

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5809146号
(P5809146)

(45) 発行日 平成27年11月10日 (2015.11.10)

(24) 登録日 平成27年9月18日 (2015.9.18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)
A 6 1 K 31/7115 (2006.01)
A 6 1 K 31/712 (2006.01)
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)
A 6 1 P 25/14 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G
A 6 1 K 31/7115
A 6 1 K 31/712
A 6 1 K 31/7125
A 6 1 P 25/14

請求項の数 8 (全 113 頁)

(21) 出願番号 特願2012-528949 (P2012-528949)
(86) (22) 出願日 平成22年9月10日 (2010.9.10)
(65) 公表番号 特表2013-504329 (P2013-504329A)
(43) 公表日 平成25年2月7日 (2013.2.7)
(86) 国際出願番号 PCT/US2010/048532
(87) 国際公開番号 W02011/032045
(87) 国際公開日 平成23年3月17日 (2011.3.17)
審査請求日 平成25年9月10日 (2013.9.10)
(31) 優先権主張番号 61/241, 853
(32) 優先日 平成21年9月11日 (2009.9.11)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 595104323
アイシス ファーマシューティカルズ、
インコーポレーテッド
アメリカ合衆国カリフォルニア州9201
0, カールズバッド, ガゼル コート 2
855
(74) 代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74) 代理人 100092967
弁理士 星野 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハンチンチン発現の修飾

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハンチンチンをコードする核酸を標的とする、ハンチンチンの発現を阻害可能な、修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物であって、

10個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

5個の連結したヌクレオシドからなる5'ウィング部分；そして

5個の連結したヌクレオシドからなる3'ウィング部分；

を含み、

ここでギャップ部分は、5'ウィング部分と3'ウィング部分との間に位置し、

それぞれのウィング部分のそれぞれのヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル糖を含み、

ギャップ部分内のヌクレオシド間結合、ギャップ部分を5'ウィング部分又は3'ウィング部分に接続する結合、及び各ウィング部分の最も5'側のヌクレオシド及び最も3'側のヌクレオシドが全てホスホロチオエート結合であり、5'ウィング部分及び3'ウィング部分の両方のヌクレオシドの残りを接続するヌクレオシド間結合が、ホスホジエステル結合であり、

すべてのシトシンが5-メチルシトシンであり、

オリゴヌクレオチドがSEQ ID NO:22 に記載された配列からなる、化合物。

【請求項 2】

ハンチンチンをコードする核酸を標的とする、ハンチンチンの発現を阻害可能な、修飾

10

20

されたオリゴヌクレオチドを含む化合物であって、

10個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

5個の連結したヌクレオシドからなる5'ウイング部分；そして

5個の連結したヌクレオシドからなる3'ウイング部分；

を含み、

ここでギャップ部分は、5'ウイング部分と3'ウイング部分との間に位置し、

それぞれのウイング部分のそれぞれのヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル糖を含み、

ギャップ部分内のヌクレオシド間結合、ギャップ部分を5'ウイング部分又は3'ウイング部分に接続する結合、及び各ウイング部分の最も5'側のヌクレオシド及び最も3'側のヌクレオシドが全てホスホロチオエート結合であり、5'ウイング部分及び3'ウイング部分の両方のヌクレオシドの残りを接続するヌクレオシド間結合が、ホスホジエステル結合であり

10

すべてのシトシンが5-メチルシトシンであり、

オリゴヌクレオチドがSEQ ID NO:32 に記載された配列からなる、
化合物。

【請求項3】

前記オリゴヌクレオチドが複合体化している、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかの化合物またはその塩、および少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む、組成物。

20

【請求項5】

ハンチントン病を有するヒトを治療するための、請求項1～4のいずれかに記載される化合物または組成物を含む、医薬組成物。

【請求項6】

ハンチントン病の進行を予防し、処置し、軽減しまたは遅らせるための、請求項1～4のいずれかに記載される化合物または組成物を含む、医薬組成物。

【請求項7】

医薬組成物が、ヒトにおける情動不安、協調不足、意図せず開始される運動、意図せず完了されない運動、歩行不安定、舞蹈病、硬直、身もだえするような運動、異常姿勢、不安定性、異常な顔貌、そしゃく困難、嚥下困難、発話困難、発作、睡眠障害、計画性低下、柔軟性低下、抽象的思考低下、ルール習得低下、適切な動作の開始の低下、不適切な動作の阻害の低下、短期記憶の低下、長期記憶の低下、パラノイア、見当識障害、精神錯乱、幻覚、認知症、不安、抑鬱症、感情鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、易刺激性、自殺念慮、脳容量の低下、筋萎縮、心不全、グルコース耐性の低下、体重減少、骨粗鬆症、および精巣萎縮の少なくとも1つを減少させる、請求項5又は請求項6に記載の医薬組成物。

30

【請求項8】

医薬組成物がCNSに対して投与される、請求項5～7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

配列表

本件出願は、電子フォーマットの配列表とともに出願される。配列表は、2010年9月8日に作成された456 Kbのサイズの「BIOL0113WOSEQ.txt」という名前のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマット中の情報は、その全体を参照により本明細書中に援用される。

発明の分野

動物におけるハンチンチンmRNAおよびタンパク質発現を現象させるための方法、化合物、および組成物が本明細書中で提供される。そのような方法、化合物、および組成物は、たとえば、ハンチントン病を治療し、予防し、または改善するために有用である。

50

【背景技術】

【0002】

ハンチントン病(HD)は、ハンチンチンタンパク質中において異常な長いポリグルタミン(PolyQ)管をコードするCAGトリヌクレオチドリピートの発現により引き起こされる、破壊的な常染色体性優性、神経変性性疾患である。ハンチントン病遺伝子は、1993年に初めてマッピングされ(The Huntington's disease Collaborative Research Group. Cell. 1993, 72:971-83)、遺伝子、IT15、からなり、それがHD染色体上に広がりそして不安定である多型トリヌクレオチドリピートを含有していた。正常サイズ範囲のCAGリピートは、メンデルの対立遺伝子として通常は遺伝するが、拡張したHDリピートは、減数分裂遺伝を通じて不安定であり、そしてHD患者において正常サイズ範囲(6~34リピート単位)を超えて拡張していることが見いだされた。

10

【0003】

正常のハンチンチンタンパク質および変異型ハンチンチンタンパク質は両方とも、主としてニューロンの細胞質に局在している(DiFiglia et al., Neuron 1995, 14:1075-81)。過剰なポリグルタミン長の結果として、ハンチンチンタンパク質CNSニューロンの細胞質中および核中で凝集物を形成する(Davies et al., Cell 1997, 90:537-548)。トランスジェニック動物および遺伝子修飾細胞株を両方とも使用して、拡張されたpolyQリピートのハンチンチンの局在およびプロセッシングに対する作用を調べた。しかしながら、凝集物自体の形成が本質的に細胞傷害性の工程であるか、あるいは細胞機能障害の結果であるかどうかは、依然としてわかっていない。

20

【0004】

HDは、進行性の舞蹈病、精神医学的变化、および知能低下により特徴付けられる。この優性症状は、男性および女性に等しく影響を与え、そしてすべての種族において生じる(Gusella and MacDonald, Curr. Opin. Neurobiol. 1995 5:656-62)。HDの症候は、多くの脳領域におけるニューロンの死のためであるが、大脳基底核線条体、特に尾状核、において最も一般的であり、それは進行性の細胞喪失の勾配を生じ、それが究極的には全体の構造を破壊する。ハンチンチンをコードする遺伝子は偏在性で発現されるが(Strong, T. V. et al., Nat. Genet. 1995, 5:259-263)、選択的細胞喪失および繊維性星状細胞増加症が脳内、特に大脳基底核線条体の尾部および被殻において、そしてHD患者の大脳皮質において(Vonsattel, J-P. et al., Neuropathol. Exp. Neurol. 1985, 44:559-577)、そしてより低い程度で、海馬において(Spargo, E. et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1993, 56:487-491)、そして視床腹部において(Byers, R.K. et al., Neurology 1973, 23:561-569)、観察される。

30

【0005】

ハンチンチンは、正常な発生に必須であり、そして細胞生存遺伝子と考えることができる(Nasir et al., Human Molecular Genetics, Vol 5, 1431-1435)。ハンチンチンの正常な機能は、不完全に特定された状態のままであるが、タンパク質-タンパク質相互作用に基づいて、細胞骨格に結合しているようであり、そして神経発生に必要とされる様である(Walling et al., J. Neurosci Res. 1998, 54:301-8)。ハンチンチンは、アポトーシス細胞死の中心的な働きをすることが知られている重要なシステインプロテアーゼ、アポパイン、により、アポトーシスにより特異的に切断される。切断速度は、より長いポリグルタミン束により切断されるが、このことは、不適切なアポトーシスがHDの基礎にあることを示唆している。

40

【0006】

アンチセンス技術は、特定の遺伝子産物の発現を減少させるための有効な手段として生じており、そしてしたがって、ハンチンチン発現の修飾のために、多数の治療用途、診断用途、および研究用途において有用であることを証明することができる(U.S. Patent Publication Nos. 2008/0039418および2007/0299027)。

【0007】

ハンチンチンの発現を修飾するアンチセンス化合物は、上述した発行された特許出願に

50

において開示される。しかしながら、追加的なそのような化合物についての必要で在り続ける。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】U.S. Patent Publication No. 2008/0039418

【特許文献2】U.S. Patent Publication No. 2007/0299027

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】The Huntington's disease Collaborative Research Group. Cell. 1993, 72:971-83 10

【非特許文献2】DiFiglia et al., Neuron 1995, 14:1075-81

【非特許文献3】Davies et al., Cell 1997, 90:537-548

【非特許文献4】Gusella and MacDonald, Curr. Opin. Neurobiol. 1995 5:656-62

【非特許文献5】Strong, T.V. et al., Nat. Genet. 1995, 5:259-263

【非特許文献6】Vonsattel, J-P. et al., Neuropathol. Exp. Neurol. 1985, 44:559-577

【非特許文献7】Spargo, E. et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1993, 56:487-491

【非特許文献8】Byers, R.K. et al., Neurology 1973, 23:561-569 20

【非特許文献9】Nasir et al., Human Molecular Genetics, Vol 5, 1431-1435

【非特許文献10】Walling et al., J. Neurosci Res. 1998, 54:301-8

【発明の概要】

【0010】

ハンチンチンの発現を修飾し、そしてハンチントン病および/またはその症状を治療し、予防し、遅らせ、または軽減するための、方法、化合物、および組成物を、本明細書中で提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1：線条体内組織内でのハンチンチンmRNA発現の、マウス脳内でのISIS 387898濃度とのPK/PD関連性。C57/BL6マウスに、1回ボールの50 μ gのISIS 387898を投与し、そして組織内におけるハンチンチンmRNA発現並びにアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。ISIS 387898のEC₅₀も算出した。 30

【図2】図2：線条体内組織におけるハンチンチンmRNA発現と、様々な時点でのISIS 387898濃度の比較。C57/BL6マウスに1回ボールの50 μ gのISIS 387898を投与し、そして組織内におけるハンチンチンmRNA発現並びにアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。ISIS 387898の作用期間（htt mRNA発現により測定したもの）（点線）は、組織内におけるオリゴヌクレオチドの濃度（実線）の後もより長く観察された。

【図3】図3：前頭皮質組織におけるハンチンチンmRNA発現の、マウス脳におけるISIS 387898濃度とのPK/PD関連性。BACHDマウスに75 μ gのISIS 387898の脳室内注入を2週間投与し、そしてハンチンチンmRNA発現並びに組織内におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。ISIS 387898のEC₅₀もまた算出した。 40

【図4】図4：前頭皮質組織におけるハンチンチンmRNA発現と、様々な時点でのISIS 387898濃度の比較。BACHDマウスに75 μ gのISIS 387898の脳室内注入を2週間投与し、そしてハンチンチンmRNA発現並びに組織内におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。ISIS 387898の作用期間（htt mRNA発現により測定したもの）（点線）は、組織内におけるオリゴヌクレオチドの濃度（実線）の後もより長く観察された。

【図5】図5：後部皮質組織におけるハンチンチンmRNA発現と、様々な時点でのISIS 388241濃度の比較。BACHDマウスに50 μ gのISIS 388241の脳室内注入を2週間投与し、そしてハンチンチンmRNA発現並びに組織内におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定 50

した。ISIS 388241の作用期間 (htt mRNA 発現により測定したもの) (点線) は、組織内におけるオリゴヌクレオチドの濃度 (実線) の後もより長く観察された。

【図6】図6:後部皮質組織におけるハンチンチンmRNA発現と、様々な時点でのISIS 443139濃度の比較。BACHDマウスに50 µgのISIS 443139の脳室内注入を2週間投与し、そしてハンチンチンmRNA発現並びに組織内におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を測定した。ISIS 443139の作用期間 (htt mRNA 発現により測定したもの) (点線) は、組織内におけるオリゴヌクレオチドの濃度 (実線) の後もより長く観察された。

【図7】図7:ローターロッドアッセイを使用した、BACHDマウスの運動筋肉能力に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の作用。BACHDマウスを、50 µg/日ICVのISIS 388241またはPBSにより、2週間処置した。非-トランスジェニック同腹子の対照群を、ISIS 388241またはPBSを用いて同様に処置した。その後、速度を上げるローターロッドアッセイを行った。動物を2 RPMの速度のローターロッド上に配した;ローターロッドを5分間かけて40 RPMにまで加速させた。落下するまでの期間を記録した。6ヶ月齢での基準値を処置の前に取り、そして所定の時点は、アッセイを行った時のマウスの齢である。バーは、ISIS 388241で処置されたBACHDマウスにより (黒); PBSで処置されたBACHDマウスにより (ハッシュ化); およびPBSで処置された非-トランスジェニック同腹子により (白); 落下するまでの期間を秒で示したものである。ISIS 388241-処置マウスは、落下するまでの期間が長いことが示され、そしてしたがって、PBS対照と比較して、ローターロッド上での運動筋肉能力が改善されたことが示された。

【図8】図8:アンチセンスオリゴヌクレオチド処置のR6/2マウスの脳重量に対する作用。6ヶ月齢のR6/2マウスを、50 µg/日ICVのISIS 388817または対照オリゴヌクレオチドISIS 141923またはPBSにより4週間処置した。非-トランスジェニック同腹子の対照群を、ISIS 388817またはPBSを用いて同様に処置した。8週齢の症状を発生する前のR6/2マウスの対照群を研究に含ませ、そして何も処置を与えなかった。バーは、8週齢の非処置R6/2マウス; ISIS 141923で処置したR6/2マウス; PBSで処置したR6/2マウス; ISIS 388817で処置したR6/2マウス; PBSで処置した非-トランスジェニック同腹子; そしてISIS 388817で処置した非-トランスジェニック同腹子; の脳重量を示す。PBS対照と比較して、ISIS 388817で処置したR6/2マウスの脳重量に増加が見られた。

【図9】図9:オープンフィールドアッセイを用いた、アンチセンスオリゴヌクレオチド-処置したYAC128マウスの行動特性決定。5ヶ月齢のYAC128マウスを、50 µg/日のICVのISIS 388241または対照オリゴヌクレオチドISIS 141923またはPBSを用いて14日間処置した。非-トランスジェニックFVB/NJ 同腹子の対照群を研究に含ませ、そして何も処置を与えなかった。マウスをオープンフィールドアリーナに配置し、光ビームの中断を使用して、30分のテストセッションにわたり水平移動および垂直移動を測定する。データは、活性モニターソフトウェアを使用して解析し、アリーナ内での全歩行 (回廊) 移動とアリーナ中央部内での移動とを、不安の測定値として調べた。バーは、FVB/NJマウス、PBSで処置したYAC128、そしてISIS 388241で処置したYAC128マウスが、フィールド中央部で過ごした秒数を示す。ISIS 388241で処置したYAC128マウスは、中央部でより長い時間を過ごし、そしてしたがって、PBS対照と比較して、不安-の傾向がより低いとみなされた。

【図10】図10:高架式十字迷路アッセイを用いた、アンチセンスオリゴヌクレオチド-処置したYAC128マウスの行動特性決定。5ヶ月齢のYAC128マウスを、50 µg/日ICVのISIS 388241または対照オリゴヌクレオチドISIS 141923により、またはPBSにより、14日間処置した。非-トランスジェニックFVB/NJ同腹子の対照群を、非処置対照として含ませた。マウスを、それぞれが65×6.25 cmおよび地面から上50 cmに持ち上げられた部分を測定する、2本の開放されたアーム部および2本の閉じられたアーム部からなる装置の中央部に配置された。装置上でのマウスの位置および開放されたアーム部で過ごした時間の量を5分間のテストセッションにわたり、不安の測定値として記録した。バーは、FVB/NJ対照、PBSで処置したYAC128、およびISIS 388241で処置したYAC128マウスが、開放されたアーム部で過ごした時間の割合を示す。ISIS 388241で処置したYAC128マウスは、開放されたアーム部でより長い時間を過ごし、そしてしたがってPBS対照と比較して、不安-の傾向がより

10

20

30

40

50

低いとみなされた。

【発明を実施するための形態】

【0012】

上述の一般的な記載および以下の詳細な記載の両方共例示的で説明のためのものであり、そして請求項に記載された発明を限定するものではないことが理解されるべきである。本明細書中において、単数形の使用には、そうではないと記載されていない限り、複数形も含まれる。本明細書中で使用する場合、“または”の使用は、そうではないと記載されていない限り、“および/または”を意味する。さらに、用語“含む”並びにたとえば“が含まれる”および“含む”などのその他の形態の使用は、限定的ではない。同様に、“構成要素”または“成分”などの用語は、そうではないと記載されていない限り、1ユニ

10

【0013】

本明細書中で使用される節の見出しは、組織化の目的のためのものであり、そして記載される主題を限定するものとは解釈されない。特許、特許出願、文献、書籍、および論文を含む（しかしこれらに限定されない）、本件出願で引用されるすべての文献、または文献の部分、は、本明細書中で検討された文献の部分並びにそれらの全体を参照することにより、明示的に援用される。

【0014】

定義

20

具体的な定義が提示されない場合、本明細書中で記載される、関連して使用される用語体系、そしてその手法および技術、分析化学、合成有機化学、そして医薬および製薬化学は、当該技術分野において周知のものであり、そして一般的に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成、および化学解析のために使用することができる。許容される場合、すべての特許、出願、公開された出願およびその他の刊行物、GENBANKアクセッションNumbersおよびNational Center for Biotechnology Information (NCBI)などのデータベースを介して得ることができる関連する配列情報や本明細書中の開示全体を参照したその他のデータは、本明細書中で検討された文献の部分、ならびにその全体を参照することにより援用される。

【0015】

30

そうではないと示されない限り、以下の用語は、以下の意味を有る：

“2'-O-メトキシエチル”（同様に2'-MOEおよび2'-O(CH₂)₂-OCH₃）は、フロシル環の2'位のO-メトキシ-エチル修飾のことをいう。2'-O-メトキシエチル修飾糖は、修飾糖である。

【0016】

“2'-O-メトキシエチルヌクレオチド”は、2'-O-メトキシエチル修飾糖成分を含むヌクレオチドを意味する。

“5-メチルシトシン”は、5'位に結合されたメチル基により修飾されたシトシンを意味する。5-メチルシトシンは、修飾核酸塩基である。

【0017】

40

“活性医薬剤”は、個体に問うよされた場合に治療的利益をもたらす医薬組成物中の物質または複数の物質を意味する。たとえば、特定の態様において、ハンチンチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、活性医薬剤である。

【0018】

“活性標的領域”または“標的領域”は、1またはそれ以上の活性アンチセンス化合物が標的とする領域を意味する。“活性アンチセンス化合物”は、標的核酸レベルまたはタンパク質レベルを低下させるアンチセンス化合物を意味する。

【0019】

“付随して投与する”は、2種類の薬剤の両方ともの薬理学的作用が患者の体内で同時に現れる、2種類の薬剤を何らかの手法で同時に投与することを意味する。付随的な投与

50

は、両方の薬剤が、単一の医薬組成物中で投与されること、同一の投与剤形中で投与されること、または同一の投与経路により投与されること、は必要とされない。両方の薬剤の作用は、同時に現れることを必要としない。この作用は、期間について重複することのみを必要とし、そして同一の外延を有することを必要としない。

【0020】

“投与する”は、医薬剤を個体に対して提供することを意味し、そして医療専門家による投与および自分での投与が含まれる（しかし、これらには限定されない）。

“軽減”は、関連する疾患、症状、または状態少なくとも1つの指標、兆候、または症状を少なくすることをいう。指標の重大性は、主観的測定または客観的測定により決定することができ、当業者には公知である。

10

【0021】

“動物”は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、およびサルおよびチンパンジーを含む（しかしこれらには限定されない）非-ヒト類人猿、を含む（しかしこれらには限定されない）、ヒトまたは非-ヒト動物のことをいう。

【0022】

“アンチセンス活性”は、その標的核酸に対するアンチセンス化合物のハイブリダイズに寄与する検出可能なまたは測定可能な活性を意味する。特定の態様において、アンチセンス活性は、標的核酸またはそのような標的核酸によりコードされるタンパク質の量または発現の減少である。

【0023】

20

“アンチセンス化合物”は、水素結合を介して標的核酸に対するハイブリダイゼーションを生じることができるオリゴマー化合物を意味する。

“アンチセンス阻害”は、アンチセンス化合物の非存在下での標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルと比較して、標的核酸と相補的なアンチセンス化合物の存在下での標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルが減少することを意味する。

【0024】

“アンチセンスオリゴヌクレオチド”は、標的核酸の対応する領域またはセグメントに対する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一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

【0025】

30

“2環糖”は、2つの非-ジェミナル（geminal；一つの原子に同種原子が二つ結合した）環原子の架橋により修飾されたフロシル環を意味する。2環糖は、修飾糖である。

“2環式核酸”または“BNA”は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドを意味し、ここでヌクレオシドまたはヌクレオチドのフラノース部分に、フラノース環上の2つの炭素原子を接続し、それにより2環式環系を形成するブリッジが含まれる。

【0026】

“キャップ構造”または“末端キャップ成分”は、アンチセンス化合物のいずれかの末端に取り込まれた化学修飾を意味する。

“化学的に異なる領域”は、ある場合には同一のアンチセンス化合物の別の領域とは化学的に異なる、アンチセンス化合物の領域のことをいう。たとえば、2'-O-メトキシエチルヌクレオチドを有する領域は、2'-O-メトキシエチル修飾を有さないヌクレオチドを有する領域とは化学的に異なる。

