA research: A review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways" MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, vol. 91, no. 3, 31 May 2007 (2007-05-31), pages 209-217, XP022102850 ISSN: 1096-7192 the whole document	1-121
A	WO 2007/112754 A2 (SANTARIS PHAMA AS [DK]; ELMEN JOACIM [SE]; KEARNEY PHIL [AU]; KAUPPINEN) 11 October 2007 (2007-10-11) cited in the application page 95; sequences 40, 43	1-121
T	HERRERA B M ET AL: "Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes" DIABETOLOGIA ; CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM, vol. 53, no. 6, 3 March 2010 (2010-03-03), pages 1099-1109, XP019797135 ISSN: 1432-0428	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/IB2010/001384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2005013901	A2 17-02-2005	CA 2533701 A1		17-02-2005
		EP 1648914 A2		26-04-2006
		US 2006252722 A1		09-11-2006
		US 2009317907 A1		24-12-2009
		US 2009298174 A1		03-12-2009
		US 2009286969 A1		19-11-2009
		US 2009291906 A1		26-11-2009
		US 2009291907 A1		26-11-2009
		US 2005261218 A1		24-11-2005
WO 2009043353	A2 09-04-2009	AU 2008306327 A1		09-04-2009
		CA 2701547 A1		09-04-2009
		WO 2009043354 A2		09-04-2009
		EP 2205737 A2		14-07-2010
		EP 2203559 A2		07-07-2010
		US 2009143326 A1		04-06-2009
WO 2007112754	A2 11-10-2007	AU 2007234191 A1		11-10-2007
		AU 2007234192 A1		11-10-2007
		CA 2648132 A1		11-10-2007
		CA 2649045 A1		11-10-2007
		WO 2007112753 A2		11-10-2007
		EA 200870402 A1		28-04-2009
		EP 2007888 A2		31-12-2008
		EP 2007889 A2		31-12-2008
		EP 2194129 A2		09-06-2010
		JP 2009532044 T		10-09-2009
		JP 2009532392 T		10-09-2009
		KR 20080108154 A		11-12-2008
		US 2010004320 A1		07-01-2010

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 31/7125 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7125	
<b>A 6 1 K 31/712 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/712	
<b>A 6 1 P 3/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/04	
<b>A 6 1 P 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>G 0 1 N 33/66 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/66	A
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>C 1 2 N 15/113 (2010.01)</b>	C 1 2 N 15/00	G
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,S,E,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,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA11 DA02 GA11 HA14 HA17  
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ52 QR35 QR40 QR72 QS34  
 4C084 AA13 AA17 MA52 MA55 MA65 MA66 NA14 ZA42 ZA70 ZC01  
 ZC33 ZC35  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA52 MA55 MA65 MA66 NA14  
 ZA42 ZA70 ZC01 ZC33 ZC35