40

【0027】

“キメラアンチセンス化合物”は、少なくとも2つの化学的に異なる領域を有するアンチセンス化合物を意味する。

“同時投与”は、2つまたはそれ以上の医薬剤を個体に対して投与することを意味する。2つまたはそれ以上の医薬剤は、単一の医薬組成物中の物であっても、または別個の医薬組成物中の物であってもよい。2つまたはそれ以上の医薬剤のそれぞれを、同一のまたは異なる投与経路を介して投与することができる。同時投与は、同時並行的な投与または連続的な投与を意味する。

50

【 0 0 2 8 】

“ 相補性 ” は、第1の核酸の核酸塩基と第2の核酸の核酸塩基との間の対合の能力のことを意味する。

“ 隣接する核酸塩基 ” は、互いにすぐとなりあう核酸塩基を意味する。

【 0 0 2 9 】

“ 希釈剤 ” は、薬理学的活性を欠損するが、しかし医薬的に必要であるかまたは所望される有効成分組成物を意味する。たとえば、注射された組成物中の希釈剤は、たとえば、生理食塩水溶液などの液体であってもよい。

【 0 0 3 0 】

“ 投与量 ” は、単回投与で、または特定の期間で、与えられる特定量の医薬剤を意味する。特定の態様において、投与量は、1、2、またはそれ以上のボールス、錠剤、または注射で投与することができる。たとえば、皮下投与が好ましい特定の態様において、所望される投与量は、単回注射により容易には適合されない用量を必要とし、したがって、2つまたはそれ以上の注射を使用して所望の投与量を達成することができる。特定の態様において、医薬剤は、延長された期間にわたりまたは連続的に、注入により投与される。投与量は、時間、日数、週数、または月数あたりの医薬剤の量として言及することができる。

10

【 0 0 3 1 】

“ 有効量 ” は、その活性医薬剤を必要とする個体において所望の生理学的結果をもたらすために十分な活性医薬剤の量を意味する。有効量は、治療される個体の健康状態および身体的状態、治療される個体の分類学上のグループ、組成物の製剤化、個体の医学的状態の評価、およびその他の関連する因子、に依存して、個体間で変化してもよい。

20

【 0 0 3 2 】

“ ハンチンチン核酸 ” は、ハンチンチンをコードするいずれかの核酸を意味する。たとえば、特定の態様において、ハンチンチン核酸には、ハンチンチンをコードするDNA配列、ハンチンチンをコードするDNA（イントロンおよびエクソンを含むゲノムDNAを含む）から転写されるRNA配列、およびハンチンチンをコードするmRNA配列、が含まれる。“ ハンチンチンmRNA ” は、ハンチンチンタンパク質をコードするmRNAを意味する。

【 0 0 3 3 】

“ 完全に相補的な ” または “ 100%相補的な ” は、第1の核酸の核酸塩基配列のそれぞれの核酸塩基が、第2の核酸の第2の核酸塩基配列における相補的な核酸塩基を有することを意味する。特定の態様において、第1の核酸は、アンチセンス化合物であり、そして標的核酸が第2の核酸である。

30

【 0 0 3 4 】

“ ギャップマー ” は、RNase H切断をサポートする複数のヌクレオシドを有する内部領域が、1またはそれ以上のヌクレオシドを有する外部領域の間に位置しているキメラアンチセンス化合物であり、ここで内部領域を含むヌクレオシドがヌクレオシドとは化学的に異なるものであるか、または外部領域を含むヌクレオシドである。内部領域は、“ ギャップセグメント ” と呼ばれる場合があり、そして外部領域は “ ウィングセグメント ” と呼ばれる場合がある。

【 0 0 3 5 】

“ ギャップ-が広がった ” は、1~6個のヌクレオシドを有する5'ウィング部分と3'ウィング部分の間にありそしてすぐに隣接して位置する、12個またはそれ以上の隣接する2'-デオキシリボヌクレオシドのギャップ部分を有するキメラアンチセンス化合物を意味する。

40

【 0 0 3 6 】

“ ハイブリダイゼーション ” は、相補的核酸分子のアニールリングを意味する。特定の態様において、相補的な核酸分子には、アンチセンス化合物および標的核酸が含まれる。

“ すぐに隣接する ” は、すぐに隣接する要素間に、介在性の要素が存在しないことを意味する。

【 0 0 3 7 】

50

“ 個体 ” は、処置または治療のために選択されるヒトまたは非-ヒト動物を意味する。

“ ヌクレオシド間結合 ” は、ヌクレオシド間の化学的結合のことをいう。

“ 連結したヌクレオシド ” は、互いに結合された隣接するヌクレオシドのことを意味する。

【 0 0 3 8 】

“ ミスマッチ ” または “ 非-相補的核酸塩基 ” は、第1の核酸の核酸塩基が第二の核酸または標的核酸の対応する核酸塩基と対合することができない場合をいう。

“ 修飾ヌクレオシド間結合 ” は、天然に生じるヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換またはいずれかの変化をいう。

【 0 0 3 9 】

“ 修飾核酸塩基 ” は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、またはウラシル以外のいずれかの核酸塩基をいう。“ 非修飾核酸塩基 ” は、プリン塩基アデニン（A）およびグアニン（G）、そして、ピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）を意味する。

【 0 0 4 0 】

“ 修飾ヌクレオチド ” は、独立して、修飾糖成分、修飾ヌクレオシド間結合、または修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。“ 修飾核酸塩基 ” は、独立して、修飾糖成分または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

【 0 0 4 1 】

“ 修飾されたオリゴヌクレオチド ” は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを意味する。

“ 修飾糖 ” は、天然糖からの置換または変化のことをいう。

【 0 0 4 2 】

“ モチーフ ” は、アンチセンス化合物中の化学的に異なる領域のパターンを意味する。

“ 天然に生じるヌクレオシド間結合 ” は、3' から5' へのホスホジエステル結合を意味する。

【 0 0 4 3 】

“ 天然の糖成分 ” は、DNA（2'-H）またはRNA（2'-OH）中に見いだされる糖を意味する。

“ 核酸 ” は、モノマーヌクレオチドから構成される分子をいう。核酸には、リボ核酸（RNA）、デオキシリボ核酸（DNA）、一本鎖核酸、二本鎖核酸、低分子干渉リボ核酸（siRNA）、およびmicroRNA（miRNA）が含まれる。核酸はまた、単一分子内に、これらの要素の組み合わせを含んでもよい。

【 0 0 4 4 】

“ 核酸塩基 ” は、別の核酸の塩基と対合することができるヘテロ環式成分を意味する。

“ 核酸塩基配列 ” は、いずれかの糖、結合、または核酸塩基修飾とは無関係な隣接した核酸塩基の順番を意味する。

【 0 0 4 5 】

“ ヌクレオシド ” は、糖に結合した核酸塩基を意味する。

“ ヌクレオチド ” は、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したホスホネート基を有するヌクレオチドを意味する。

【 0 0 4 6 】

“ オリゴマー化合物 ” または “ オリゴマー ” は、核酸分子の少なくとも領域とハイブリダイゼーションすることができる、結合したモノマーサブユニットのポリマーを意味する。

【 0 0 4 7 】

“ オリゴヌクレオチド ” は、互いに独立して修飾されていても修飾されていなくてもよい、連結したヌクレオシドのポリマーを意味する。

“ 非経口投与 ” は、注射または注入を介した投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または頭蓋内投与、たとえば、

10

20

30

40

50

くも膜下腔投与または脳室内投与が含まれる。投与は、連続的、または慢性的、または短時間、または断続的であってもよい。

【0048】

“ペプチド”は、少なくとも2つのアミノ酸がアミド結合により結合することにより形成される分子を意味する。ペプチドは、ポリペプチドおよびタンパク質をいう。

“医薬組成物”は、個体に対して投与するために適切な物質の混合物を意味する。たとえば、医薬組成物は、1またはそれ以上の活性医薬剤および滅菌水溶液を含んでもよい。

【0049】

“医薬的に許容可能な塩”は、アンチセンス化合物の、生理学的にそして医薬的に許容可能な塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの所望の生物学的活性を残し、そして親オリゴヌクレオチドに対して所望されない毒物学的作用を付与しない塩、を意味する。

10

【0050】

“ホスホロチオエート結合”は、ホスホジエステル結合が非-架橋性酸素原子の一つがイオウ原子と置換することにより修飾される、ヌクレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【0051】

“部分”は、核酸の規定数の隣接する（すなわち、結合した）核酸塩基を意味する。特定の態様において、部分は、標的核酸の規定数のこの隣接した核酸塩基である。特定の態様において、部分は、アンチセンス化合物の規定数の個の隣接した核酸塩基である。

【0052】

20

“予防する”は、数分から無期限までの期間、疾患、障害、または疾患の始まりまたは発症を遅らせまたは未然に防ぐことをいう。“予防する”はまた、疾患、障害、または症状の発症のリスクを軽減することとも意味する。

【0053】

“プロドラッグ”は、内在性の酵素またはその他の化学物質または条件の作用により、生体内または生体の細胞内において活性化型に変換される、活性化型で調整される治療剤を意味する。

【0054】

“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。特定の態様において、副作用には、注射部位反応、肝臓機能試験異常、腎臓機能異常、肝臓毒性、腎臓毒性、中枢神経系異常、筋症、および不快感が含まれる。たとえば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベルの増加が、肝臓毒性または肝臓機能異常を示唆する可能性がある。たとえば、ビリルビンの増加は、肝臓毒性または肝臓機能異常を示唆することができる。

30

【0055】

“一本鎖オリゴヌクレオチド”は、相補鎖に対してハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドを意味する。

“特異的にハイブリダイズ可能”は、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間で十分な程度の相補性を有して所望の作用を誘導するが、一方特異的な結合が望まれる条件下、すなわち、in vivoでのアッセイおよび治療処置の場合の生理学的条件下、非-標的核酸に対して最小の作用しか示さないかまたは作用を示さない、アンチセンス化合物のことをいう。

40

【0056】

“標的化”または“標的とされた”は、標的核酸に対して特異的にハイブリダイズしそして所望の作用を誘導する、アンチセンス化合物の設計および選択のプロセスのことを意味する。

【0057】

“標的核酸”、“標的RNA”、そして“標的RNA転写物”はすべて、アンチセンス化合物により標的とすることができる核酸のことをいう。

“標的セグメント”は、アンチセンス化合物が標的とする標的核酸のヌクレオチド配列

50

のことを意味する。“5'標的部位”は、標的セグメントの最も5'側のヌクレオチドのことをいう。“3'標的部位”は、標的セグメントの最も3'側のヌクレオチドのことをいう。

【0058】

“治療有効量”は、個体に対して治療的利益をもたらす医薬剤の量を意味する。

“治療する”は、医薬組成物を投与して、疾患、障害、または症状の変化または改善をもたらすことをいう。

【0059】

“非修飾ヌクレオチド”は、天然に生じる核酸塩基、糖成分、およびヌクレオシド間結合からなるヌクレオチドを意味する。特定の態様において、非修飾ヌクレオチドは、RNAヌクレオチド（すなわち、 β -D-リボヌクレオシド）またはDNAヌクレオチド（すなわち、 β -D-デオキシリボヌクレオシド）である。

【0060】

特定の態様

特定の態様は、ハンチンチン発現を阻害するための方法、化合物、および組成物を提供する。

【0061】

特定の態様は、ハンチンチン核酸を標的化するアンチセンス化合物を提供する。特定の態様において、ハンチンチン核酸は、GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6（本明細書中SEQ ID NO: 1として援用される）、ヌクレオチド462000～634000で短縮化されたGENBANKアクセッションNo. NT_006081.17（本明細書中SEQ ID NO: 2として援用される）、GENBANKアクセッションNo. NM_010414.1（本明細書中SEQ ID NO: 3として援用される）、ヌクレオチド698000～866000で短縮化されたGENBANKアクセッションNo. NW_001109716.1の相補鎖（本明細書中SEQ ID NO: 4として援用される）、そしてGENBANKアクセッションNo. NM_024357.2（本明細書中SEQ ID NO: 5として援用される）にしめされる配列のいずれかである。

【0062】

特定の態様は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22、32で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも8個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22、32で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または少なくとも12個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、核酸塩基配列は、SEQ ID NOs: 24、25、26、6、12、28、21、22、32、13に記載された配列である。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の中から、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または少なくとも12個の隣接した核酸塩基を含む。

【0063】

特定の態様は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22、32で記載される核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも8個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22、32で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個または少なくとも15個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、核酸塩基配列は、SEQ ID NOs: 24、25、26、6、12、28、21

、22、32、13で記載されたものである。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個または少なくとも15個の隣接した核酸塩基を含む。

【0064】

特定の態様は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドはSEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22、および32で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも8個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22および32で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個または少なくとも18個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、核酸塩基配列は、SEQ ID NOs: 24、25、26、6、12、28、21、22、32、13に記載されたものである。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33で記載された核酸塩基配列の中から選択される配列の少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、または少なくとも18個の隣接した核酸塩基を含む。

【0065】

特定の態様は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド4384-4403、4605-4624、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4617-4636、4622-4639、4813-4832、4814-4833、4823-4842、4860-4877、4868-4887、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4931-4948、4955-4974、4960-4977、5801-5820、5809-5828、5809-5826、101088-101105、115066-115085、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4813-4832、4862-4881、5809-5828、4928-4947から選択される領域中で相補的な、少なくとも8個の隣接した核酸塩基部分を含む。特定の態様において、領域は、SEQ ID NO: 1の4384-4403、4609-4628、4610-4629、4860-4877、4862-4881、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4955-4974、および5809-5828から選択される。特定の態様において、領域は、4862-4881、4609-4628、5809-5828、5809-5826、5801-5820、および4955-4974から選択される。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中で記載された領域内の、相補的な少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または少なくとも12個の隣接した核酸塩基部分を有する。

【0066】

特定の態様は、15～25個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド4384-4403、4609-4628、4610-4629、4860-4877、4862-4881、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4955-4974、および5809-5829から選択された領域中で相補的な、少なくとも8個の隣接した核酸塩基部分を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中で記載された領域中で相補的な、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、または少なくとも15個の隣接した核酸塩基部分を有する。

【0067】

特定の態様は、15～25個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、ヌクレオチド4862-4881、4609-4628、5809-5828、5809-5826、5801-5820、および4955-4974から選択された領域内で相補的な、少なくとも8個の隣接した核酸塩基部分を含む。

特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中で記載された領域内で相補的な、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、または少なくとも15個の隣接した核酸塩基部分を有する。

【0068】

特定の態様は、18~21個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド4384-4403、4609-4628、4610-4629、4860-4877、4862-4881、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4955-4974、および5809-5829から選択された領域内で相補的な、少なくとも8個の隣接した核酸塩基部分を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中で記載された領域内で相補的な、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、または少なくとも18個の隣接した核酸塩基部分を有する。

10

【0069】

特定の態様は、18~21個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドからなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、ヌクレオチド4862-4881、4609-4628、5809-5828、5809-5826、5801-5820、および4955-4974から選択された領域中で相補的な、少なくとも8個の隣接した核酸塩基部分を含む。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、本明細書中で記載される領域内で相補的な、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、または少なくとも18個の隣接した核酸塩基部分を有する。

20

【0070】

特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、一本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる。

特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、20個の連結したヌクレオシドからなる。

【0071】

特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、SEQ ID NO: 1、2、3、4 または5の核酸塩基配列の全長にわたり、少なくとも90%相補的である。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、SEQ ID NO: 1、2、3、4または5の核酸塩基配列の全長にわたり、少なくとも95%相補的である。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1、2、3、4または5の核酸塩基配列の全長にわたり、少なくとも99%相補的である。特定の態様において、修飾されたオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、SEQ ID NO: 1、2、3、4または5の核酸塩基配列の全長にわたり、100%相補的である。

30

【0072】

特定の態様において、化合物は、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を有する。特定の態様において、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

【0073】

特定の態様において、化合物は、修飾糖を含む少なくとも1つのヌクレオシドを有する。特定の態様において、少なくとも1つの修飾糖は、2環糖である。特定の態様において、少なくとも1つの2環糖は、4'-CH(CH₃)-O-2'ブリッジを含む。特定の態様において、少なくとも1つの修飾糖は、2'-O-メトキシエチルを含む。

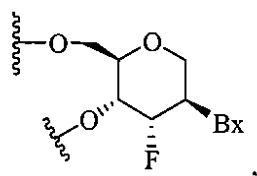
【0074】

特定の態様において、化合物は、少なくとも1つの少なくとも1つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドを含み、ここでテトラヒドロピラン環は、フラノース環を置換する。特定の態様において、少なくとも1つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドが、以下の構造：

50

【 0 0 7 5 】

【 化 1 】



【 0 0 7 6 】

を有し、ここでBxは場合により保護されているヘテロ環式塩基部分である。

10

特定の態様において、化合物は、修飾核酸塩基を含む少なくとも1つのヌクレオシドを有する。特定の態様において、修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

特定の態様において、化合物の修飾されたオリゴヌクレオチドは、以下のもの；

(i) 連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

(ii) 連結したヌクレオシドからなる5'ウィング部分；

(iii) 連結したヌクレオシドからなる3'ウィング部分；

を含み、ここでギャップ部分が5'ウィング部分と3'ウィング部分との間に位置し、そしてそれぞれのウィング部分のそれぞれのヌクレオシドが修飾糖を含む。

【 0 0 7 7 】

特定の態様において、化合物の修飾されたオリゴヌクレオチドは、以下のもの；

20

(i) 10個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

(ii) 5個の連結したヌクレオシドからなる5'ウィング部分；

(iii) 5個の連結したヌクレオシドからなる3'ウィング部分；

を含み、ここでギャップ部分が5'ウィング部分と3'ウィング部分の間にそれらとすぐに隣接するように位置し、そしてそれぞれのウィング部分のそれぞれのヌクレオシドが2'-O-メトキシエチル糖を含み；そしてそれぞれのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。

【 0 0 7 8 】

特定の態様において、化合物の修飾されたオリゴヌクレオチドは、以下のもの；

30

(i) 8個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

(ii) 6個の連結したヌクレオシドからなる5'ウィング部分；

(iii) 6個の連結したヌクレオシドからなる3'ウィング部分；

を含み、ここでギャップ部分が5'ウィング部分と3'ウィング部分との間にそれらとすぐに隣接するように位置し、それぞれのウィング部分のそれぞれのヌクレオシドが2'-O-メトキシエチル糖を含み；そしてそれぞれのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。

【 0 0 7 9 】

特定の態様において、化合物の修飾されたオリゴヌクレオチドは、以下のもの；

40

(i) 8個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップ部分；

(ii) 5個の連結したヌクレオシドからなる5'ウィング部分；

(iii) 5個の連結したヌクレオシドからなる3'ウィング部分；

を含み、ここでギャップ部分が5'ウィング部分と3'ウィング部分との間にそれらとすぐに隣接するように位置し、それぞれのウィング部分のそれぞれのヌクレオシドが2'-O-メトキシエチル糖を含み；そしてそれぞれのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合を含む。

【 0 0 8 0 】

特定の態様が、本明細書中で記載された様な化合物またはその塩、および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む組成物を提供する。特定の態様において、組成物は、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22および32に記載された核酸塩基配列の中

50

から選択される核酸塩基配列の少なくとも12個の隣接した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドまたはその塩および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む。

【0081】

特定の態様は、本明細書中で記載された化合物、またはその塩、および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む組成物を提供する。特定の態様において、組成物は、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33で記載される核酸塩基配列の中から選択される核酸塩基配列の少なくとも12個の隣接した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドまたはその塩、および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む。

10

【0082】

特定の態様は、ハンチントン病を治療し、予防し、または軽減する方法を提供する。

特定の態様は、本明細書中で記載された化合物を動物に対して投与することを含む方法を提供する。特定の態様において、この方法は、動物に対して、SEQ ID NOs: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22および32に記載された核酸塩基配列の中から選択された核酸塩基配列の少なくとも8個の隣接した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを投与することを含む。

【0083】

特定の態様は、本明細書中で記載された化合物を、動物に対して投与することを含む方法を提供する。特定の態様において、この方法は、動物に対して、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33に記載された核酸塩基配列の中から選択される核酸塩基配列の少なくとも8個の隣接した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを投与することを含む。

20

【0084】

特定の態様において、動物がヒトである。

特定の態様において、投与することにより、本明細書中において記載されるハンチントン病の進行を予防し、治療し、軽減しまたは遅らせる。

【0085】

特定の態様において、化合物は、第2の薬剤と共投与される。

30

特定の態様において、化合物および第2の薬剤は、付随して投与される。

特定の態様において、投与することは、非経口投与である。特定の態様において、非経口投与は、頭蓋内投与である。特定の態様において、頭蓋内投与は、くも膜下投与または脳室内投与である。

【0086】

特定の態様は、動物に対して本明細書中で記載される化合物または組成物を投与し、動物におけるハンチンチンmRNAまたはタンパク質の発現を減少させることを含む、動物におけるハンチンチンmRNAまたはタンパク質の発現を減少させる方法をさらに提供する。特定の態様において、動物がヒトである。特定の態様において、ハンチンチンmRNAまたはタンパク質の発現を減少させることは、ハンチントン病の進行を予防し、治療し、軽減し、または遅らせる。

40

【0087】

特定の態様は、疾患を有するヒトを同定し、そしてそのヒトに対して治療的有効量の本明細書中で記載された化合物または組成物を投与することを含む、ハンチントン病を有するヒトを処置するための方法を提供する。特定の態様において、処置は、情動不安、協調不足、意図せず開始される運動、意図せず完了されない運動、歩行不安定、舞踏病、硬直、身もだえするような運動、異常姿勢、不安定性、異常な顔貌、そしゃく困難、嚥下困難、発話困難、発作、睡眠障害、計画性低下、柔軟性低下、抽象的思考低下、ルール習得低下、適切な動作の開始の低下、不適切な動作の阻害の低下、短期記憶の低下、長期記憶の低下、パラノイア、見当識障害、精神錯乱、幻覚、認知症、不安、抑鬱症、感情鈍麻、自

50

己中心性、攻撃性、強迫行動、易刺激性、自殺念慮、脳容量の低下、筋萎縮、心不全、グルコース耐性の低下、体重減少、骨粗鬆症、および精巣萎縮からなる群から選択される症状を低下させる。

【0088】

ヒトに対して、治療的有効量の本明細書中で記載された化合物または組成物を投与し、それにより、ハンチントン病を低下または予防することを含む、ハンチントン病を低下させまたは予防するための方法をさらに提供する。

【0089】

ハンチントン病の症状を軽減させることが必要なヒトに対して、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを含む、ハンチントン病の症状を軽減させるための方法をさらに提供し、ここで修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4または5に対して特異的にハイブリダイズし、それによりヒトにおけるハンチントン病の症状を軽減する。

10

【0090】

ハンチントン病に関連する症状の進行速度を低下させることが必要なヒトに対して、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを含む、ハンチントン病に関連する症状の進行速度を低下させるための方法をさらに提供し、ここで修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO: 1、2、3、4または5に対して特異的にハイブリダイズし、それによりヒトにおけるハンチントン病の症状の進行速度を低下させる。

20

【0091】

ハンチントン病に関連する症状により示される分解を反転させることを必要とするヒトに対して、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを含む、ハンチントン病に関連する症状により示される分解を反転させるための方法をさらに提供し、ここで修飾されたオリゴヌクレオチドは、SEQ ID NO:1、2、3、4または5に対して特異的にハイブリダイズし、それによりヒトにおけるハンチントン病の症状により示される分解を反転させる。

【0092】

特定の態様において、症状は、身体的症候、認知症候、精神医学的症候、または末梢症候である。特定の態様において、症状は、情動不安、協調不足、意図せず開始される運動、意図せず完了されない運動、歩行不安定、舞蹈病、硬直、身もだえするような運動、異常姿勢、不安定性、異常な顔貌、そしゃく困難、嚥下困難、発話困難、発作、および睡眠障害、からなる群から選択される身体的症状である。特定の態様において、症状は、計画性低下、柔軟性低下、抽象的思考低下、ルール習得低下、適切な動作の開始の低下、不適切な動作の阻害の低下、短期記憶の低下、長期記憶の低下、パラノイア、見当識障害、精神錯乱、幻覚および認知症、からなる群から選択される認知症状である。特定の態様において、症状は、不安、抑鬱症、感情鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、易刺激性および自殺念慮、からなる群から選択される精神医学的症候である。特定の態様において、症状は、脳容量の低下、筋萎縮、心不全、グルコース耐性の低下、体重減少、骨粗鬆症、および精巣萎縮、からなる群から選択される末梢症状である。

30

40

【0093】

ハンチントン病の処置、予防、または軽減のための医薬の調整のための方法および化合物もまた提供される。

特定の態様は、ハンチントン病を治療し、軽減し、または予防するための医薬の製造における、本明細書中において記載された化合物の使用を提供する。

【0094】

特定の態様は、本明細書中で記載された追加の薬剤または治療との組み合わせ治療により、本明細書中において記載されたハンチントン病を治療し、予防または軽減する際に使用するための、本明細書中において記載された化合物を提供する。薬剤または治療法を、共投与することができ、または付随して投与することができる。

50

【 0 0 9 5 】

特定の態様は、本明細書中で記載された追加の薬剤または治療法との組み合わせ治療により、本明細書中において記載されたハンチントン病を治療し、予防しまたは軽減するための医薬の製造における、本明細書中において記載された化合物の使用を提供する。薬剤または治療法を、共投与することができ、または付随して投与することができる。

【 0 0 9 6 】

特定の態様は、本明細書中において記載される追加の薬剤または治療法を引き続いて投与される患者において、本明細書中において記載されるハンチントン病を治療し、予防しまたは軽減するための医薬の製造における、本明細書中において記載される化合物の使用を提供する。

10

【 0 0 9 7 】

特定の態様は、本明細書中において記載されるハンチントン病を治療し、予防しまたは軽減するためのキットであって、以下のもの：

(i) 本明細書中で記載された化合物；およびその代わりに

(ii) 本明細書中において記載される追加の薬剤または治療法；を含むキットを提供する。

【 0 0 9 8 】

本明細書中において記載されるキットには、本明細書中において記載される組み合わせ治療により、本明細書中において記載されるハンチントン病を治療し、予防しまたは軽減するためのキットを使用するための説明書がさらに含まれてもよい。

20

【 0 0 9 9 】

特定の態様は、動物に対して治療的有効量の化合物を投与して、それによりハンチンチンの発現を阻害することにより、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物を治療する際に使用するための、12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、または36に示される配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、疾患または症状は、神経学的障害である。特定の態様において、疾患または症状は、ハンチントン病である。特定の態様において、動物がヒトである。

30

【 0 1 0 0 】

特定の態様は、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物に対して治療的有効量の化合物を投与して、ハンチントン病の進行を予防し、治療し、軽減しまたは遅らせることにより、その動物において使用するための、12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、または36に示される配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基を含む。

40

【 0 1 0 1 】

特定の態様は、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物に対して治療的有効量の化合物と投与し、それによりハンチンチンの発現を阻害することにより、その動物において使用するための、12～30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 12、22、28、30、32、または33に示される配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基を含む。特定の態様において、疾患または症状は、神経学的障害である。特定の態様において、

50

疾患または症状は、ハンチントン病である。特定の態様において、動物がヒトである。

【0102】

特定の態様は、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物に対して、治療的有効量の化合物を投与して、ハンチントン病の進行を予防し、治療し、軽減し、または遅らせることにより、その動物において使用するための、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドの連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 12、22、28、30、32、または33に示される配列の、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基を含む。

10

【0103】

特定の態様は、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物に対して、治療的有効量の化合物を投与して、それによりハンチンチンの発現を阻害することにより、その動物において使用するための、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド4384-4403、4605-4624、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4617-4636、4622-4639、4813-4832、4814-4833、4823-4842、4860-4877、4868-4887、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4931-4948、4955-4974、4960-4977、5801-5820、5809-5828、5809-5826、101088-101105、115066-115085、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4813-4832、4862-4881、5809-5828および4928-4947から選択される領域中で相補的な、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基部分を含む。

20

【0104】

特定の態様は、ハンチンチンに関連した疾患または症状を有する動物に対して、治療的有効量の化合物を投与して、ハンチントン病の進行を予防し、治療し、軽減しまたは遅らせることにより、その動物において使用するための、12~30個の連結したヌクレオシド修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、ここで連結したヌクレオシドは、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド4384-4403、4605-4624、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4617-4636、4622-4639、4813-4832、4814-4833、4823-4842、4860-4877、4868-4887、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4931-4948、4955-4974、4960-4977、5801-5820、5809-5828、5809-5826、101088-101105、115066-115085、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4813-4832、4862-4881、5809-5828および4928-4947から選択される領域中で相補的な、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または少なくとも20個の隣接した核酸塩基部分を含む。

30

【0105】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣体、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAが含まれるが、これらには限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して“アンチセンス”であってもよく、このことは標的核酸に対して水素結合を介してハイブリダイゼーションを受けることができることを意味する。

40

【0106】

特定の態様において、アンチセンス化合物は、5' 3'の方向で記述する場合、アンチセンス化合物が標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補鎖を含む、核酸塩基配列を有する。特定のそのような態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5' 3'の方向で記述する場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補鎖を含む、核酸塩基配列を有する。

50

【0107】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、12～30個のヌクレオチドの長さである。言い換えると、アンチセンス化合物は、12～30個の連結された核酸塩基である。その他の態様において、アンチセンス化合物は、8～80個、12～50個、15～30個、18～24個、19～22個、または20個の連結された核酸塩基からなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。特定のそのような態様において、アンチセンス化合物は、長さにして8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80個の連結された核酸塩基からなる修飾されたオリゴヌクレオチドを含み、または上記の値のいずれか2つにより規定される範囲の長さの修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0108】

特定の態様において、アンチセンス化合物は、短いまたは短縮された修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。短いまたは短縮された修飾されたオリゴヌクレオチドは、5'末端から1ヌクレオシドを削除したもの（5'短縮型）、または3'末端から1ヌクレオシドを削除したもの（3'短縮型）であってもよい。短いまたは短縮されたオリゴヌクレオチドは、5'末端から2ヌクレオシドを削除したものであってもよく、または3'末端から2ユニットを削除したものであってもよい。あるいは、削除されたヌクレオシドは、修飾されたオリゴヌクレオチドの全体を通じて、たとえば、5'末端から1ヌクレオシドを削除したアンチセンス化合物および3'末端から1ヌクレオシドを削除したアンチセンス化合物の全体を通じて、分散されていてもよい。

20

【0109】

追加の1ヌクレオシドが長くされたオリゴヌクレオチド中に存在する場合、追加のヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端に位置していてもよい。2つまたはそれ以上の追加のヌクレオシドが存在する場合、追加されたヌクレオシドは、互いに隣接していてもよく、たとえば、オリゴヌクレオチドの5'末端に2ヌクレオシドが追加されたオリゴヌクレオチド（5'付加）、または3'末端に2ヌクレオシドが追加されたオリゴヌクレオチド（3'付加）を有するものであってもよい。あるいは、付加されたヌクレオシドは、アンチセンス化合物の全体を通じて、たとえば、5'末端に1ヌクレオシドを追加するオリゴヌクレオチドおよび3'末端に1サブユニットを追加するオリゴヌクレオチド中の全体を通じて、分散されていてもよい。

30

【0110】

アンチセンス化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、の長さを増加または減少させることができおよび/または活性を除くことなくミスマッチ塩基を導入することができる。たとえばWoolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)において、13～25個の長さの核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドの一連のものを、卵母細胞注射モデルにおける標的RNAの切断を導入する能力について試験した。8または11個のミスマッチ塩基をアンチセンスオリゴヌクレオチドの両末端のそばに有する25核酸塩基の長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを1つも含有しないアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して低い程度ではあったが、標的mRNAの特異的な切断を起こすことができた。同様に、標的的特異的切断を、1個または3個のミスマッチを有するものを含む13個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、達成した。

40

【0111】

Gautschi et al (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001) は、bcl-2 mRNAに対して100%の相補性を有しそしてbcl-xL mRNAに対して3個のミスマッチを有するオリゴヌクレオチドが、in vitroおよびin vivoにおいてbcl-2およびbcl-xLの両方の発現を減少させる能力を有することを示した。さらに、このオリゴヌクレオチドが、in vivoで強力な抗-腫瘍活性を有することを示した。

【0112】

50

Maher and Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) は、タンデムに並んだ14個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドの一連のものおよびタンデムに並んだアンチセンスオリゴヌクレオチドの2つまたは3つの配列を含む28個および42個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、それぞれ、ウサギ網状赤血球アッセイにおいてヒトDHFRの翻訳を捕捉する能力について試験した。3つの14核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチド単独のそれぞれが、28個または42個の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドと比較してより穏やかなレベルではあったが、翻訳を阻害することができた。

【0113】

アンチセンス化合物モチーフ

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、阻害活性の亢進、標的核酸に対する結合親和性の増加、またはin vivoヌクレアーゼによる分解に対する耐性などの、アンチセンス化合物特性を付与するようなパターンまたはモチーフで配置された化学的に修飾されたサブユニットを有する。

【0114】

キメラアンチセンス化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の上昇、細胞取り込みの増加、標的核酸に対する結合親和性の増加、および/または阻害活性の増加を付与するように修飾された少なくとも1つの領域を含有する。キメラアンチセンス化合物の第2の領域は、場合により、細胞エンドヌクレアーゼRNase Hに対する気質として機能してもよく、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する。

【0115】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、キメラアンチセンス化合物と考えられる。ギャップマーにおいて、RNaseH切断をサポートする複数のヌクレオチドを有する内部領域は、内部領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外部領域の間に位置する。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ウィング部分が修飾されたヌクレオシドを含むのに対して、ギャップ部分は、一般的に、エンドヌクレアーゼ切断のための基質として機能する。特定の態様において、ギャップマーの領域は、それぞれ異なる領域を含む様々な糖成分により、差別化される。ギャップマーの領域を識別するために使用する糖成分の種類には、いくつかの態様において、 $-D$ -リボヌクレオシド、 $-D$ -デオキシリボヌクレオシド、 $2'$ -修飾ヌクレオシド(そのような $2'$ -修飾ヌクレオシドには、 $2'$ -MOE、および $2'$ -O-CH₃、などが含まれていてもよい)、および2環糖修飾ヌクレオシド(そのような2環糖修飾ヌクレオシドには、 $4'-(CH_2)_n-O-2'$ ブリッジ、ここで $n=1$ または $n=2$ 、を有する物が含まれていてもよい)が含まれていてもよい。好ましくは、それぞれの異なる領域は、均一な糖成分を含む。ウィング-ギャップ-ウィングモチーフは、しばしば“X-Y-Z”と記載され、ここで“X”は $5'$ ウィング領域の長さを示し、“Y”はギャップ領域の長さを示し、そして“Z”は $3'$ ウィング領域の長さを示す。本明細書中で使用される場合、“X-Y-Z”として記載されるギャップマーは、ギャップ部分が $5'$ ウィング部分および $3'$ ウィング部分のそれぞれにすぐに隣接して位置するような配置を有する。このように、 $5'$ ウィング部分とギャップセグメントとのあいだ、またはギャップ部分と $3'$ ウィング部分との間に、介在性のヌクレオチドは存在しない。本明細書中で記載されるアンチセンス化合物のいずれかは、ギャップマーモチーフを有していてもよい。いくつかの態様において、XおよびZは同一であり、その他の態様においては、それらは異なる。好ましい態様において、Yは8~15個のヌクレオチドである。X、YまたはZは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、25個、30個またはそれ以上のヌクレオチドのいずれか出会ってもよい。このように、ギャップマーには、たとえば5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、6-8-6または5-8-5が含まれるが、これらには限定されない。

【0116】

特定の態様において、ウィング-ギャップまたはギャップ-ウィング構造としてのアンチセンス化合物は、“ウィングマー”モチーフ、すなわち、ギャップマー構造に関して上述

したX-YまたはY-Z構造を有する。このように、ウィングマー構造には、たとえば5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13、または5-13が含まれるが、これらには限定されない。

【0117】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5-10-5ギャップマーモチーフを有する。

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、6-8-6ギャップマーモチーフを有する。

【0118】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5-8-5ギャップマーモチーフを有する。

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、ギャップに広がったモチーフを有する。

【0119】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするギャップに広がったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5個の化学的に修飾されたヌクレオシドのウィング部分にすぐに隣接しそしてそのあいだに位置する10個の2'-デオキシリボヌクレオチドのギャップ部分を有する。特定の態様において、化学的修飾は、2'-糖修飾を含む。別の態様において、化学的修飾は、2'-MOE糖修飾を含む。

【0120】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするギャップに広がったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5個の化学的に修飾されたヌクレオシドのウィング部分にすぐに隣接しそしてそのあいだに位置する8個の2'-デオキシリボヌクレオチドのギャップ部分を有する。特定の態様において、化学的な修飾は、2'-糖修飾を含む。別の態様において、化学的な修飾は、2'-MOE糖修飾を含む。

【0121】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするギャップに広がったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、6個の化学的に修飾されたヌクレオシドのウィング部分に理すぐに隣接しそしてその間に位置する、8個の2'-デオキシリボヌクレオチドのギャップ部分を有する。特定の態様において、化学的な修飾は、2'-糖修飾を含む。別の態様において、化学的な修飾は、2'-MOE糖修飾を含む。

【0122】

標的核酸、標的領域、およびヌクレオチド配列

ハンチンチンをコードするヌクレオチド配列には、以下のものが含まれるが、これらには限定されない：GENBANKアクセスンNo. NM_002111.6、GENBANK（登録商標）には2006年5月31日に初めて寄託され、本明細書中ではSEQ ID NO: 1として援用される；ヌクレオチド462000～634000が短縮されたGENBANKアクセスンNo. NT_006081.17、GENBANK（登録商標）には2004年8月19日に初めて寄託され、そして本明細書中ではSEQ ID NO: 2として援用される；GENBANKアクセスンNo. NM_010414.1、GENBANK（登録商標）には2004年3月23日に初めて寄託され、そして本明細書中ではSEQ ID NO: 3として援用される；ヌクレオチド698000～866000で短縮されたGENBANKアクセスンNo. NW_001109716.1の相補鎖、GENBANK（登録商標）には2006年7月14日に初めて寄託され、そして本明細書中ではSEQ ID NO: 4として援用される、そしてGENBANKアクセスンNo. NM_024357.2、GENBANK（登録商標）には2008年6月5日に初めて寄託され、そして本明細書中ではSEQ ID NO: 5として援用される。

【0123】

本明細書中に含まれる実施例中のそれぞれのSEQ ID NO に記載される配列は、糖成分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対するいずれかの修飾とは独立していることが理解される。このように、SEQ ID NOにより定義されるアンチセンス化合物は、独立して、糖成分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対して1またはそれ以上の修飾を含んで

もよい。Isis Number (Isis No) により記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列とモチーフとの組み合わせを示す。

【0124】

特定の態様において、標的領域は、標的核酸の構造的に規定された領域である。たとえば、標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロン接合部、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終止領域、またはその他の規定の核酸領域、を含んでもよい。ハンチンチンに関して構造的に規定された領域は、NCBIなどの配列データベースからアクセッション番号により得ることができ、そしてそのような情報を本明細書中に参照により援用する。特定の態様において、標的領域は、標的領域内の1つの標的セグメントの5' 標的部位から標的領域内の別の標的セグメントの3' 標的部位までの配列を含むことができる。

10

【0125】

標的化には、アンチセンス化合物がハイブリダイズして、それにより所望の作用を生じる少なくとも1つの標的セグメントの決定が含まれる。特定の態様において、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの減少である。特定の態様において、所望の効果は、標的核酸によりコードされるタンパク質レベルの減少または標的核酸に関連した表現型変化である。

【0126】

標的領域は、1またはそれ以上の標的セグメントを含有してもよい。標的領域内の複数の標的セグメントは、オーバーラップしていてもよい。あるいは、それらは、オーバーラップしていなくてもよい。特定の態様において、標的領域内の標的セグメントは、わずかに約300個のヌクレオチドにより隔てられている。特定の態様において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の250個、200個、150個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、20個、または10個のヌクレオチド、標的核酸上の約250個、約200個、約150個、約100個、約90個、約80個、約70個、約60個、約50個、約40個、約30個、約20個、または約10個のヌクレオチド、標的核酸上のわずかに250個、わずかに200個、わずかに150個、わずかに100個、わずかに90個、わずかに80個、わずかに70個、わずかに60個、わずかに50個、わずかに40個、わずかに30個、わずかに20個、またはわずかに10個のヌクレオチド、標的核酸上のわずかに約250個、わずかに約200個、わずかに約150個、わずかに約100個、わずかに約90個、わずかに約80個、わずかに約70個、わずかに約60個、わずかに約50個、わずかに約40個、わずかに約30個、わずかに約20個、またはわずかに約10個のヌクレオチド、の多数のヌクレオチドにより隔てられており、あるいは前述の値のいずれか2つにより規定される範囲である多数のヌクレオチドにより隔てられる。特定の態様において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上のわずかに5個のヌクレオチドまたはわずかに約5個のヌクレオチドにより隔てられている。特定の態様において、標的セグメントは、隣接している。本明細書中で列挙した5' 標的部位または3' 標的部位のいずれかである開始核酸を有する範囲により綺麗される標的領域が意図される。

20

30

【0127】

適切な標的セグメントは、5' UTR、コード領域、3' UTR、イントロン、エクソン、またはエクソン/イントロン接合部の内部に見出すことができる。開始コドンまたは停止コドンを含む標的セグメントもまた、適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、開始コドンまたは停止コドン等の特定の構造的により規定された領域を、特異的に除くことができる。

40

【0128】

適切な標的セグメントの決定には、標的核酸の配列を、ゲノム全体でその他の配列と比較することが含まれていてもよい。たとえば、BLASTアルゴリズムを使用して、異なる核酸の中での共通性の領域を同定することができる。この比較は、選択された標的核酸以外の配列（すなわち、非-標的配列または標的配列外）に対して非特異的様式でハイブリダイズすることができる、アンチセンス化合物配列の選択を阻害することができる。

【0129】

活性標的領域内のアンチセンス化合物の活性（例えば、標的核酸レベルの%減少により

50

規定される)において、バリエーションが存在していてもよい。特定の態様において、ハンチンチンmRNAレベルの減少は、ハンチンチン発現の阻害の指標である。ハンチンチンタンパク質のレベルの減少もまた、標的mRNA発現の阻害の指標である。さらに、表現型変化は、ハンチンチン発現の阻害の指標である。たとえば、脳のサイズの正常までの増加、運動協調性の改善、断続的な筋肉の痙攣(dystonia)の減少、易刺激性および/または不安の減少、記憶力の改善、または精力の増加、その他の表現型変化をアッセイすることができる。その他の表現型指標、例えば、ハンチントン病に関連する症候、もまた、以下に記載されるように評価することができる。

【0130】

ハイブリダイゼーション

いくつかの態様において、ハイブリダイゼーションは、本明細書中で開示されるアンチセンス化合物と、ハンチンチン核酸とのあいだで生じる。ハイブリダイゼーションの最も一般的なメカニズムは、核酸分子の相補的核酸塩基とのあいだの水素結合(例えば、ワトソン-クリック水素結合、フーグスティーン水素結合または逆フーグスティーン水素結合)が関与する。

【0131】

ハイブリダイゼーションは、様々な条件下で生じることができる。ストリンジェントな条件は、配列-依存性であり、そしてハイブリダイズされる核酸分子の性質および組成により決定される。

【0132】

標的核酸に対して特異的にハイブリダイズするかどうかを決定する方法は、当該技術分野において周知である。特定の態様において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物は、ハンチンチン核酸と特異的にハイブリダイズする。

【0133】

相補性

アンチセンス化合物および標的核酸は、アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合し、それにより所望の作用(例えば、例えばハンチンチン核酸などの標的核酸のアンチセンス阻害)を生じることができる場合に、互いに相補的である。

【0134】

アンチセンス化合物は、ハンチンチン核酸の1またはそれ以上のセグメントとハイブリダイズすることができ、その結果として介在性のセグメントまたは隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しない(例えば、ループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造)。

【0135】

特定の態様において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物、またはその特定の部分、は、ハンチンチン核酸、標的領域、標的セグメント、またはそれらの特定の部分に対して、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相補的であるか、または少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相補的である。アンチセンス化合物の標的核酸との%相補性は、通常の方法を使用して決定することができる。

【0136】

たとえば、アンチセンス化合物の20個の核酸塩基のうちの18個が標的領域に対して相補的であり、そしてしたがって特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンス化合物は、90%の相補性を示す。この例において、残りの相補的ではない核酸塩基は、相補的な核酸塩基とクラスターを形成しまたは点在することができ、互いに隣接する必要はなく、また相補的な核酸塩基に対して隣接する必要もない。このように、標的核酸と完全に相補的である2つの領域により挟まれている4個の相補的ではない核酸塩基を有する長さが18個の核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸と全体で77.8%の相補性を有し、そ

10

20

30

40

50

してしたがって、本発明の範囲に包含される。アンチセンス化合物の標的核酸の領域との%相補性は、当該技術分野において知られているBLASTプログラム(basic local alignment search tools)およびPowerBLASTプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)を使用して、日常的に決定することができる。%相補性、配列同一性または相補性は、たとえば、Gapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)により、Smith and Watermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を使用する初期設定を使用して、決定することができる。

【0137】

特定の態様において、本明細書中で提供されるアンチセンス化合物、またはその特定の部分、は、標的核酸、またはその特定の部分に対して完全に相補的(すなわち、100%相補的)である。たとえば、アンチセンス化合物は、ハンチンチン核酸、または標的領域、または標的セグメントまたはその標的配列に対して完全に相補的であってもよい。本明細書中で使用される場合、“完全に相補的”は、アンチセンス化合物のそれぞれの核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と正確な塩基対合をすることができることを意味する。たとえば、20個の核酸塩基アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物に対して完全に相補的な標的核酸の対応する20個の核酸塩基部分が存在する限りにおいて、400個の核酸塩基の長さの標的配列に対して完全に相補的である。完全に相補的なは、第1の核酸および/または第2の核酸の特定の部分を参照して、使用することもできる。たとえば、30個の核酸塩基アンチセンス化合物の20個の核酸塩基部分は、400個の核酸塩基の長さの標的配列に対して“完全に相補的”であることができる。30個の核酸塩基オリゴヌクレオチドの20個の核酸塩基部分は、標的配列が対応する20個の核酸塩基部分を有し、それぞれの核酸塩基がアンチセンス化合物の20個の核酸塩基部分に対して相補的ならば、標的配列に対して完全に相補的である。同時に、全体の30個の核酸塩基アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の残りの10個の核酸塩基もまた標的配列に対して相補的であるかどうか依存して、標的配列に対して完全に相補的であってもよく、または完全に相補的ではなくてもよい。

【0138】

非-相補的な核酸塩基の位置は、アンチセンス化合物の5'末端または3'末端であってもよい。あるいは、非-相補的な核酸塩基または核酸塩基は、アンチセンス化合物の内部位置であってもよい。2つまたはそれ以上の非-相補的な核酸塩基が存在する場合、それらは隣接(すなわち、連結)していてもよく、または隣接していなくてもよい。一態様において、非-相補的な核酸塩基は、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドのウィング部分に位置している。

【0139】

特定の態様において、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個の長さの核酸塩基または12個まで、13個まで、14個まで、15個まで、16個まで、17個まで、18個まで、19個まで、または20個までの長さの核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸、例えばハンチンチン核酸、またはその特定の部分との関連で、わずか4個、わずか3個、わずか2個、またはわずか1個の非-相補的な核酸塩基を含む。

【0140】

特定の態様において、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、または30個の長さの核酸塩基、または12個まで、13個まで、14個まで、15個まで、16個まで、17個まで、18個まで、19個まで、20個まで、21個まで、22個まで、23個まで、24個まで、25個まで、26個まで、27個まで、28個まで、29個まで、または30個までの長さの核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸、例えばハンチンチン核酸、またはその特定の部分との関連で、わずか6個、わずか5個、わずか4個、わずか3個、わずか2個、またはわずか1個の非-相補的な核酸塩基を含む。

【0141】

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物にもまた、標的核酸の部分に対して相補的なものが含まれる。本明細書中で使用される場合、“部分”は、標的核酸の領域またはセグメント中の、規定数の隣接する（すなわち、連結する）核酸塩基のことをいう。“部分”はまた、アンチセンス化合物の規定数の隣接した核酸塩基のことともいう。特定の態様において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも8個の核酸塩基部分に対して相補的である。特定の態様において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも12個の核酸塩基部分に対して相補的である。特定の態様において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも15個の核酸塩基部分に対して相補的である。同様に、少なくとも9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれ以上の標的セグメントの核酸塩基部分、またはこれらの値のうちのいずれか2つにより規定される範囲の標的セグメントの核酸塩基部分に対して相補的なアンチセンス化合物も意図される。

10

【0142】

同一性

本明細書中で提供されるアンチセンス化合物はまた、特定のヌクレオチド配列、SEQ ID NO、に対する規定の%同一性を有するものであってもよく、または特定のIsis番号により示される化合物、またはその部分であってもよい。本明細書中で使用される場合、アンチセンス化合物は、同一の核酸塩基対合能力を有する場合、本明細書中で開示される配列と同一である。たとえば、開示されたDNA配列のチミジンの代わりにウラシルを含有するRNAは、ウラシルおよびチミジンはともにアデニンと対合するため、DNA配列と同一であると考えられる。本明細書中に記載されたアンチセンス化合物の短縮型または延長型、並びに本明細書中で提供されたアンチセンス化合物と比較して同一ではない塩基を有する化合物もまた、企図される。同一ではない塩基は、互いに隣接していてもよく、あるいはアンチセンス化合物全体にわたり分散されていてもよい。アンチセンス化合物の%同一性は、比較されるべき配列と比較して、同一の塩基対合を有する塩基数に従って算出される。

20

【0143】

特定の態様において、アンチセンス化合物、またはその部分は、本明細書中で開示される1またはそれ以上のアンチセンス化合物あるいはSEQ ID NOs、またはその部分と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。

30

【0144】

修飾

ヌクレオシドは、塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基としても知られる）部分は、通常は、ヘテロ環式塩基部分である。ヌクレオチドは、さらにヌクレオシドの糖部分に対して共有結合しているリン酸基が含まれるヌクレオシドである。ペントフラノシル糖が含まれるヌクレオシドについて、リン酸基は、糖の2'、3'または5'ヒドロキシ部分に結合していてもよい。オリゴヌクレオチドは、隣接するヌクレオシドが互いに共有結合して、直鎖重合化オリゴヌクレオチドを形成することを通じて形成される。オリゴヌクレオチド構造中で、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成するものとして一般的に言及される。

40

【0145】

アンチセンス化合物に対する修飾は、ヌクレオシド間結合、糖成分、または核酸塩基に対する置換または変化を企図する。修飾アンチセンス化合物は、しばしば、たとえば、細胞取り込みの亢進、核酸標的に対する親和性の亢進、ヌクレアーゼの存在下での安定性の増加、または阻害活性の増加、等の好ましい特性のため、天然型以上に好ましい。

【0146】

化学的に修飾されたヌクレオシドを使用して、その標的核酸に対する短くされたかまたは短縮されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの結合親和性を増加させることもできる。結果的に、そのような化学的に修飾されたヌクレオシドを有するより短いアンチセンス化

50

合物を用いて、対比できる結果を、得ることができる。

【0147】

修飾ヌクレオシド間結合

天然に存在するRNAおよびDNAのヌクレオシド間結合は、3' 5'ホスホジエステル結合である。1またはそれ以上の修飾された、すなわち、天然に存在しない、ヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物は、たとえば、細胞取り込みの亢進、標的核酸に対する親和性の亢進、そしてヌクレアーゼ存在下での安定性の増加、などの好ましい特性のため、天然に存在するヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物以上にしばしば選択される。

【0148】

修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子を維持するヌクレオシド間結合、並びにリン原子を有さないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホールアミデート、およびホスホロチオエートが含まれるが、これらには限定されない。リン-含有結合および非-リン-含有結合の調製方法は、周知である。

【0149】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、1またはそれ以上の修飾ヌクレオシド間結合を含む。特定の態様において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。特定の態様において、アンチセンス化合物のそれぞれ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。

【0150】

修飾糖成分

アンチセンス化合物は、場合により、糖基が修飾される、1またはそれ以上のヌクレオシドを含有することができる。そのような糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の亢進、結合親和性の増加、またはいくつかのその他の有益な生物学的特性を、アンチセンス化合物に対してもたすことができる。特定の態様において、ヌクレオシドは、科学的に修飾されたりボフラノース環成分を含む。化学的に修飾されたりボフラノース環の実施例には、限定されるわけではないが、置換基の付加(5'および2'置換基、2環式核酸(BNA)を形成するための非-ジェミナルの環原子の架橋、S、N(R)、またはC(R₁)(R)₂(R=H、C₁~C₁₂アルキルまたは保護基)によるリボシル環酸素原子の置換およびこれらの組み合わせが含まれる。化学的に修飾された糖の例には、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド(PCT国際出願WO 2008/101157(2008年8月21日公開)を参照、その他の開示された5',2'-bis置換ヌクレオシドに関して)あるいは2'-位での更なる置換を含むリボシル環酸素原子のSでの置換(公開されたU.S.特許出願US2005-0130923(2005年6月16日公開)を参照)またはあるいはBNAの5'-置換(PCT国際出願WO 2007/134181(2007年11月22日公開)を参照、LNAがたとえば5'-メチル基または5'-ビニル基により置換されたもの)、が含まれる。

【0151】

修飾糖成分を有するヌクレオシドの例には、限定されるわけではないが、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃および2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが含まれる。2'位での置換は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁~C₁₀アルキル、OCF₃、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(Rm)(Rn)、およびO-CH₂-C(=O)-N(Rm)(Rn)、から選択することもでき、ここでRmおよびRnはそれぞれ独立して、Hまたは置換または非置換のC₁~C₁₀アルキルである。

【0152】

2環式核酸(BNAs)の例には、限定されるわけではないが、4'と2'リボシル基とのあいだのブリッジを含むヌクレオシドが含まれる。特定の態様において、本明細書中において提供されるアンチセンス化合物には、ブリッジが以下の式のイットツを含む1またはそれ以上のBNAヌクレオシドが含まれる: 4'-(CH₂)₂-O-2'(LNA); 4'-(CH₂)₂-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2'(LNA); 4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA); 4'-C(CH₃)₂-O-2'(PCT/US2008/068922を参照); 4'-CH(CH₃)-O-2'および4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(U.S.特許7,399,845(2008年7

10

20

30

40

50

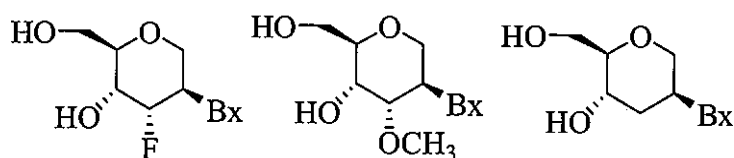
月15日に発行)を参照); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (PCT/US2008/064591を参照); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (公開されたU.S.特許出願US2004-0171570 (2004年9月2日公開)を参照); 4'-CH₂-N(R)-O-2' (U.S.特許7,427,672 (2008年9月23日発行)を参照); 4'-CH₂-C(CH₃)-2' および 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (PCT/US2008/066154を参照); およびRは、独立して、H、C₁~C₁₂アルキル、または保護基である。上述したBNAのそれぞれには、たとえば -L-リボフラノースおよび -D-リボフラノース (PCT国際出願PCT/DK98/00393 (1999年3月25日にWO 99/14226として公開)を参照)を含む様々な立体化学的な糖構造が含まれる。

【0153】

特定の態様において、ヌクレオシドを、リボシル環を糖代理物により置換することにより修飾する。その様な修飾には、限定的ではないが、リボシル環を、代理の環系(しばしばDNA類似体とも呼ばれるもの)、例えば、モルホリノ環、シクロヘキセニル環、シクロヘキシル環、またはテトラヒドロピラニル環、例えば以下の式の一つを有するもの:

【0154】

【化2】



などにより置換することが含まれる。

【0155】

多数のその他の2環糖代替物環系および3環糖代替物環もまた、当該技術分野において知られており、それらを使用して、アンチセンス化合物への導入のためにヌクレオシドを修飾することができる(例えば、レビュー記事: Leumann, J.C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854を参照)。そのような環系は、様々な追加の置換を受けて、活性を亢進することができる。

【0156】

修飾糖の調製のための方法は、当業者に周知である。

修飾糖成分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基成分(天然、修飾、またはそれらの組み合わせ)を、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持する。

【0157】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、修飾糖成分を有する1またはそれ以上のヌクレオチドを含む。特定の態様において、修飾糖成分は、2'-MOEである。特定の態様において、2'-MOE修飾ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフ中に配置される。

【0158】

修飾核酸塩基

核酸塩基(または塩基)修飾または置換は、天然に存在する非修飾核酸塩基または合成非修飾核酸塩基からは構造的に識別されるが、しかしながら機能的には互いに互換的である。天然の核酸塩基および修飾核酸塩基は両方共、水素結合に関与することができる。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、またはいくつかのその他の有利な生物学的特性を、アンチセンス化合物に対して付与することができる。修飾核酸塩基には、合成の核酸塩基および天然の核酸塩基、たとえば、5-メチルシトシン(5-me-C)が含まれる。5-メチルシトシン置換を含む特定の核酸塩基置換は、標的核酸に対するアンチセンス化合物の結合親和性を増加させるために、特に有用である。たとえば、5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2 増加させることが示された(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

【0159】

追加の非修飾核酸塩基には、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよびその他のアルキル、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよびその他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、ピリミジン塩基の5-プロピニル ($-C \equiv C-CH_3$) ウラシルおよびシトシンおよびその他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル (シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシおよびその他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチルおよびその他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンおよび3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが含まれる。

10

【0160】

ヘテロ環式塩基成分には、プリン塩基またはピリミジン塩基がその他のヘテロ環、たとえば 7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジンおよび2-ピリドンにより置換されるものも含まれてもよい。アンチセンス化合物の結合親和性を上昇させるために特に有用な核酸塩基には、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンおよび2アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含むN-2、N-6およびO-6置換プリン、が含まれる。

【0161】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物はk1またはそれ以上の修飾核酸塩基を含む。特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするギャップ-が広がったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1またはそれ以上の修飾核酸塩基を含む。特定の態様において、修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。特定の態様において、各シトシンは、5-メチルシトシンである。

20

【0162】

医薬組成物を製剤化するための組成物および方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物または製剤を製造するため、医薬的に許容可能な活性物質または不活性物質と混合することができる。医薬組成物の製剤化のための組成物および方法は、投与経路、疾患の程度、または投与される投与量を含む（しかしこれらには限定されない）、多数の基準に依存する。

30

【0163】

ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物を、アンチセンス化合物を適切な医薬的に許容可能な希釈剤またはキャリアと組み合わせることにより、医薬組成物中で使用することができる。医薬的に許容可能な希釈剤には、リン酸-緩衝化塩類溶液（PBS）が含まれる。PBSは、非傾向的に送達される組成物において使用するために適した希釈剤である。したがって、一態様において、本明細書中に記載された方法において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物および医薬的に許容可能な希釈剤を含む医薬組成物を使用する。特定の態様において、医薬的に許容可能な希釈剤は、PBSである。特定の態様において、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0164】

40

アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、ヒトを含む動物に対して投与するに際して、生物学的に活性な代謝物またはその残留物を（直接的または間接的に）提供することができる、医薬的に許容可能な塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、またはいずれかその他のオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、たとえば、開示は、アンチセンス化合物の医薬的に許容可能な塩、プロドラッグ、そのようなプロドラッグの医薬的に許容可能な塩、およびその他の生物学的同等物にも関する。適切な医薬的に許容可能な塩には、ナトリウム塩およびカリウム塩が含まれるが、これらには限定されない。

【0165】

プロドラッグには、生体内の内在性ヌクレアーゼにより切断されて、活性のアンチセンス化合物が形成される、アンチセンス化合物の一方の端部または両端に追加のヌクレオシ

50

ドを取り込むことが含まれていてもよい。

【0166】

複合体化アンチセンス化合物

アンチセンス化合物は、結果として得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを亢進する、1またはそれ以上の成分または複合体と共有結合していてもよい。典型的な複合体基には、コレステロール成分および脂質成分が含まれる。さらなる複合体基には、炭水化物、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオロセイン、ローダミン、クマリン、および色素が含まれる。

【0167】

アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の一方または両方の端部に一般的には結合され、たとえば、ヌクレアーゼ安定性等の特性を亢進する、1またはそれ以上の安定化基を有するように、修飾することもできる。安定化基には、キャップ構造が含まれる。これらの末端修飾は、末端核酸を有するアンチセンス化合物がエンドヌクレアーゼ分解されることから保護し、そして細胞内での送達および/または局在化を補助することができる。キャップは、5'-末端(5'-キャップ)、または3'-末端(3'-キャップ)に存在していてもよく、または両方の末端に存在していてもよい。キャップ構造は、当該技術分野においては周知であり、そしてたとえば、逆向きデオキシ脱塩基キャップが含まれる。アンチセンス化合物の一方または両方の端部をキャップして、ヌクレアーゼ安定性を付与することができるさらなる3'および5'-安定化基には、WO 03/004602(2003年1月16日に発行)に開示されるものが含まれる。

【0168】

細胞培養およびアンチセンス化合物処置

レベル、活性またはハンチンチンの発現核酸に対するアンチセンス化合物の作用は、多様な細胞型においてin vitroで試験することができる。そのような懐石に使用される細胞型は、商業的供給者(たとえば、American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD)から利用可能であり、そして細胞は供給者の指示書に従って、商業的に利用可能な試薬(たとえば、Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)を使用して、培養される。例示的な細胞型には、HepG2細胞、Hep3B細胞、初代肝細胞、A549細胞、GM04281線維芽細胞およびLLC-MK2細胞が含まれるが、これらには限定されない。

【0169】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのIn vitro試験

その他のアンチセンス化合物を用いた処置のために適切に修飾することができる、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドにより処置するための方法が、本明細書中に記載される。

【0170】

一般的に、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドにより処置し、その場合細胞は培養中に約60~80%コンフルエンスに達する。

培養細胞中にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために一般的に使用されている試薬の一つには、カチオン性脂質トランスフェクション試薬LIPOFECTIN(登録商標)(Invitrogen, Carlsbad, CA)が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM(登録商標)1(Invitrogen, Carlsbad, CA)中でLIPOFECTIN(登録商標)と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度および100 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり典型的には2~12 µg/mLの範囲であるLIPOFECTIN(登録商標)濃度を達成する。

【0171】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために使用される別の試薬には、LIPOFECTAMINE 2000(登録商標)(Invitrogen, Carlsbad, CA)が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM(登録商標)1血清減少培地(Invitrogen, Carl

10

20

30

40

50

sbad, CA) 中LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標) と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度および100 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり典型的には2~12 µg/mLの範囲であるLIPOFECTAMINE (登録商標) 濃度を達成する。

【0172】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために使用される別の試薬には、Cytfectin (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM (登録商標) 1血清減少培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中Cytfectin (登録商標) と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度および100 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2~12 µg/mLの範囲のCytfectin (登録商標) 濃度を達成する。

10

【0173】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために使用される別の技術には、エレクトロポレーションが含まれる。

細胞を、日常的な方法によりアンチセンスオリゴヌクレオチドにより処置する。細胞を、典型的にはアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の16~24時間後に回収し、その時点で標的核酸のRNAまたはタンパク質レベルを当該技術分野において知られておりそして本明細書中で記載された方法により測定される。一般的には、処置を複数回繰り返して行う場合、データを、繰り返し処置の平均として示す。

【0174】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに異なる。特定の細胞株に対する最適アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を測定するための方法は、当該技術分野において周知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、LIPOFECTAMINE2000 (登録商標)、リポフェクチンまたはCytfectinとともに使用される場合、典型的には、1 nM~300 nMの範囲の濃度で使用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトする場合、625~20,000 nMの範囲のより高い濃度で使用する。

20

【0175】

RNA単離

RNA解析を、全細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAに対して行うことができる。RNA単離の方法は、当該技術分野において周知である。RNAは、たとえば、製造者の推奨するプロトコルに従って、TRIZOL (登録商標) 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して当該技術分野において周知な方法を使用して調製される。

30

【0176】

標的レベルまたは発現の阻害の解析

ハンチンチン核酸のレベルまたは発現の阻害を、当該技術分野において知られている様々な様式でアッセイすることができる。たとえば、標的核酸レベルを、例えば、ノザンプロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、または定量的リアルタイムPCRにより定量することができる。RNA解析を、全細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAで行うことができる。RNA単離の方法は、当該技術分野において周知である。ノザンプロット解析は、当該技術分野において一般的なものである。定量的リアルタイムPCRを、PE-Applied Biosystems (Foster City, CA) から入手できる商業的に利用可能なABI PRISM (登録商標) 7600、7700、または7900 配列検出システムを使用して、そして製造者の指示書に従って使用して、容易に行うことができる。

40

【0177】

標的RNAレベルの定量的リアルタイムPCR解析

標的RNAレベルの定量を、ABI PRISM (登録商標) 7600、7700、または7900配列検出システム (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を製造者の指示書に従って使用して、定量的リアルタイムPCRにより行うことができる。定量的リアルタイムPCRの方法は、当該技術分野において周知である。

【0178】

50

リアルタイムPCRの前に、単離されたRNAを、逆転写 (RT) 反応に供し、それにより相補的なDNA (cDNA) を製造し、それをその後リアルタイムPCR増幅のための基質として使用する。RT反応およびリアルタイムPCR反応を、同一のサンプルウェル中で連続的に行う。RT試薬およびリアルタイムPCR試薬を、Invitrogen (Carlsbad, CA) から得る。RT反応、リアルタイム-PCR反応を、当業者に周知な方法により行う。

【0179】

リアルタイムPCRにより得られた遺伝子 (またはRNA) 標的の量は、発現が一定な遺伝子 (例えばシクロフィリンA) の発現レベルを使用するか、またはRIBOGREEN (登録商標) (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) を使用して全RNAを定量することにより、正規化される。シクロフィリンAの発現は、標的と同時に実行するか、多重化するか、または別個に実行することにより、リアルタイムPCRにより定量化する。全RNAを、RIBOGREEN (登録商標) RNA定量試薬 (Invitrogen, Inc., Eugene, OR) を使用して定量する。RIBOGREEN (登録商標) を使用したRNA定量の方法は、Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374) に教示される。CYTOFLUOR (登録商標) 4000装置 (PE Applied Biosystems) を使用して、RIBOGREEN (登録商標) 蛍光を測定する。

【0180】

プローブおよびプライマを、ハンチンチン核酸に対してハイブリダイズするように設計する。リアルタイムPCRプローブおよびプライマーを設計する方法は、are当該技術分野において周知であり、そしてPRIMER EXPRESS (登録商標) ソフトウェア (Applied Biosystems, Foster City, CA) などのソフトウェアを使用することが含まれる。

【0181】

タンパク質レベルの解析

ハンチンチン核酸のアンチセンス阻害を、ハンチンチンタンパク質レベルを測定することにより評価することができる。ハンチンチンのタンパク質レベルを、例えば免疫沈降法、ウェスタンブロット解析 (イムノブロッティング)、酵素結合イムノソーベントアッセイ (ELISA)、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ (たとえば、カスパーゼ活性アッセイ)、免疫組織化学、免疫細胞化学または蛍光-活性化細胞ソーティング (FACS) などの、当該技術分野において周知な様々な方法で評価し、または定量化することができる。標的に対する抗体を、MSRS抗体カタログ (Aerie Corporation, Birmingham, MI) などの様々な供給源から同定しそして入手することができ、または当該技術分野において周知な、従来のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の作成方法を介して調製することができる。ヒトおよびラットハンチンチンの検出のために有用な抗体は、商業的に利用可能である。

【0182】

アンチセンス化合物のIn vivo試験

アンチセンス化合物、たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、を、動物において試験して、ハンチンチンの発現を阻害し、そして表現型変化を生成するそれらの能力を評価する。試験を、正常な動物においてあるいは実験的疾患モデルにおいて行うことができる。動物に対する投与のため、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、リン酸-緩衝化塩類溶液などの医薬的に許容可能な希釈剤中で製剤化する。投与には、非経口投与経路が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置期間の後、RNAを組織から単離し、そしてハンチンチン核酸発現の変化を測定する。ハンチンチンタンパク質レベルの変化も測定する。

【0183】

特定の化合物

約1700個の新たに設計された様々な長さ、モチーフおよびバックボーン組成物のアンチセンス化合物を、いくつかの細胞型においてin vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について試験した。新規な化合物を、in vitroにおいて最も強力なアンチセンス化合物の一つと以前に特定されたISIS 387916を含む約250個の以前に設計した化合物と比較した (例えば、U.S.特許出願公開Nos. 2008/0039418および2007/0299027)。約170

0個の新たに設計されたアンチセンス化合物のうち、約60個の化合物を、ISIS 387916と比較したin vitro強度に基づいて、さらなる研究のために選択した。選択された化合物を、以前に設計されたISIS 388241およびISIS 387916と比較して、全身性耐容性（実施例3を参照）およびBACHDマウスの脳における活性および耐容性（実施例4を参照）について試験した。これらの研究から、SEQ ID NO: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22または32で記載された配列の核酸塩基配列を有する化合物を、高い耐容性および高いin vivo強度を有するものとして選択された。それらの相補的な配列の理由で、化合物は、SEQ ID NO: 1の領域4384-4403、4605-4624、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4617-4636、4622-4639、4813-4832、4814-4833、4823-4842、4860-4877、4868-4887、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4931-4948、4955-4974、4960-4977、5801-5820、5809-5828、5809-5826、101088-101105、115066-115085、4607-4626、4608-4627、4609-4628、4610-4629、4813-4832、4862-4881、5809-5828または4928-4947に対して相補的である。特定の態様において、本明細書中でさらに記載されるように列挙された領域を標的とする化合物は、本明細書中でさらに記載されるようにSEQ ID NOsで記載された配列のいくつかの核酸塩基部分を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、列挙されたSEQ ID NOsに記載される列挙された領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに記載される配列の核酸塩基部分を有する化合物は、本明細書中でさらに記載されるように、様々な長さのものであってもよく、そして本明細書中で記載されるように、様々なモチーフの一つを有していてもよい。特定の態様において、列挙されたSEQ ID NOsに記載される領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに記載される配列の核酸塩基部分を有する化合物は、ISIS NOs: ISIS 419628、ISIS 419637、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 451541、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 436684、ISIS 436689、ISIS 436754、ISIS 437168、ISIS 437175、ISIS 437441、ISIS 437442、ISIS 437507、ISIS 437527、ISIS 443139、ISIS 444578、ISIS 444584、ISIS 444591、ISIS 444607、ISIS 444608、ISIS 444615、ISIS 444618、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、ISIS 444659、ISIS 444660、ISIS 444661、またはISIS 444663により示される様な、特定の長さおよびモチーフを有する。

【0184】

高いin vivo強度および耐容性を有するものとして上述される化合物を、ついで、SEQ ID NO: 7、8、11、16、17に記載される配列の核酸塩基配列を有するいくつかの追加の化合物とあわせて、ラットにおいてCNSポータス注射により試験して、神経毒性をさらに評価した（実施例5を参照）。これらのうち、SEQ ID NO: 24、25、26、6、12、28、21、22、32または13に記載される配列の核酸塩基配列を有する10個の化合物を、高い耐容性を有するものとして選択する。それらの相補的な配列のため、化合物は、SEQ ID NO: 1の領域4384-4403、4609-4628、4610-4629、4860-4877、4862-4881、4925-4944、4928-4947、4931-4950、4955-4974、または5809-5829に対して相補的である。特定の態様において、本明細書中でさらに記載されるように、列挙された領域を標的とする化合物は、本明細書中でさらに記載されるように、SEQ ID NOsにおいて記載される配列のいくつかの核酸塩基部分を有する、修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、列挙された領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに記載される配列核酸塩基部分を有する化合物は、本明細書中でさらに記載されるように、様々な長さのものであってもよく、そして本明細書中でさらに記載されるように、様々なモチーフの一つを有するものでもよい。特定の態様において、列挙されたSEQ ID NOsに記載された配列の領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに記載された配列の核酸塩基部分を有する化合物は、ISIS NOs: ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 436689、ISIS 437507、ISIS 443139、ISIS 444591、およびISIS 444661により示された、特定の長さおよびモチーフを有する。選択された化合物を、BACHDマウスにおいてICV投与することにより、以前に設計した化合物ISIS 388241と比較した。

【0185】

ついで、追加の研究を、高いin vivo強度および耐容性を有するものとして、上述した化合物に対して行った。追加の研究を、神経毒性をさらに評価するために設計した。研究には、野生型マウスにおけるICV投与（実施例16を参照）およびラットにおけるボラス投与（実施例17を参照）が含まれた。SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33を、高い神経耐容性を有するものとして選択した。それらの相補的な配列により、化合物は、SEQ ID NO: 1の領域4862-4881、4609-4628、5809-5828、5809-5826、5801-5820、および4955-4974に対して相補的である。特定の態様において、本明細書中でさらに記載された様な列挙された領域を標的とする化合物は、本明細書中でさらに記載されたSEQ ID NOsに記載された配列のいくつかの核酸塩基部分を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを含む。特定の態様において、列挙された領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに示される配列核酸塩基部分を有する化合物は、本明細書中でさらに記載されたような様々な長さのものであってもよく、そして、本明細書中でさらに記載されたような様々なモチーフの一つを有するものであってもよい。特定の態様において、領域を標的とする化合物または列挙されたSEQ ID NOsに記載される配列の核酸塩基部分を有する化合物は、特異的な長さを有し、そしてISIS 388241、ISIS 443139、ISIS 436671、ISIS 444591、ISIS 437527、ISIS 444584、ISIS 444652、およびISIS 436689により示されるようなモチーフを有する。

10

【0186】

したがって、改良された特徴を有するアンチセンス化合物が、本明細書中で提供される。特定の態様において、本明細書中でさらに記載される様なSEQ ID NO: 1のヌクレオチドの領域を標的とするか、またはその様な領域と特異的にハイブリダイズ可能である修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物が、本明細書中で提供される。

20

【0187】

特定の態様において、本明細書中で記載される化合物は、本明細書中で記載されるヒト線維芽細胞細胞株に対して送達する場合に7μM未満、6μM未満、5μM未満、4μM未満、3μM未満、2μM未満、1μM未満、のin vitro IC₅₀、またはボラス注射により10μg未満、9μg未満、8μg未満、7.5μg未満、7.4μg未満、7.0μg未満、6μg未満、5μg未満、4μg未満、3μg未満、または2μg未満、のED₅₀の少なくとも1つを有するため、効果的である。本明細書中で記載されたように、ICV注入は、本明細書中で記載された化合物について、3~4倍高いED₅₀値を結果として生じる可能性がある。特定の態様において、本明細書中で記載される化合物は、整理食塩水処置動物と比較して、わずか4倍、3倍、または2倍のALT値またはAST値の上昇；わずか30%、20%、15%、12%、10%、5%または2%の肝臓重量、脾臓重量または腎臓の上昇；または対照と比較して、わずか350%、300%、275%、250%、200%、150%または100%のAIF1レベルの上昇；少なくとも1つの上昇を有することにより示されるように、非常に耐容性である。

30

【0188】

特定の症状

特定の態様において、本明細書中で記載された1またはそれ以上の医薬組成物を投与することを含む、個体を治療する方法が、本明細書中で提供される。特定の態様において、個体は、ハンチントン病を有する。

40

【0189】

以下の実施例に示されるように、本明細書中で記載される様なハンチンチンを標的とする化合物は、ハンチントン病の生理学的症状の重症度を軽減することが示された。特定の試験において、化合物は、退行の速度を低下させ、例えば、動物は、症状を経験し続けるが、しかし症状は、非処置動物と比較して、重症度がより低かった。しかしながら、別の試験において、化合物は、時間と共に機能の再生を生じるようである；例えば、より長い期間処置した動物は、より短時間、化合物の投与を受けた動物よりも、重症度の低い症状を経験した。上述したように、ハンチントン病は、時間とともに症状の重症度が増加することが典型的な、進行性の疾患である。したがって、以下に例示される化合物が、機能を回復する能力は、疾患の症状が、本明細書中で記載されたような化合物での処置により、

50

好転しうることを示している。

【0190】

したがって、ハンチントン病に関連する症状を軽減させることが必要な被験体において、ハンチントン病に関連する症状を軽減するための方法が、本明細書中で提供される。特定の態様において、ハンチントン病に関連する症状の開始速度を低下させるための方法が提供される。特定の態様において、ハンチントン病に関連する症状の重症度を低下させるための方法を提供する。特定の態様において、ハンチントン病に関連する症状の改善により示されるような、神経学的機能を再生するための方法が提供される。そのような態様において、方法は、必要とする個体に対して、ハンチンチン核酸を標的とする治療的有効量の化合物を投与することを含む。

10

【0191】

ハンチントン病は、多数の身体的症状、神経学的症状、精神医学的症状、および/または末梢的症状により特徴付けられる。ハンチントン病に関連すべき当業者に対して知られているいずれかの症状は、上述の方法において上記に説明したように、改良されるかまたは調節される。特定の態様において、症状は、身体的症状からなる群から選択される、情動不安、協調不足、意図せず開始される運動、意図せず完了されない運動、歩行不安定、舞踏病、硬直、身もだえするような運動、異常姿勢、不安定性、異常な顔貌、そして困難、嚥下困難、発話困難、発作、および睡眠障害である。特定の態様において、症状は、認知症状からなる群から選択される、計画性低下、柔軟性低下、抽象的思考低下、ルール習得低下、適切な動作の開始の低下、不適切な動作の阻害の低下、短期記憶の低下、長期記憶の低下、パラノイア、見当識障害、精神錯乱、幻覚および認知症である。特定の態様において、症状は、精神医学的症状からなる群から選択される、不安、抑鬱症、感情鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、易刺激性および自殺念慮である。特定の態様において、症状は、末梢症状からなる群から選択される、脳容量の低下、筋萎縮、心不全、グルコース耐性の低下、体重減少、骨粗鬆症、および精巣萎縮である。

20

【0192】

特定の態様において、症状は、情動不安である。特定の態様において、症状は、協調不足である。特定の態様において、症状は、意図せず開始される運動である。特定の態様において、症状は、意図せず完了されない運動である。特定の態様において、症状は、歩行不安定である。特定の態様において、症状は、舞踏病である。特定の態様において、症状は、硬直である。特定の態様において、症状は、身もだえするような運動である。特定の態様において、症状は、異常姿勢である。特定の態様において、症状は、不安定性である。特定の態様において、症状は、異常な顔貌である。特定の態様において、症状は、そして困難である。特定の態様において、症状は、嚥下困難である。特定の態様において、症状発話困難である。特定の態様において、症状は、発作である。特定の態様において、症状は、睡眠障害である。

30

【0193】

特定の態様において、症状は、計画性低下である。特定の態様において、症状は、柔軟性低下である。特定の態様において、症状は、抽象的思考低下である。特定の態様において、症状は、ルール習得低下である。特定の態様において、症状は、適切な動作の開始の低下である。特定の態様において、症状は、不適切な動作の阻害の低下である。特定の態様において、症状は、短期記憶の低下である。特定の態様において、症状は、長期記憶の低下である。特定の態様において、症状は、パラノイアである。特定の態様において、症状は、見当識障害である。特定の態様において、症状は、精神錯乱である。特定の態様において、症状は、幻覚である。特定の態様において、症状は、認知症。

40

特定の態様において、症状は、不安である。特定の態様において、症状は、抑鬱症である。特定の態様において、症状は、感情鈍麻である。特定の態様において、症状は、自己中心性である。特定の態様において、症状は、攻撃性である。特定の態様において、症状は、強迫行動である。特定の態様において、症状は、易刺激性である。特定の態様において、症状は、自殺念慮である。

50

【0194】

特定の態様において、症状は、脳容量の低下である。特定の態様において、症状は、筋萎縮である。特定の態様において、症状は、心不全である。特定の態様において、症状は、グルコース耐性の低下である。特定の態様において、症状は、体重減少である。特定の態様において、症状は、骨粗鬆症である。特定の態様において、症状は、精巣萎縮である。

【0195】

特定の態様において、ハンチントン病の症候は、定量可能であってもよい。たとえば、骨粗鬆症は、たとえば、骨密度スキャンにより、測定しそして定量化することができる。そのような症候のため、特定の態様において、症状は、約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または99%、またはこれらの値のいずれか2つにより規定される範囲にまで減少させることができる。

10

【0196】

特定の態様において、本明細書中で記載されたような1またはそれ以上の医薬組成物を投与することを含む、個体を治療するための方法を提供する。特定の態様において、個体は、ハンチントン病を有する。

【0197】

特定の態様において、ハンチンチン核酸を標的とするアンチセンス化合物の投与は、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または99%、またはこれらの値のいずれか2つにより規定される範囲にまで、ハンチンチン発現の減少を生じる。

20

【0198】

特定の態様において、ハンチンチンを標的とするアンチセンス化合物を含む医薬組成物は、ハンチントン病に罹患しているかまたはかかりやすい患者を治療するための医薬の調製のために使用される。

【0199】

特定の態様において、本明細書中に記載される方法には、SEQ ID NO: 6、9、10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、35、36、10、11、12、13、18、22または32に記載される配列の、本明細書中に記載される様な隣接した核酸塩基部分を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することが含まれる。特定の態様において、本明細書中に記載される方法には、SEQ ID NOs: 12、22、28、30、32、および33に記載された配列の、本明細書中に記載される様な隣接した核酸塩基部分を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することが含まれる。

30

【0200】

投与

特定の態様において、本明細書中にて記載される化合物および組成物は、非経口的に投与される。

【0201】

特定の態様において、非経口投与は、注入である。注入は、慢性的な注入であっても、または持続的な注入であっても、または短時間の注入であっても、あるいは周期的な注入であってもよい。特定の態様において注入された医薬剤は、ポンプにより送達される。特定の態様において、非経口投与は、注射によるものである。

40

【0202】

特定の態様において、化合物および組成物が、CNSに対して送達される。特定の態様において、化合物および組成物は、脳脊髄液に送達される。特定の態様において、化合物および組成物は、脳実質に投与される。特定の態様において、化合物および組成物を、くも膜下腔投与または脳室内投与により、動物に対して送達する。本明細書中で記載されたような中枢神経系内部での化合物および組成物の広範な分布を、実質内投与、くも膜下腔投与または脳室内投与により、達成することができる。

50

【0203】

特定の態様において、非経口投与は、注射によるものである。注射は、シリンジまたはポンプにより送達することができる。特定の態様において、注射は、ボーラス注射である。特定の態様において、注射は、組織、例えば大脳基底核線条体、尾状、皮質、海馬および小脳に対して直接的に投与される。

【0204】

ハンチンチンmRNA発現を阻害するためのアンチセンス化合物の中央値有効濃度 (EC_{50}) を、ICV注入またはボーラス注射のいずれかの後に算出した（実施例9および10を参照）。線条体内注射後の化合物についての EC_{50} を、 $0.45 \mu\text{g/g}$ と決定された。ICV 投与後の EC_{50} は、 $26.4 \mu\text{g/g}$ と決定された。

10

【0205】

したがって、特定の態様において、本明細書中に記載される化合物または組成物の送達は、化合物または組成物の薬物動態プロファイルに影響を与えることができる。特定の態様において、本明細書中で記載された化合物または組成物の標的化組織への注射は、化合物または組成物の注入と比較して、化合物または組成物の薬物動態プロファイルを改善する。特定の態様において、化合物または組成物の注射は、広範な拡散と比較して、強度を向上し、結果として同様の薬理を得るためにより少ない化合物または組成物を必要とすることになる。特定の態様において、同様の薬理は、標的mRNAおよび/または標的タンパク質が下方制御される期間（たとえば、作用期間）のことをいう。特定の態様において、ボーラス注射などの医薬品を特異的に局在化する方法は、中央値有効濃度 (EC_{50}) を約50倍低下させた（たとえば、組織中で濃度が50分の1になることは、同一のまたは類似の薬物動態作用を達成するために必要とされる）。特定の態様において、例えばボーラス注射により、医薬品を特異的に局在化するための方法は、中央値有効濃度 (EC_{50}) を、20、25、30、35、40、45 または50倍低下させた。特定の態様において、医薬剤は、本明細書中でさらに記載されたように、アンチセンス化合物である。特定の態様において、標的化組織は、脳組織である。特定の態様において、標的化組織は、大脳基底核線条体組織である。特定の態様において、 EC_{50} を低下させることにより、薬理学的結果を達成することが必要な患者において、薬理学的結果を達成するために必要とされる用量を低下させるため、 EC_{50} を低下させることが好ましい。

20

【0206】

脳組織におけるMOEギャップマーオリゴヌクレオチドの半減期は、約20日である（実施例9～11を参照）。ハンチンチンmRNAの阻害により測定される作用期間は、脳内において長期化される（実施例9および10を参照）。2週間にわたるアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内注入により、投与の終了後少なくとも91日のあいだBACHDマウスの大脳基底核線条体組織において、少なくとも50%のハンチンチンmRNAの阻害を生じる。ボーラス注射による投与は、同様の作用期間を生じる。

30

【0207】

特定の態様において、本明細書中で記載された化合物または組成物のCNSへの送達は、少なくとも91日のあいだ標的mRNAおよび/または標的タンパク質の47%の下方制御を生じる。特定の態様において、化合物または組成物の送達は、少なくとも20日、少なくとも30日、少なくとも40日、少なくとも50日、少なくとも60日、少なくとも70日、少なくとも80日、少なくとも85日、少なくとも90日、少なくとも95日、少なくとも100日、少なくとも110日、少なくとも120日のあいだ、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、または少なくとも75%の標的mRNAおよび/または標的タンパク質の下方制御を生じる。特定の態様において、CNSへの送達は、実質内投与、くも膜下腔投与、または脳室内投与による。

40

【0208】

特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、毎月1回、2ヶ月に1回、90日ごと、3ヶ月ごと、6ヶ月ごと、1年に2回、または1年に1回、注射または注入により送達

50

する。

【0209】

特定の組み合わせ治療

特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物を、1またはそれ以上のその他の医薬剤と同時投与する。特定の態様において、そのような1またはそれ以上のその他の医薬剤は1またはそれ以上の医薬組成物本明細書中で記載されたように、同一の疾患、障害、または症状を治療するために設計される。特定の態様において、そのような1またはそれ以上のその他の医薬剤は、1またはそれ以上の医薬組成物本明細書中で記載されたように、異なる疾患、障害、または症状を治療するように設計される。特定の態様において、そのような1またはそれ以上のその他の医薬剤は、本明細書中で記載されたように、1またはそれ以上の医薬組成物の望ましくない副作用を治療するために設計される。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物を、別の医薬剤とともに同時投与し、別の医薬剤の望ましくない作用を治療する。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物を、別の医薬剤と同時投与し、組み合わせ効果を生じる。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物を別の医薬剤と同時投与し、相乗的作用を生じる。

10

【0210】

特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物および1またはそれ以上のその他の医薬剤を、同時に投与する。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物および1またはそれ以上のその他の医薬剤を、別々の時に投与する。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物および1またはそれ以上のその他の医薬剤を、単一剤形中に一緒に調整する。特定の態様において、1またはそれ以上の医薬組成物および1またはそれ以上のその他の医薬剤を、べつべつに調製する。

20

【0211】

特定の態様において、医薬組成物と同時投与することができる医薬剤には、抗精神病薬、例えば、ハロペリドール、クロルプロマジン、クロザピン、クエチアピン (quetapine)、およびオランザピン；抗鬱剤、例えば、フルオキセチン、セルトラリン塩酸塩、ベンラファクシンおよびノルトリプチリン；精神安定剤、例えば、ベンゾジアゼピン、クロナゼパム、パロキセチン、ベンラファクシン、および β -ブロッカー；気分安定剤、例えば、リチウム、バルプロエート、ラモトリジン、およびカルバマゼピン；まひ薬、例えば、ボツリヌス毒素；および/または、(しかしこれらには限定されない) テトラベナジン (Xenazine)、クレアチン、コエンザイムQ10、トレハロース、ドコサヘキサエン酸、ACR16、エチル-EPA、アトモキセチン、シタロプラム、ジメボン (dimebon)、メマンチン、フェニル酪酸ナトリウム、ラメルテオン、ウルソジオール、ジブレキサ、ゼナシン (xenazine)、チアプリド、リルゾール、アマンタジン、[123I]MNI-420、アトモキセチン、テトラベナジン、ジゴキシン、デキストロメトルファン、ワルファリン、アルプロザム (alprozam)、ケトコナゾール、オメブラゾール、およびミノサイクリンを含む、その他の実験的薬剤；が含まれる。

30

【実施例】

【0212】

限定的ではない開示および参照による援用

40

本明細書中で記載される特定の化合物、組成物および方法は、特定の態様にしたがって具体的に記載されたが、一方で以下の事例は本明細書中で記載された化合物の説明のためにのみ機能し、それを限定することを意図しない。本件出願において記載される参考文献のそれぞれは、その全体を参照により本明細書中に援用される。

【0213】

実施例1: ヒトハンチンチン遺伝子配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

ヒトハンチンチン遺伝子配列を標的とする、様々な長さ、モチーフ、そしてバックボーン組成の約1700種の新たに設計したアンチセンス化合物を、いくつかの細胞型における *in vitro*でのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について試験した。これらのギャップマーは、ホスホロチオエート結合のみであるヌクレオシド間結合(表1に記載)また

50

はホスホロチオエートとホスホジエステル結合であるヌクレオシド間結合（表5に記載）によりさらに設計した。多数の新たに設計されたオリゴおよび2つのベンチマークオリゴヌクレオチド（以前に設計され開示されたもの）は、表1および表5に提示される。

【 0 2 1 4 】

完全にホスホロチオエートヌクレオシド間結合であるギャップマー

表1に示される化合物の特定のもの、5-10-5 MOE、6-8-6 MOE、または5-8-5 MOEのモチーフを有する。5-10-5ギャップマーは、20個の連結したヌクレオシドを有し、ここで中央部ギャップ部分は10個の2'-デオキシヌクレオシドを有し、そしてそれぞれ5個のヌクレオシドを有するウィングが両側（5'方向および3'方向）に配置される。6-8-6ギャップマーは、20個の連結したヌクレオシドを有し、ここで中央部ギャップ部分は、8個の2'-デオキシヌクレオシドを有し、そしてそれぞれ6個のヌクレオシドを有するウィングが両側（5'方向および3'方向）に配置される。5-8-5ギャップマーは、18個の連結したヌクレオシドを有し、ここで中央部ギャップ部分は、8個の2'-デオキシヌクレオシドを有し、そしてそれぞれ5個のヌクレオシドを有するウィングが両側（5'方向および3'方向）に配置される。表1に列挙されるすべてのギャップマーについて、5'ウィング部分のそれぞれのヌクレオシドおよび3'ウィング部分のそれぞれのヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体を通じたヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート（P=S）ヌクレオシド間結合である。それぞれのギャップマー全体を通じたすべてのシトシンは、5-メチルシトシンである。表1におけるそれぞれのギャップマーは、SEQ ID NO: 1（GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6）またはSEQ ID NO: 2（ヌクレオチド462000～634000が短縮された、GENBANKアクセッションNo. NT_006081.17）を標的とする。‘開始部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘停止部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。

【 0 2 1 5 】

10

20

【表 1】

表 1：ヒトハンチンチン遺伝子配列 (SEQ ID NO: 1 および SEQ ID NO: 2) を標的とする、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド

開始 部位	停止 部位	標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	配列 (5'→3')	モチーフ	SEQ ID NO.
4384	4403	1	436665	TAGCATTCTTATCTGCACGG	5-10-5	6
4511	4530	1	436668	ACCCGTAACCTGAACCAGCTG	5-10-5	7
4599	4618	1	419627	TTCCCTGAACTGGCCCACTT	5-10-5	8
4605	4624	1	419628	CTCTGATTCCCTGAACTGGC	5-10-5	9
4607	4626	1	444607	GCCTCTGATTCCCTGAACTG	5-10-5	10
4608	4627	1	419629	TGCCTCTGATTCCCTGAACT	5-10-5	11
4608	4627	1	444578	TGCCTCTGATTCCCTGAACT	6-8-6	11
4609	4628	1	436671	TTGCCTCTGATTCCCTGAAC	5-10-5	12
4610	4629	1	444608	ATTGCCTCTGATTCCCTGAA	5-10-5	13
4617	4636	1	444615	TGGAATGATTGCCTCTGATT	5-10-5	14
4622	4639	1	437168	GTTTGGAATGATTGCCTC	5-8-5	15
4679	4698	1	419630	CCAATGATCTGTTTTGAATG	5-10-5	16
4733	4752	1	419636	GCCTTCCTTCCACTGGCCAT	5-10-5	17
4813	4832	1	444618	CTGCATCAGCTTTATTTGTT	5-10-5	18
4814	4833	1	419637	CCTGCATCAGCTTTATTTGT	5-10-5	19
4823	4842	1	444627	AGCTCTTTTCCCTGCATCAGC	5-10-5	20
4860	4877	1	437507	GTAACATTGACACCACCA	5-8-5	21
4862	4881	1	388241	CTCAGTAACATTGACACCAC	5-10-5	22
4868	4887	1	436684	ATGAGTCTCAGTAACATTGA	5-10-5	23
4925	4944	1	419640	TCCTTGTGGCACTGCTGCAG	5-10-5	24
4928	4947	1	419641	TTCTCCTTGTGGCACTGCTG	5-10-5	25
4931	4950	1	419642	TCATTCTCCTTGTGGCACTG	5-10-5	26
4931	4948	1	437442	ATTCTCCTTGTGGCACTG	5-8-5	27
4955	4974	1	436689	CGAGACAGTCGCTTCCACTT	5-8-5	28
4960	4977	1	437175	TGTCGAGACAGTCGCTTC	5-8-5	29
5801	5820	1	444584	TTGCACATTCCAAGTTTGGC	5-10-5	30
5807	5826	1	387916	TCTCTATTGCACATTCCAAG	5-10-5	31
5809	5828	1	444591	TTTCTCTATTGCACATTCCA	5-10-5	32
5809	5826	1	437527	TCTCTATTGCACATTCCA	5-8-5	33
1446	1465	2	388817	GCAGGGTTACCGCCATCCCC	5-10-5	34
101088	101105	2	437441	ACCTTATCTGCACGGTTC	5-8-5	35
115066	115085	2	436754	CTCTCTGTGTATCACCTTCC	5-10-5	36

マウス、アカゲザルおよびラットのハンチンチン遺伝子配列を有する表1のギャップマーの相補性が、表2、表3、および表4においてさらに記載される。

【 0 2 1 6 】

表2のギャップマーは、マウスハンチンチンmRNA (GENBANKアクセスNo. NM_010414.1、本明細書中ではSEQ ID NO: 3と記載される) と相補的である。‘マウス標的開始部位’は、マウスmRNA中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘マウス標的停止部位’は、マウスmRNA中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、遺伝子配列中のギャップマーが標的

とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドとマウスmRNA配列との間でのミスマッチの数を示す。

【0217】

【表2】

表2：ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、マウス mRNA (SEQ ID NO: 3) との相補性

ヒト開始部位	ヒト停止部位	ヒト標的SEQ ID NO.	ISIS No.	マウス開始部位	マウス停止部位	ミスマッチ数	SEQ ID NO.
4384	4403	1	436665	4343	4362	0	6
4511	4530	1	436668	4470	4489	1	7
4599	4618	1	419627	4558	4577	0	8
4605	4624	1	419628	4564	4583	0	9
4607	4626	1	444607	4566	4585	0	10
4608	4627	1	419629	4567	4586	0	11
4608	4627	1	444578	4567	4586	0	11
4609	4628	1	436671	4568	4587	0	12
4610	4629	1	444608	4569	4588	0	13
4617	4636	1	444615	4576	4595	1	14
4622	4639	1	437168	4581	4598	2	15
4679	4698	1	419630	4638	4657	0	16
4733	4752	1	419636	4692	4711	0	17
4813	4832	1	444618	4772	4791	0	18
4814	4833	1	419637	4773	4792	0	19
4823	4842	1	444627	4782	4801	1	20
4925	4944	1	419640	4884	4903	0	24
4928	4947	1	419641	4887	4906	0	25
4931	4950	1	419642	4890	4909	0	26
4931	4948	1	437442	4890	4907	0	27
4955	4974	1	436689	4914	4933	3	28
5807	5826	1	387916	5763	5782	1	31
5809	5826	1	437527	5765	5782	1	33
5809	5828	1	444591	5765	5784	1	32
101088	101105	2	437441	4340	4357	2	35

表3のギャップマーは、アカゲザルハンチンチンゲノム配列（ヌクレオチド698000～866000が短縮されたGENBANKアクセスNo. NW_001109716.1の相補物、本明細書中ではSEQ ID NO: 4と記載される）と相補的である。‘アカゲザル標的開始部位’は、アカゲザル遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘アカゲザル標的停止部位’は、アカゲザル遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザル遺伝子配列との間でのミスマッチの数を示す。

【0218】

【表 3】

表 3：ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、
アカゲザル遺伝子配列（SEQ ID NO: 4）との相補性

ヒト 開始 部位	ヒト 停止 部位	ヒト 標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	アカゲザル 開始 部位	アカゲザル 停止 部位	ミスマ ッチ数	SEQ ID NO.
4511	4530	1	436665	98182	98201	0	6
4599	4618	1	419627	101353	101372	1	8
4609	4628	1	436671	102256	102275	3	12
4610	4629	1	444608	102257	102276	2	13
4617	4636	1	444615	102264	102283	0	14
4622	4639	1	437168	102269	102286	0	15
4679	4698	1	419630	102326	102345	0	16
4733	4752	1	419636	102380	102399	0	17
4813	4832	1	444618	105030	105049	0	18
4814	4833	1	419637	105031	105050	0	19
4823	4842	1	444627	105040	105059	0	20
4860	4877	1	437507	105077	105094	1	21
4862	4881	1	388241	105079	105098	1	22
4868	4887	1	436684	105085	105104	0	23
4925	4944	1	419640	106844	106863	0	24
4928	4947	1	419641	106847	106866	0	25
4931	4950	1	419642	106850	106869	0	26
4931	4948	1	437442	106850	106867	0	27
4955	4974	1	436689	106874	106893	0	28
4960	4977	1	437175	106879	106896	0	29
5801	5820	1	444584	125331	125350	0	30
5807	5826	1	387916	125337	125356	0	31
5809	5826	1	437527	125339	125356	0	33
5809	5828	1	444591	125339	125358	0	32
101088	101105	2	437441	97904	97921	0	35
115066	115085	2	436754	110518	110537	0	36

表4のギャップマーは、ラットハンチンチンmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_02435
7.2、本明細書中ではSEQ ID NO: 5と記載される）と相補的である。‘ラット標的開始部
位’は、ラットmRNA中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ラ
ット標的停止部位’は、ラットmRNA中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチ
ドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5
'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、ヒト遺伝子配列中のギャップマーが
標的とする3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドと
ラットmRNA配列との間でのミスマッチ数を示す。

【 0 2 1 9 】

【表 4】

表 4：ホスホロチオエート結合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、
ラット mRNA (SEQ ID NO: 5) との相補性

ヒト 開始 部位	ヒト 停止 部位	ヒト 標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	ラット 開始 部位	ラット 停止 部位	ミスマッ チ数	SEQ ID NO.
4384	4403	1	436665	4343	4362	1	6
4511	4530	1	436668	4470	4489	1	7
4599	4618	1	419627	4558	4577	0	8
4605	4624	1	419628	4564	4583	0	9
4607	4626	1	444607	4566	4585	0	10
4608	4627	1	419629	4567	4586	0	11
4608	4627	1	444578	4567	4586	0	11
4609	4628	1	436671	4568	4587	0	12
4610	4629	1	444608	4569	4588	0	13
4617	4636	1	444615	4576	4595	1	14
4622	4639	1	437168	4581	4598	2	15
4679	4698	1	419630	4638	4657	0	16
4733	4752	1	419636	4692	4711	0	17
4813	4832	1	444618	4772	4791	0	18
4814	4833	1	419637	4773	4792	0	19
4823	4842	1	444627	4782	4801	1	20
4925	4944	1	419640	4884	4903	1	24
4928	4947	1	419641	4887	4906	1	25
4931	4950	1	419642	4890	4909	1	26
4931	4948	1	437442	4890	4907	1	27
4955	4974	1	436689	4914	4933	3	28
5801	5820	1	444584	5757	5776	3	30
5807	5826	1	387916	5763	5782	0	31
5809	5826	1	437527	5765	5782	0	33
5809	5828	1	444591	5765	5784	0	32
101088	101105	2	437441	4340	4357	2	35

ホスホロチオエートヌクレオシド間結合とホスホジエステルヌクレオシド間結合との混合を有するギャップマー

表5におけるキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-10-5 MOEギャップマーとして設計された。5-10-5ギャップマーは、20個の連結したヌクレオシドを有し、ここで中央部ギャップ部分は、10個の2'-デオキシヌクレオチドを有し、そしてそれぞれ5個のヌクレオシドを有するウィングが両側（5'方向および3'方向）に配置される。5'ウィング部分のそれぞれのヌクレオシドおよび3'ウィング部分のそれぞれのヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。中央部ギャップ部分内部のヌクレオシド間結合、ギャップ部分を5'ウィング部分または3'ウィング部分に結合する結合、そしてそれぞれのウィング部分の最も5'側のヌクレオシドおよび最も3'側のヌクレオシドについての結合が、すべて、ホスホロチオエート（P=S）結合である；5'ウィング部分および3'ウィング部分の両方のヌクレオシドの残りを結合するヌクレオシド間結合が、ホスホジエステル結合である；すなわち、ギャップマーは、混合バックボーンを有する。それぞれのギャップマーの全体を通じてすべてのシトシンは、5-メチルシトシンである。表5におけるそれぞれのギャップマーは、ヒトmRNA

配列 (GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6、本明細書中でSEQ ID NO: 1と示される) を標的とする。‘開始部位’は、ヒトmRNA中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示すが。‘停止部位’は、ヒトmRNA中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。

【0220】

【表5】

表5：ホスホロチオエートヌクレオシド間結合およびホスフェートヌクレオシド間結合を有する、ヒトハンチンチン mRNA (SEQ ID NO: 1) を標的とするキメラアンチセンスオリゴヌクレオチド

開始部位	停止部位	標的SEQ ID NO.	ISIS No.	配列 (5'→3')	モチーフ	SEQ ID NO.
4607	4626	1	444658	GCCTCTGATTCCCTGAACTG	5-10-5	10
4608	4627	1	444659	TGCCTCTGATTCCCTGAACT	5-10-5	11
4609	4628	1	444660	TTGCCTCTGATTCCCTGAAC	5-10-5	12
4610	4629	1	444661	ATTGCCTCTGATTCCCTGAA	5-10-5	13
4813	4832	1	444663	CTGCATCAGCTTTATTTGTT	5-10-5	18
4862	4881	1	443139	CTCAGTAACATTGACACCAC	5-10-5	22
5809	5828	1	444652	TTTCTCTATTGCACATTCCA	5-10-5	32
4928	4947	1	451541	TTCTCCTTGTGGCACTGCTG	5-10-5	25

表5中のギャップマーの、マウスハンチンチン遺伝子配列、アカゲザルハンチンチン遺伝子配列およびラットハンチンチン遺伝子配列との相補性は、表6、表7、および表8にさらに記載される。

【0221】

表6のギャップマーは、マウスハンチンチン mRNA (GENBANKアクセッションNo. NM_010414.1; SEQ ID NO: 3) と相補的である。‘マウス標的開始部位’は、マウスmRNA中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘マウス標的停止部位’は、マウスmRNA中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒトmRNA (GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6) 中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、ヒトmRNA (GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6) 中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドとマウスmRNA配列との間でのミスマッチ数を示す。

【0222】

10

20

30

【表 6】

表 6：ホスホロチオエート結合およびホスフェート結合の混合を有する
アンチセンスオリゴヌクレオチドの、マウス mRNA (SEQ ID NO: 3) との相補性

ヒト開始部位	ヒト停止部位	ヒト標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	マウス 開始 部位	マウス 停止 部位	ミスマッ チ数	SEQ ID NO.
4607	4626	1	444658	4566	4585	0	10
4608	4627	1	444659	4567	4586	0	11
4609	4628	1	444660	4568	4587	0	12
4610	4629	1	444661	4569	4588	0	13
4813	4832	1	444663	4772	4791	0	18
5809	5828	1	444652	5765	5784	1	32

10

表7のギャップマーは、アカゲザルハンチンチンゲノム配列（ヌクレオチド698000～866000で短縮されたGENBANKアクセッションNo. NW_001109716.1の相補物；SEQ ID NO: 4）と相補的である。‘アカゲザル標的開始部位’は、アカゲザル遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘アカゲザル標的停止部位’は、アカゲザル遺伝子配列中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒトmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6）中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、ヒトmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6）中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザル遺伝子配列との間でのミスマッチ数を示す。

20

【 0 2 2 3 】

【表 7】

表 7：ホスホロチオエート結合およびホスフェート結合の混合を有するアンチセンス
オリゴヌクレオチドの、アカゲザル遺伝子配列 (SEQ ID NO: 4) との相補性

30

ヒト 開始 部位	ヒト 停止 部位	ヒト 標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	アカゲザル 開始部位	アカゲザル 停止部位	ミスマッ チ数	SEQ ID NO.
4609	4628	1	444660	102256	102275	3	12
4610	4629	1	444661	102257	102276	2	13
4813	4832	1	444663	105030	105049	0	18
4862	4881	1	443139	105079	105098	1	22
5809	5828	1	444652	125339	125358	0	32

40

表8のギャップマーは、ラットハンチンチンmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_024357.2；SEQ ID NO: 5）と相補的である。‘ラット標的開始部位’は、ラットmRNA中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ラット標的停止部位’は、ラットmRNA中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的開始部位’は、ヒトmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6）中のギャップマーが標的とする最も5'側のヌクレオチドを示す。‘ヒト標的停止部位’は、ヒトmRNA（GENBANKアクセッションNo. NM_002111.6）中のギャップマーが標的とする最も3'側のヌクレオチドを示す。‘ミスマッチ数’は、ヒトオリゴヌクレオチドとラットmRNA配列との間でのミスマッチ数を示す。

50

【 0 2 2 4 】

【表 8】

表 8：ホスホロチオエート結合およびホスフェート結合の混合を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、ラット mRNA (SEQ ID NO: 5) との相補性

ヒト開始部位	ヒト停止部位	ヒト標的 SEQ ID NO.	ISIS No.	ラット 開始 部位	ラット 停止 部位	ミスマッ チ数	SEQ ID NO.
4607	4626	1	444658	4566	4585	0	10
4608	4627	1	444659	4567	4586	0	11
4609	4628	1	444660	4568	4587	0	12
4610	4629	1	444661	4569	4588	0	13
4813	4832	1	444663	4772	4791	0	18
5809	5828	1	444652	5765	5784	0	32

10

実施例2：in vitroでのヒトハンチンチンmRNAの用量依存的アンチセンス阻害

様々な長さ、モチーフ、そしてバックボーン組成の約1700種の新たに設計したアンチセンス化合物を、いくつかの細胞型におけるin vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について試験した。これらの化合物は、in vivoにおいてかなり強力な化合物であることが以前に決定された化合物ISIS 387916を含む、約250種の以前に設計した化合物と比較された。この実施例において示されるように、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 436689、ISIS 437507、ISIS 443139、ISIS 444591、ISIS 444661、ISIS 437527、ISIS 444584、およびISIS 444652、および以前に設計されたISIS 388241が、ベンチマーク化合物ISIS 387916と比較して、in vitroで同様またはよりより強力であることが見出された。

20

【 0 2 2 5 】

A. GM04281線維芽細胞

ウェル当たり25,000個の細胞の密度での培養されたGM04281線維芽細胞を、エレクトロポレーションを、500 nM、1000 nM、2000 nM、4000 nM、または8000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロベセットRTS2617（フォワード配列CTCCGTCCGGTAGACATGCT、本明細書中でSEQ ID NO: 37と示される；リバーズ配列GGAAATCAGAACCCCTCAAAATGG、本明細書中でSEQ ID NO: 38と示される；プローブ配列TGAGCACTGTTCAACTGTGGATATCGGGAX、本明細書中でSEQ ID NO: 39と示される）を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表9において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。

30

40

【 0 2 2 6 】

それぞれのオリゴヌクレオチドの50%最大阻害濃度（ IC_{50} ）もまた、表9において示され、そして使用したオリゴヌクレオチドの濃度をそれぞれの濃度で達成されたハンチンチンmRNA発現の%阻害に対してプロットすることにより算出し、そして対照と比較してハンチンチンmRNA発現の50%阻害が達成されるオリゴヌクレオチドの濃度を注記する。 IC_{50} は、 μM で表記される。

【 0 2 2 7 】

【表 9】

表 9：GM0428 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μ M)
387916	33	73	90	96	97	1.00
388241	44	70	82	95	97	0.61
419641	26	32	71	90	93	1.06
436665	56	67	87	95	96	0.32
436671	12	35	68	82	91	1.55
436689	10	34	61	80	91	1.89

ISIS 387916、ISIS 388241、および ISIS 437507 を、in vitro でのヒト ハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。培養された線維芽細胞を、上述した方法と同様の手順で試験した。結果は、表10において、非処置対照細胞と比較した ハンチンチン mRNA の % 阻害として示され、そして ハンチンチン mRNA レベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドの IC₅₀ もまた、表10中に μ M として示される。

【 0 2 2 8 】

【表 1 0】

表 10：GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μ M)
387916	56	84	94	98	99	0.34
388241	58	75	94	98	99	0.23
437507	61	74	85	93	93	0.22

ISIS 387916、ISIS 388241、および ISIS 437507 を、in vitro でのヒト ハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。培養された GM04281 線維芽細胞を、上述した方法と同様の手順で試験された。結果を、表11中に、非処置対照細胞と比較した ハンチンチン mRNA の % 阻害として示され、そして ハンチンチン mRNA レベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドの IC₅₀ もまた、表11中に μ M で示される。

【 0 2 2 9 】

【表 1 1】

表 11：GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μ M)
387916	40	61	85	94	97	0.70
388241	51	72	86	94	98	0.41
437507	30	55	71	79	82	1.07

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 419641、および ISIS 436754 を、in vitro でのヒト ハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。培養された GM04281 線維

芽細胞を、上述した方法と同様の手順で試験した。結果は、表12において、非処置対照細胞非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として示され、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀もまた、表12においてμMとして示される。

【 0 2 3 0 】

【表 1 2】

表 12 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μM)
387916	58	75	93	98	98	0.22
388241	40	68	85	95	98	0.73
419641	37	58	86	92	95	0.80
436754	44	62	63	84	93	0.59

ISIS 387916、ISIS 388241、およびISIS 437507を、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり25,000個の細胞の密度での培養されたGM04281線維芽細胞を、エレクトロポレーションを、250 nM、500 nM、1000 nM、2000 nM、4000 nMまたは8000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表13において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表13においてμMで示される。

【 0 2 3 1 】

【表 1 3】

表 13 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	250 nM	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μM)
387916	10	9	61	85	97	99	0.79
388241	0	18	42	90	98	99	1.08
437507	1	0	32	71	92	98	1.30

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 419628、ISIS 419629、ISIS 419637、ISIS 436684、ISIS 443139、ISIS 444584、ISIS 444615、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、ISIS 444659、ISIS 444660、およびISIS 444661は、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について、さらに試験した。ウェル当たり25,000細胞の密度での培養されたGM04281線維芽細胞をエレクトロポレーションを、156.25 nM、312.5 nM、625 nM、1250 nM、または2500 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを、定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商

標)により測定されるように、全RNA含量に従って調節した。結果は、表14中に、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として示され、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。示されるデータは、2回の実験の平均である。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀もまた、表14においてμMで示される。

【 0 2 3 2 】

【表 1 4】

表 14：GM04281 線維芽細胞におけるハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No	156.25 nM	312.5 nM	625 nM	1250 nM	2500 nM	IC ₅₀ (μM)
387916	19	22	44	62	85	0.73
388241	3	13	24	42	71	1.42
419628	56	45	59	71	83	0.20
419629	42	38	67	70	89	0.33
419637	24	17	32	61	77	0.91
436684	15	28	55	73	85	0.59
443139	13	45	50	64	81	0.61
444584	0	0	25	50	74	1.28
444615	36	35	37	38	70	0.12
444627	40	38	48	73	87	0.43
444652	15	28	55	73	85	0.59
444658	50	54	75	84	96	0.18
444659	47	61	69	79	93	0.18
444660	41	61	65	84	95	0.22
444661	47	59	72	84	96	0.19

ISIS 387916、ISIS 436671、ISIS 444661、ISIS 419641、およびISIS 436665を、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり25,000個の細胞の密度での培養されたGM04281線維芽細胞を、エレクトロポレーションを、13.6719 nM、27.3438 nM、54.6875 nM、109.375 nM、218.75 nM、437.5 nM、875 nM、1750 nM、3500 nM、または7000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN (登録商標)により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表15において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表15においてμMで示される。

【 0 2 3 3 】

【表 15 - 1】

表 15 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	13.6719 nM	27.3438 nM	54.6875 nM	109.375 nM	218.75 nM	437.5 nM	875 nM	1750 nM	3500 nM	7000 nM	IC ₅₀ (μM)
387916	0	31	14	43	44	68	86	89	97	97	0.31
436671	0	0	21	31	54	73	77	83	88	97	0.31
444661	0	10	25	53	66	73	87	96	99	99	0.16
419641	5	23	33	48	44	75	79	90	94	98	0.17
436665	26	37	47	44	65	83	89	94	98	98	0.07

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 437168、および ISIS 437175 を、in vitro でのヒトハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり 25,000 個の細胞の密度での培養された GM04281 線維芽細胞を、エレクトロポレーションを、エレクト

10

20

30

40

50

ロポレーションを250 nM、500 nM、1000 nM、2000 nM、4000 nM、および8000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表15.1において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表15.1においてμMで示される。

【 0 2 3 4 】

【表 1 5 - 2 】

10

表 15.1 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	8000.0 nM	IC ₅₀
387916	22	63	70	83	95	96	0.62
388241	17	45	65	87	96	97	0.56
437175	47	31	56	60	79	91	1.19
437168	32	46	64	81	89	95	0.59

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 437441、およびISIS 437442を、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに記載した。培養されたGM04281線維芽細胞を、上述した手法と同様の手法で試験した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表15.2 において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表15.2においてμMで示される。

【 0 2 3 5 】

【表 1 5 - 3 】

20

表 15.2 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	8000.0 nM	IC ₅₀
387916	26	47	58	79	91	95	0.65
388241	30	52	60	81	94	97	0.55
437441	25	37	56	69	86	47	0.81
437442	39	43	47	70	85	50	0.59

30

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 437175、およびISIS 437527を、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。培養されたGM04281線維芽細胞を、上述の手法と同様の手法で試験した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表15.3において示し、そしてハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表15.3においてμMで示される。

【 0 2 3 6 】

40

【表 15 - 4】

表 15.3 : GM04281 線維芽細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	250.0 nM	500.0 nM	1000.0 nM	2000.0 nM	4000.0 nM	8000.0 nM	IC ₅₀
387916	40	45	47	76	92	96	0.50
388241	40	37	50	90	96	97	0.80
437175	48	55	55	63	80	93	0.37
437527	33	52	61	80	86	95	0.52

10

B. A549細胞

実施例1において記載されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかを、in vitroで、ヒトハンチンチン mRNAに対するそれらの作用について試験した。ウェル当たり4,000個の細胞の密度での培養されたA549細胞を、リボフェクチントランスフェクション試薬を7.4074 nM、22.222 nM、66.667 nM、または200 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチン mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチン mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチン mRNAの%阻害として、表16において示し、そしてハンチンチン mRNAレベルアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表16においてnMで示される。

20

【 0 2 3 7 】

【表 16】

表 16 : A549 細胞におけるハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	7.4074 nM	22.222 nM	66.667 nM	200.00 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	12	37	76	92	33
419640	21	45	73	93	27
419641	34	60	83	96	15
419642	30	58	85	95	16

30

ISIS 387916、ISIS 388241、およびISIS 437507を、in vitroでのヒトハンチンチン mRNA Aに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり20,000個の細胞の密度で培養されたA549細胞を、エレクトロポレーションを250 nM、500 nM、1000 nM、2000 nM、4000 nMまたは8000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチン mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチン mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチン mRNAの%阻害として、表17において示し、そしてハンチンチン mRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表17においてμMで示される。

40

【 0 2 3 8 】

【表 17】

表 17：A549 細胞におけるハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	250 nM	500 nM	1000 nM	2000 nM	4000 nM	8000 nM	IC ₅₀ (μ M)
387916	15	17	25	36	52	75	3.09
388241	12	22	38	58	77	91	1.43
437507	25	28	38	57	58	76	1.84

C. LLC-MK2細胞

実施例1において記載されそしてヒトハンチンチン核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかを、in vitroでアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について試験した。ウェル当たり25,000細胞の密度での培養されたLLC-MK2細胞を、エレクトロポレーションを625 nM、1250 nM、2500 nM、5000 nM、10,000 nM、または20,000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロベセットRTS2686（フォワード配列GTCTGAGCCTCTCTCGGTCAA、本明細書中SEQ ID NO: 40と示される；リバーズ配列AAGGGATGCTGGGCTCTGT、本明細書中SEQ ID NO: 41と示される；プローブ配列AGCAAAGCTTGGTGTCTTGGCACTGTAGTX、本明細書中SEQ ID NO: 42と示される）を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、表18において示し、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表18において μ Mで示される。

【0239】

【表 18】

表 18：LLC-MK2 細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	625 nM	1250 nM	2500 nM	5000 nM	10000 nM	20000 nM	IC ₅₀ (μ M)
388241	21	12	35	46	46	94	4.1
444591	37	46	51	52	82	96	1.9
419641	32	52	69	87	94	97	1.2
444661	45	59	66	85	91	95	0.8
419642	6	3	56	81	91	98	2.9
436665	40	43	70	73	84	89	1.2
436671	31	51	68	82	90	97	1.2
436689	24	37	59	74	89	98	1.9
437507	21	15	11	33	55	92	6.4
443139	31	36	37	56	76	97	2.6

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 436684、ISIS 437168、ISIS 437175、ISIS 437441、ISIS 437507、ISIS 437527、ISIS 444578、ISIS 444584、ISIS 444591、およびISIS 444607を、in vitroでのアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。培養されたLLC-MK2細胞を、上述した方法と同様の手順で試験した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表19において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。そ

それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドの IC_{50} は、表19において μM として示される。

【 0 2 4 0 】

【表 1 9 】

表 19 : LLC-MK2 細胞における ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	625.0 nM	1250.0 nM	2500.0 nM	5000.0 nM	10000.0 nM	20000.0 nM	IC_{50}
387916	23	42	57	81	88	96	1.95
388241	6	12	37	43	62	84	5.32
437168	72	47	60	78	83	92	1.43
437175	27	48	36	56	68	78	3.58
437441	29	34	50	67	56	85	2.43
437507	18	29	18	33	45	66	6.12
437527	36	36	48	57	81	90	2.71
436684	0	12	24	29	36	49	n.d.
444578	34	40	65	74	82	87	1.70
444584	28	38	68	75	90	94	1.69
444591	25	45	55	74	85	94	1.84
444607	41	54	76	87	92	94	0.96

n.d.= IC_{50} がその化合物について測定できなかった。

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 444608、ISIS 444615、ISIS 444618、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、ISIS 444659、ISIS 444660、およびISIS 444661を、*in vitro*でのアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。培養されたLLC-MK2細胞を、上述した方法と同様の手順で試験した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表20において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドの IC_{50} は、表20において μM で示される。

【 0 2 4 1 】

【表 2 0 】

表 20 : LLC-MK2 細胞における、 ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No	625.0 nM	1250.0 nM	2500.0 nM	5000.0 nM	10000.0 nM	20000.0 nM	IC_{50}
387916	35	44	68	74	90	96	1.35
388241	23	37	54	56	68	89	2.64
444608	43	50	64	83	90	95	1.07
444615	29	45	55	76	90	97	1.67
444618	30	34	57	73	89	95	1.66
444627	35	56	76	90	97	98	1.00
444652	32	55	66	55	92	98	1.23
444658	50	62	80	90	95	97	0.55
444659	31	56	68	86	95	97	1.17
444660	38	49	62	86	89	96	1.26
444661	41	50	75	68	95	97	0.95

ISIS 387916、ISIS 419627、ISIS 419628、ISIS 419629、ISIS 419630、ISIS 419636、

10

20

30

40

50

ISIS 419637、ISIS 419640、ISIS 419641、およびISIS 419642を、in vitroでのアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり3,000細胞の密度での培養されたLLC-MK2細胞を、リポフェクチントランスフェクション試薬を6.25 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、または200 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用してトランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロブセットRTS2686を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表21において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表21においてnMで示される。

【 0 2 4 2 】

【表 2 1】

表 21：LLC-MK2 細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	6.25 nM	12.5 nM	25.0 nM	50.0 nM	100.0 nM	200.0 nM	IC ₅₀
387916	1	37	37	53	84	90	35
419627	0	9	18	45	58	72	75
419628	9	30	49	63	73	77	31
419629	9	16	40	56	80	85	36
419630	17	8	43	58	71	81	40
419636	23	25	38	55	72	78	37
419637	10	35	31	62	78	76	33
419640	3	28	39	59	74	87	36
419641	11	34	51	65	85	87	26
419642	25	30	49	65	85	88	24

ISIS 387916、ISIS 419641、およびISIS 436689を、in vitroアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり3,000細胞の密度での培養されたLLC-MK2細胞を、LipofectAMINE2000トランスフェクション試薬を6.25 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、または200 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロブセットRTS2686を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表22において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表22においてnMで示される。

【 0 2 4 3 】

【表 2 2】

表 22：LLC-MK2 細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No	6.25 nM	12.5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	0	50	31	68	83	90	47
419641	28	23	28	51	65	81	74
436689	16	30	29	48	67	83	69

10

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 436665、ISIS 436671、および ISIS 436689 を、in vitroでのアカゲザルハンチンチンmRNAに対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり3,000細胞の密度での培養されたLLC-MK2細胞を、リポフェクチントランスフェクション試薬を4.6875 nM、9.375 nM、18.75 nM、37.5 nM、75 nM、または150 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS2686を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表23において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表23においてnMで示される。

20

【 0 2 4 4】

【表 2 3】

表 23：LLC-MK2 細胞における、ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	4.6875 nM	9.375 nM	18.75 nM	37.5 nM	75.0 nM	150.0 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	7	6	38	59	82	91	32
388241	0	0	5	35	62	81	60
436665	7	0	36	59	64	69	37
436671	21	7	35	59	80	86	31
436689	38	45	45	59	76	86	15

30

D. BACHDトランスジェニックマウス肝細胞

実施例1において記載されそしてヒトハンチンチン核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかを、in vitroでのヒトハンチンチンmRNAに対するそれらの作用について試験した。ウェル当たり10,000細胞の密度での培養されたBACHDマウス肝細胞を、サイトフェクチントランスフェクション試薬を7.4074 nM、22.222 nM、66.667 nM、または200 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチンmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチンmRNAの%阻害として、表24において示し、ハンチンチンmRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。示されるデータは、2回の実験の平均である。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表24においてnMで示される。

40

50

【 0 2 4 5 】

【表 2 4 】

表 24 : BACHD トランスジェニックマウス肝細胞における、
ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	7.4074 nM	22.222 nM	66.667 nM	200.00 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	8	19	58	89	40
419640	15	30	64	93	33
419641	20	35	73	97	31
419642	3	29	70	96	43

10

ISIS 387916、ISIS 388241、および ISIS 419641 を、in vitroでのヒトハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり10,000細胞の密度での培養されたBACHDマウス肝細胞を、サイトフェクチントランスフェクション試薬を12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nMまたは200 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約16時間の処置期間の後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチン mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープロベ
 セット RTS2617 を使用して、mRNAレベルを測定した。ハンチンチン mRNAレベルを、RIBOGRE
 EN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に従って調整した。結果を、非処置
 対照細胞と比較したハンチンチン mRNAの%阻害として、表25において示し、ハンチンチン
 mRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞ
 れのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表25においてnMで示される。

20

【 0 2 4 6 】

【表 2 5 】

表 25 : BACHD トランスジェニックマウス肝細胞における、
ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

30

ISIS No.	12.5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	0	37	51	78	91	51
388241	0	10	45	70	92	68
419641	17	38	70	88	96	34

ISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 419641、ISIS 436665、ISIS 436671、および ISIS 43
 6689 を、in vitroでのヒトハンチンチン mRNAに対するそれらの作用についてさらに試験し
 た。培養されたBACHDマウス肝細胞を、上述した方法と同様に試験した。結果を、非処置
 対照細胞と比較したハンチンチン mRNAの%阻害として、表26において示し、ハンチンチン
 mRNAレベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞ
 れのアンチセンスオリゴヌクレオチドのIC₅₀は、表26においてnMで示される。

40

【 0 2 4 7 】

【表 26】

表 26 : BACHD トランスジェニックマウス肝細胞における、
ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	12.5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	19	48	64	86	93	32
388241	20	34	54	81	93	38
419641	38	54	70	85	95	21
436665	32	40	67	84	93	29
436671	32	42	58	78	91	32
436689	35	44	70	88	96	25

ISIS 387916、ISIS 419640、ISIS 419641、および ISIS 419642 を、in vitro でのマウスハンチンチン mRNA に対するそれらの作用についてさらに試験した。ウェル当たり 20,000 細胞の密度での培養された BACHD マウス肝細胞を、サイトフェクチントランスフェクション試薬を 6.667 nM、20 nM、60 nM、または 180 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドとともに使用して、トランスフェクトした。約 16 時間の処置期間の後、RNA を細胞から単離し、そしてハンチンチン mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR により測定した。マウスプライマープロベセット RTS2633 (フォワード配列 CAGAGCTGGTCAACCGTATCC、本明細書中 SEQ ID NO: 43 と示される; リバース配列 GGCTTAAACAGGGAGCCAAAA、本明細書中 SEQ ID NO: 44 と示される; プロベ配列 ACTTCATGATGAGCTCGGAGTTCAACX、本明細書中 SEQ ID NO: 45 と示される) を使用して、mRNA レベルを測定した。ハンチンチン mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) により測定されるように、全 RNA 含量に従って調整した。結果を、非処置対照細胞と比較したハンチンチン mRNA の % 阻害として、表 27 において示し、ハンチンチン mRNA レベルのアンチセンスオリゴヌクレオチド-媒介性用量依存性の減少を示す。それぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドの IC₅₀ は、表 27 において nM で示される。

【0248】

【表 27】

表 27 : BACHD トランスジェニックマウス肝細胞における、
ハンチンチン mRNA の用量依存性の減少

ISIS No.	6.667 nM	20 nM	60 nM	180 nM	IC ₅₀ (nM)
387916	15	15	68	94	37
419640	4	39	73	94	32
419641	16	45	81	96	24
419642	23	39	75	93	25

実施例 3 : BACHD マウスにおけるハンチンチン mRNA に対する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの全身性投与

約 1700 種の新たに設計したアンチセンス化合物の中から、全身性耐容性スクリーニングにおいて試験するための ISIS 387916 と比較した in vitro 強度に基づいて、66 種の化合物を選択した。

【0249】

BACHD マウスを、ISIS オリゴヌクレオチドにより処置し、そして様々な代謝マーカーの

レベルの変化について評価し、並びに肝臓におけるハンチンチンmRNAの阻害の変化について評価した。体重、器官重量において、または代謝マーカーレベルにおいて不都合な変化を生じたアンチセンスオリゴヌクレオチドが、さらなる研究において利用するために適切ではないものとみなした。

【 0 2 5 0 】

研究1

処置

各4匹の19群のBACHDマウスに、12.5 mg/kgのISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 419629、ISIS 419637、ISIS 436684、ISIS 444578、ISIS 444584、ISIS 444591、ISIS 444607、ISIS 444608、ISIS 444615、ISIS 444618、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、IS 10
IS 444659、ISIS 444660、ISIS 444661、またはISIS 444663を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のマウスの対照群に、PBSを、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。最終投与の2日後に、マウスをイソフルレンを用いて麻酔し、そして血漿回収のために放血し、その後頸椎脱臼を行い、器官を回収した。

【 0 2 5 1 】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析用に肝臓組織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンレベルを、マウスプライマープローブセットRTS2633 20
を使用して測定した。結果を、表28および表29に示し、そしてPBS対照と比較して、ヒトハンチンチン発現レベルおよびマウスハンチンチン発現レベルの%阻害としてそれぞれ算出した。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトハンチンチンmRNAレベルの顕著な阻害を引き起こす。ISIS 388241は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して3つ以上のミスマッチを有し、そして従って対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。

【 0 2 5 2 】

【表 2 8】

表 28 : BACHD マウスにおける、
ヒトハンチンチン mRNA の % 阻害

ISIS No.	% 阻害
387916	82
388241	52
419629	80
419637	83
436684	55
444578	70
444584	62
444591	54
444607	76
444608	61
444615	89
444618	91
444627	92
444652	79
444658	62
444659	74
444660	66
444661	72
444663	77

10

20

【 0 2 5 3 】

30

【表 29】

表 29 : BACHD マウスにおける
マウスハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No.	%阻害
387916	77
419629	75
419637	87
436684	32
444578	64
444584	20
444591	32
444607	76
444608	66
444615	60
444618	88
444627	58
444652	66
444658	53
444659	62
444660	47
444661	67
444663	60

10

20

器官重量測定

肝臓重量、脾臓重量および腎臓重量を、研究の最後に測定し、そして体重で正規化した生理食塩水対照の%として、表30において示す。

30

【 0 2 5 4 】

【表 3 0】

表 30：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の、
BACHD マウスの器官重量における％変化

ISIS No.	肝臓	脾臓	腎臓
387916	-5	-13	+6
388241	-1	+14	-5
419629	+5	+13	-12
419637	-6	-17	-25
436684	-2	-3	+6
444578	+11	+18	+1
444584	+8	+54	+1
444591	+4	-4	-3
444607	+3	+22	-8
444608	+6	+18	-3
444615	+6	+1	+3
444618	+11	+0	-2
444627	+3	-14	+14
444652	-11	-4	-18
444658	-1	0	-16
444659	+1	+15	-2
444660	-5	+4	-6
444661	-1	+7	-1
444663	+7	+10	+8

10

20

肝臓機能の評価

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの肝臓機能に対する効果を評価するため、トランスアミナーゼの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置（Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY）を使用して測定した。アラントランスアミナーゼ（ALT）およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）の測定値を、IU/Lで示し、そして結果を表31に示す。

30

【 0 2 5 5】

【表 3 1】

表 31：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
肝臓機能マーカーに対する作用

	ALT	AST
PBS	40	69
387916	69	84
388241	42	76
419629	51	71
419637	59	86
436684	60	87
444578	62	93
444584	48	76
444591	39	53
444607	51	111
444608	48	75
444615	74	95
444618	687	908
444627	105	127
444652	54	64
444658	46	59
444659	90	138
444660	34	64
444661	49	99
444663	90	164

研究2

処置

各4匹の14群のBACHDマウスに、12.5 mg/kgまたは50 mg/kgのISIS 419581、ISIS 419602、ISIS 419628、ISIS 419629、ISIS 419640、ISIS 419641、またはISIS 419642を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のBACHDマウスのグループには、12.5 mg/kgのISIS 387916を1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のマウスの対照群には、PBSを、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。最終投与ののち2日後に、マウスを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして血漿回収のために放血し、その後頸椎脱臼を行い、器官を回収した。

【 0 2 5 6 】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析用に肝臓組織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を使用して測定した。結果を、表32および表33に示し、そしてPBS対照と比較して、ヒトハンチンチン発現レベルおよびマウスハンチンチン発現レベルの%阻害としてそれぞれ算出した。

【 0 2 5 7 】

【表 3 2】

表 32 : BACHD マウスにおける
ヒトハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	%阻害
387916	12.5	71
419581	12.5	54
	50	68
419602	12.5	72
	50	77
419628	12.5	65
	50	76
419629	12.5	87
	50	93
419640	12.5	69
	50	79
419641	12.5	61
	50	80
419642	12.5	76
	50	83

【 0 2 5 8 】

【表 3 3】

表 33 : BACHD マウスにおける、
マウスハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	%阻害
387916	12.5	70
419581	12.5	42
	50	86
419602	12.5	77
	50	85
419628	12.5	67
	50	86
419629	12.5	90
	50	93
419640	12.5	63
	50	84
419641	12.5	52
	50	81
419642	12.5	56
	50	83

肝臓重量、脾臓重量および腎臓重量を、研究の最後に測定し、そして体重で正規化した生理食塩水対照の%として、表34において示す。

【 0 2 5 9 】

【表 3 4 】

表 34 : アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの器官重量の%変化

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	肝臓	脾臓	腎臓
387916	12.5	-9	3	-4
419581	12.5	-2	-6	-1
	50	14	-1	-11
419602	12.5	10	1	-2
	50	28	9	-3
419628	12.5	-2	-7	-2
	50	-3	7	-9
419629	12.5	-7	-5	-10
	50	16	0	-8
419640	12.5	-5	-2	-8
	50	1	-20	-4
419641	12.5	-7	-10	-11
	50	-2	-13	-9
419642	12.5	-11	-21	-19
	50	-1	-8	-9

10

20

肝臓機能の評価

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの肝臓機能に対する効果を評価するため、トランスアミナーゼの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) を使用して測定した。ALTおよびASTの測定値を、IU/Lで示し、そして結果を表35に示す。

【 0 2 6 0 】

30

【表 3 5】

表 35：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
肝臓機能マーカーに対する作用

	投与量 (mg/kg)	ALT	AST
PBS		44	80
387916	12.5	44	75
419581	12.5	56	101
	50	390	281
419602	12.5	86	108
	50	240	229
419628	12.5	52	110
	50	51	73
419629	12.5	104	118
	50	1262	1150
419640	12.5	36	65
	50	38	55
419641	12.5	56	103
	50	57	172
419642	12.5	40	64
	50	47	101

研究3

処置

各4匹の18群のBACHDマウスに、12.5 mg/kgまたは50 mg/kgのISIS 388250、ISIS 388251、ISIS 388263、ISIS 388264、ISIS 419641、ISIS 436645、ISIS 436649、ISIS 436668、またはISIS 436689を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のBACHDマウスのグループには、12.5 mg/kgのISIS 388241を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のマウスの対照群には、PBSを、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。最終投与ののち2日後に、マウスを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして血漿回収のために放血し、その後頸椎脱臼を行い、器官を回収した。

【0261】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析用に肝臓組織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロブセットRTS2617を用いて測定した。マウス正常ハンチンチンレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を用いて測定した。結果を、表36および表37に示し、そしてPBS対照と比較して、ヒトハンチンチン発現レベルおよびマウスハンチンチン発現レベルの%阻害としてそれぞれ算出した。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトハンチンチンmRNAレベルの顕著な阻害を引き起こす。ISIS 388241、ISIS 388250、ISIS 388251、ISIS 388263、ISIS 388264、およびISIS 436645は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3)と比較して3つ以上のミスマッチを有し、そして従って対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。ISIS 436649およびISIS 436689は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3)と比較して3つ以上のミスマッチを有し、そして従って対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。

【0262】

【表 3 6】

表 36 : BACHD マウスにおける、
ヒトハンチンチン mRNA の % 阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	% 阻害
388241	12.5	32
388250	12.5	21
	50	45
388251	12.5	30
	50	34
388263	12.5	29
	50	35
388264	12.5	35
	50	42
419641	12.5	71
	50	73
436645	12.5	43
	50	48
436649	12.5	40
	50	38
436668	12.5	45
	50	69
436689	12.5	62
	50	78

10

20

【 0 2 6 3】

【表 3 7】

表 37 : BACHD マウスにおける
マウスハンチンチン mRNA の % 阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	% 阻害
419641	12.5	68
	50	77
436668	12.5	41
	50	62

30

40

器官重量測定

肝臓重量、脾臓重量および腎臓重量を、研究の最後に測定し、そして体重で正規化した生理食塩水対照の % として、表38において示す。ISIS 388263およびISIS 436645で処理したマウスは、PBS対照と比較して、50 mg/kg投与に際して、肝臓重量の増加を生じた。

【 0 2 6 4】

【表 3 8】

表 38 : アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの器官重量の%変化

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	肝臓	脾臓	腎臓
388241	12.5	1	6	9
388250	12.5	2	1	-2
	50	1	30	3
388251	12.5	4	-8	1
	50	19	19	2
388263	12.5	4	8	9
	50	23	52	1
388264	12.5	2	-2	3
	50	12	9	6
419641	12.5	-1	-9	3
	50	2	-4	3
436645	12.5	8	6	5
	50	26	25	9
436649	12.5	1	0	6
	50	0	1	3
436668	12.5	1	5	10
	50	-2	3	11
436689	12.5	-3	-5	4
	50	6	11	5

肝臓機能の評価

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの肝臓機能に対する効果を評価するため、トランスアミナーゼの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) を使用して測定した。アラニントランスアミナーゼ (ALT) およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の測定値を、IU/Lで示し。そして結果を表39に示す。

【 0 2 6 5 】

【表 39】

表 39：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
肝臓機能マーカーに対する作用

	投与量 (mg/kg)	ALT	AST
PBS		43	76
388241	12.5	43	88
388250	12.5	37	55
	50	44	89
388251	12.5	42	98
	50	67	91
388263	12.5	51	90
	50	55	93
388264	12.5	31	59
	50	65	90
419641	12.5	39	70
	50	42	83
436645	12.5	43	82
	50	179	143
436649	12.5	35	47
	50	38	76
436668	12.5	36	73
	50	28	57
436689	12.5	31	52
	50	49	164

研究4

処置

各4匹の18群のBACHDマウスに、腹腔内に12.5 mg/kgまたは50 mg/kgのISIS 388241、ISIS 437123、ISIS 437132、ISIS 437140、ISIS 437442、ISIS 437446、ISIS 437477、ISIS 437478、またはISIS 437490 1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のBACHDマウスのグループには、12.5 mg/kgのISIS 387916を1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のマウスの対照群には、PBSを、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。最終投与ののち2日後に、マウスを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして血漿回収のために放血し、その後頸椎脱臼を行い、器官を回収した。

【0266】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析用に肝臓組織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンレベルを、マウスプライマープローブセットRTS2633を使用して測定した。結果を、表40および表41に示し、そしてPBS対照と比較して、ヒトハンチンチン発現レベルおよびマウスハンチンチン発現レベルの%阻害としてそれぞれ算出した。ISIS 388241およびISIS 437490は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3)と比較して3つよりも多いミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。ISIS 437132は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ

ID NO: 3)と比較して3つのミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。ISIS 437123およびISIS 437140は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3)と比較して2つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。

【 0 2 6 7 】

【表 4 0】

表 40 : BACHD マウスにおける
ヒトハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	%阻害
387916	12.5	51
388241	12.5	47
	50	67
437123	12.5	0
	50	21
437132	12.5	31
	50	33
437140	12.5	7
	50	32
437442	12.5	42
	50	85
437446	12.5	39
	50	70
437477	12.5	52
	50	75
437478	12.5	54
	50	78
437490	12.5	42
	50	44

【 0 2 6 8 】

10

20

30

【表 4 1】

表 41 : BACHD マウスにおける、
マウスハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	% 阻害
387916	12.5	48
437442	12.5	27
	50	76
437446	12.5	38
	50	71
437477	12.5	63
	50	87
437478	12.5	60
	50	89

器官重量測定

肝臓重量、脾臓重量および腎臓重量を、研究の最後に測定し、そして体重は、体重で正規化した生理食塩水対照の%として、表42中に示される。

【 0 2 6 9 】

【表 4 2】

表 42 : アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの器官重量の%変化

ISIS No.	投与量 (mg/kg)	肝臓	脾臓	腎臓
387916	12.5	1	6	12
388241	12.5	-3	16	-2
	50	-6	10	0
437123	12.5	-4	0	4
	50	4	0	-4
437132	12.5	-2	-3	-5
	50	2	-6	-2
437140	12.5	-4	11	-3
	50	4	5	-5
437442	12.5	-10	9	3
	50	-3	-20	-10
437446	12.5	-6	7	2
	50	-4	1	-1
437477	12.5	1	-2	0
	50	25	-9	-6
437478	12.5	-7	-4	-9
	50	22	4	3
437490	12.5	-5	0	-5
	50	-7	3	-9

肝臓機能の評価

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの肝臓機能に対する影響を評価するため、トランスアミナーゼの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Me

10

20

30

40

50

Iville, NY) を使用して測定した。アラニントランスアミナーゼ (ALT) およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) の測定値は、IU/Lで表し、そして結果を表43に示す。

【 0 2 7 0 】

【表 4 3】

表 43：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
肝臓機能マーカーに対する作用

	投与量 (mg/kg)	ALT	AST
PBS		32	58
387916	12.5	40	122
388241	12.5	39	93
	50	28	62
437123	12.5	38	88
	50	34	66
437132	12.5	34	52
	50	30	52
437140	12.5	30	62
	50	40	63
437442	12.5	40	106
	50	63	119
437446	12.5	35	119
	50	35	89
437477	12.5	39	68
	50	52	162
437478	12.5	37	53
	50	55	71
437490	12.5	48	71
	50	34	59

研究5

処置

各4匹の11群のBACHDマウスに、12.5 mg/kgのISIS 388241、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 436689、ISIS 437507、ISIS 443139、ISIS 444591、またはISIS 444661を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内に注射した。4匹のマウスの対照群に、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) を、1週間に2回、2週間にわたり、腹腔内を注射した。最終投与ののち2日後に、マウスを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして血漿回収のために放血し、その後頸椎脱臼を行い、器官を回収した。

【 0 2 7 1 】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析用に肝臓組織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンレベルを、マウスプライマープローブセットRTS2633を使用して測定した。結果を、表44および表45に示し、そしてPBS対照と比較して、ヒトハンチンチン発現レベルおよびマウスハンチンチン発現レベルの%阻害としてそれぞれ算出した。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトハンチンチンmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。ISIS 388241、ISIS 437507、およびISIS 443139は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して3つよりも多いミスマッチを有し、そしてし

たがって対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。ISIS 436689は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して3つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。

【 0 2 7 2 】

【表 4 4 】

表 44 : BACHD マウスにおける、
ヒトハンチンチン mRNA の % 阻害

ISIS No.	% 阻害
388241	53
419640	34
419641	63
419642	55
436665	63
436671	66
436689	57
437507	54
443139	39
444591	48
444661	50

10

20

【 0 2 7 3 】

【表 4 5 】

表 45 : BACHD マウスにおける、
マウスハンチンチン mRNA の % 阻害

ISIS No.	% 阻害
419640	24
419641	51
419642	34
436665	49
436671	63
444591	41
444661	46

30

40

体重および器官重量の測定

マウスの体重を、研究の開示時点および1週間に2回、測定した。マウスの体重を表46に示し、そして研究の開始時に測定された体重に対する%変化として表す。結果は、これらのオリゴヌクレオチドによる処置は、研究を通じてマウスの体重において有害な変化を生じなかったことを示す。

【 0 2 7 4 】

【表 4 6】

表 46：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの体重における%変化

	day 4	day 7	day 10	day 12
PBS	-3	0	+2	+1
ISIS 388241	-2	-1	-1	+1
ISIS 419640	+1	0	+3	+4
ISIS 419641	+1	+1	+2	0
ISIS 419642	-3	-2	+1	-5
ISIS 436665	+1	+4	+5	+1
ISIS 436671	+1	+2	+5	+4
ISIS 436689	+1	+3	0	-1
ISIS 437507	-1	-2	+2	-2
ISIS 443139	-2	+6	+4	+1
ISIS 444591	-1	+1	+2	0
ISIS 444661	+1	+3	+2	0

肝臓重量、脾臓重量および腎臓重量を、研究の最後に測定し、そして体重は、体重で正規化した生理食塩水対照の%として表47に示される。

【 0 2 7 5 】

【表 4 7】

表 47：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの器官重量における%変化

ISIS No.	肝臓	脾臓	腎臓
388241	+2	+13	-7
419640	-2	+12	-12
419641	+4	+3	-13
419642	+5	+19	-8
436665	-3	+3	-13
436671	0	+1	-18
436689	-6	-10	-12
437507	-5	-5	-14
443139	-2	-9	-13
444591	-2	-10	-12
444661	0	-16	-12

肝臓機能の評価

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの肝臓機能に対する影響を評価するため、トランスアミナーゼの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) を使用して測定した。ALTおよびASTの測定値は IU/Lで表した。ビリルビンおよびアルブミンの血漿レベルもまた、同一の臨床的物質解析装置を使用して測定し、そしてg/dLで表した。結果を、表48に示す。

【 0 2 7 6 】

【表 48】

表 48：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
肝臓機能マーカーに対する作用

	ALT	AST	ビリルビン	アルブミン
PBS	42.5	86.5	0.2	3.1
ISIS 388241	39.3	54.5	0.3	3.0
ISIS 419640	36.8	85.8	0.2	2.9
ISIS 419641	50.0	71.8	0.2	3.0
ISIS 419642	42.8	77.0	0.1	3.0
ISIS 436665	51.5	123.0	0.2	3.0
ISIS 436671	52.0	71.0	0.1	3.0
ISIS 436689	38.3	75.3	0.2	3.1
ISIS 437507	37.0	77.5	0.1	3.0
ISIS 443139	41.3	124.8	0.2	3.0
ISIS 444591	46.5	61.3	0.2	3.0
ISIS 444661	67.5	109.8	0.2	3.1

腎臓機能の測定

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスの腎臓機能に対する影響を評価するため、血中尿素窒素（BUN）およびクレアチニンの血漿濃度を、自動化臨床化学解析装置（Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY）を使用して測定した。結果を、表49においてmg/dLで示す。

【 0 2 7 7 】

【表 49】

表 49：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
腎臓機能マーカーに対する作用

	BUN	クレアチニン
PBS	24.0	0.17
ISIS 388241	22.6	0.17
ISIS 419640	21.4	0.16
ISIS 419641	19.9	0.16
ISIS 419642	23.6	0.18
ISIS 436665	20.2	0.17
ISIS 436671	22.6	0.17
ISIS 436689	19.2	0.18
ISIS 437507	19.9	0.16
ISIS 443139	23.3	0.16
ISIS 444591	23.5	0.18
ISIS 444661	25.4	0.18

その他の代謝パラメータの測定

ISISオリゴヌクレオチドの上述したマウスにおけるその他の代謝機能に対する影響を評価するため、グルコース、コレステロールおよびトリグリセリドの血漿濃度を、自動化臨

床化学解析装置 (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) を使用して測定した。結果を、表50において示し、mg/dLで表し、そしてこれらのオリゴヌクレオチドによる処置が、対照群と処置群とのあいだで、これらの代謝マーカーのレベルの有害な変化を何も生じなかった。

【 0 2 7 8 】

【表 5 0】

表 50：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の
代謝マーカーに対する作用

	グルコース	コレステロール	トリグリセリド
PBS	198	142	225
ISIS 388241	197	133	185
ISIS 419640	198	132	189
ISIS 419641	188	140	219
ISIS 419642	184	128	192
ISIS 436665	199	134	152
ISIS 436671	196	148	174
ISIS 436689	194	132	174
ISIS 437507	198	139	155
ISIS 443139	178	122	239
ISIS 444591	202	145	263
ISIS 444661	180	140	247

実施例4：ハンチンチンmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの、BACHDマウスの大脳基底核線条体に対するポース投与

BACHDマウスを、規定のマウス脳領域、大脳基底核線条体、に対して、ヒトハンチンチンmRNA発現およびマウスハンチンチンmRNA発現に対する脳組織におけるオリゴヌクレオチド活性をスクリーニングすることを目的として、ポース投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処理した。

【 0 2 7 9 】

処置および手術

各4匹のBACHDマウスのグループに、大脳基底核線条体中に3 μ g、10 μ gまたは25 μ g濃度を1回ポース注射として送達されるISIS 388241、ISIS 419628、ISIS 419637、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 436684、ISIS 436689、ISIS 436754、ISIS 437168、ISIS 437175、ISIS 437441、ISIS 437442、ISIS 437507、ISIS 437527、ISIS 443139、ISIS 444578、ISIS 444584、ISIS 444591、ISIS 444607、ISIS 444608、ISIS 444615、ISIS 444618、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、ISIS 444659、ISIS 444660、ISIS 444661またはISIS 444663を投与した。

【 0 2 8 0 】

4匹のBACHDマウスの対照群を、PBSにより同様に処置した。ISIS 388241を、各4匹の7グループのマウスにおいて投与し、そして示される結果は、データの平均である。ISIS 419628を、各4匹の2グループのBACHDマウスに投与し、そして示された結果は、8匹のマウスに由来するデータの平均である。ポース投与の7日後、マウスを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして器官を取り出した。動物を頸椎脱臼させ、そして組織の切片のための脳を取り出した。

【 0 2 8 1 】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のために、大脳基底核線条体組

織から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロブセット RTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を使用して測定した。ヒトハンチンチンmRNAレベルに関する結果を、表51中にて提示し、そして、PBS対照群と比較して%阻害を表示する。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトハンチンチンmRNAレベルの用量依存的な阻害を生じる。マウスハンチンチンmRNAレベルについての結果を、表52に示し、そしてPBS対照群と比較した%阻害として表す。

【 0 2 8 2 】

各オリゴヌクレオチドのヒトハンチンチンmRNAおよびマウスハンチンチンmRNAに対する有効用量 (ED_{50}) は、使用されるオリゴヌクレオチド濃度対いずれかの種のハンチンチンmRNA発現レベルの%阻害とをプロットングすることにより、そして対応する対照と比較して、ハンチンチンmRNA発現の50%阻害がそれぞれの種に関して達成された濃度に注目することにより、算出した。各アンチセンスオリゴヌクレオチドについての ED_{50} (μg) もまた、ヒトハンチンチンmRNAおよびマウスハンチンチンmRNAに関してそれぞれ表51および表52に示す。

【 0 2 8 3 】

ISIS 388241、ISIS 436684、ISIS 436754、ISIS 437175、ISIS 437507、ISIS 443139、およびISIS 444584はそれぞれ、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して8塩基対またはそれ以上のミスマッチを有し、そしてしたがって対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 437168およびISIS 437441は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3と比較して) 2つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 436689は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して3つのミスマッチを有し、そして、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。

【 0 2 8 4 】

10

20

【表 5 1】

表 51 : in vivo でのヒトハンチンチン mRNA レベルの%阻害と、
アンチセンスオリゴヌクレオチドの ED₅₀

ISIS No.	3 mg	10 mg	25 mg	ED ₅₀
388241	33	55	68	7.4
419628	49	58	83	5.1
419637	40	62	79	6.1
419640	52	64	77	4.8
419641	71	77	89	2.2
419642	67	70	83	3.0
436665	52	71	60	5.8
436671	68	80	84	2.4
436684	2	18	37	36.9
436689	27	63	81	7.0
436754	31	54	61	10.5
437168	2	49	60	15.2
437175	0	53	64	12.9
437441	3	32	38	35.3
437442	38	50	56	11.9
437507	38	59	79	6.6
437527	37	47	59	11.9
443139	39	61	70	6.7
444578	51	66	75	4.6
444584	30	63	71	7.8
444591	60	54	70	5.6
444607	57	69	75	3.2
444608	67	68	82	3.1
444615	47	55	91	5.2
444618	57	64	83	4.0
444627	47	70	61	5.0
444652	36	62	66	7.8
444658	60	66	79	3.6
444659	61	67	84	3.4
444660	55	62	66	4.2
444661	48	57	70	6.4
444663	42	60	80	5.5

【 0 2 8 5 】

【表 5 2】

表 52 : in vivo でのマウス ハンチンチン mRNA レベルの % 阻害と、
アンチセンスオリゴヌクレオチドの ED₅₀

ISIS No.	3 mg	10 mg	25 mg	ED ₅₀
419628	50	55	83	5.1
419637	63	79	86	2.6
419640	51	60	86	4.9
419641	65	80	87	2.7
419642	69	73	88	2.5
436665	68	82	66	2.7
436671	75	87	90	2
437442	30	53	82	9
437527	67	73	90	2.7
444578	50	65	74	4.9
444591	69	69	81	2.8
444607	57	70	75	3.8
444608	70	72	90	2.5
444615	30	37	88	9.5
444618	66	71	90	2.8
444627	41	60	57	8.8
444652	47	62	66	4.7
444658	60	62	85	3.9
444659	54	62	85	4.2
444660	42	48	64	9.5
444661	49	57	74	5.9
444663	42	65	84	5.1

アスタリスクをつけた10種の化合物は、ISIS 388241と比較して改善されたED₅₀を有した。

【 0 2 8 6 】

実施例5：ラットの大脳基底核線条体組織における、アンチセンスオリゴヌクレオチドのポラス投与の神経毒性作用についてのアッセイ

約30種の化合物を、高耐容性および高強度を有するものとして選択した。ついで、化合物を、ついで、ラットにおいてCNSポラス注射により試験し、さらに神経毒性について評価した。

【 0 2 8 7 】

Sprague-Dawleyラットのそれぞれを、CNS毒性の測定としてミクログリアマーカーAIF1の誘導についてスクリーニングすることを目的として、規定の脳領域、大脳基底核線条体、へのポラス投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【 0 2 8 8 】

処置および手術

4匹のSprague-Dawleyラットのグループに、大脳基底核線条体中に50 µg濃度を1回ポラス注射として送達されるISIS 387916、ISIS 388241、ISIS 419627、ISIS 419628、ISIS 419629、ISIS 419630、ISIS 419636、ISIS 419637、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 4

10

20

30

40

50

19642、ISIS 436665、ISIS 436668、ISIS 4196671、ISIS 436684、ISIS 436689、ISIS 436754、ISIS 443168、ISIS 437175、ISIS 437441、ISIS 437442、ISIS 437507、ISIS 437527、ISIS 443139、ISIS 444578、ISIS 444584、ISIS 444591、ISIS 444607、ISIS 444608、ISIS 444615、ISIS 444618、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444658、ISIS 444659、ISIS 444660、ISIS 444661、またはISIS 444663を、投与した。

【 0 2 8 9 】

4匹のラットの対照群を、PBSにより同様に処理した。4匹のラットのグループを、陰性対照群としてTNF- α に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、ISIS 104838により同様に処置した。ISIS 387916は、4匹のラット、4グループのそれぞれにおいて投与し、そして示された結果は、16匹のラットから得られたデータの平均である。ISIS 419628は、4匹のラット、2グループのそれぞれにおいて投与し、そして示された結果は、8匹のラットから得られたデータの平均である。ISIS 419629、ISIS 444584およびISIS 444618は、全身性投与研究（実施例3）において毒性指標を有したものであるが、本研究においても試験した。ポラス投与の7日後に、ラットを、イソフルレンを用いて麻酔し、そして器官を取り出した。動物を頸椎脱臼させ、そして大脳基底核線条体組織の切片のための脳を取り出した。

【 0 2 9 0 】

AIF1発現レベルのRNA解析

RNAを、AIF1 mRNAレベルのリアルタイムPCR解析のために、大脳基底核線条体組織から抽出した。ラットAIF1レベルを、ラットプライマープローブセットrAif1_LTS00219（フォワード配列AGGAGAAAAACAAAGAACACCAGAA、本明細書中SEQ ID NO: 46と示される；リバーズ配列CAATTAGGGCAACTCAGAAATAGCT、本明細書中SEQ ID NO: 47と示される；プローブ配列CCAACTGGTCCCCCAGCCAAGAX、本明細書中SEQ ID NO: 48と示される）を使用して測定した。結果を、PBS対照のAIF1発現と比較して、AIF1発現の%として算出し、それを表53に示した。ISIS 419629、ISIS 444584、およびISIS 444618は、全身性投与研究（実施例3）における毒性指標を示したものであるが、本研究においても同様に毒性指標を有した（生理食塩水対照と比較して300%高い）。その後の研究により、ISIS 444584は、神経耐容性であり、そしてわずかな毒性指標を示すことが示された（実施例16および実施例17）。

【 0 2 9 1 】

【表 5 3】

表 53：神経毒性の評価基準としての、
in vivo での AIF1 mRNA レベルの％発現

ISIS No.	％ 発現
104838	111
387916	870
388241	236
419627	168
419628	497
419629	247
419630	227
419636	464
419637	275
419640	305
419641	206
419642	173
436665	217
436668	447
436671	239
436684	700
436689	149
436754	125
437168	130
437175	131
437441	158
437442	157
437507	133
437527	184
443139	143
444578	352
444584	317
444591	194
444607	362
444608	476
444615	645
444618	547
444627	377
444652	336
444658	364
444659	319
444660	411
444661	249
444663	448

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のために、大脳基底核線条体組織から抽出した。ラットハンチンチンmRNAレベルを、ラットプライマープロブセット rHtt_LTS00343 (フォワード配列CAGAGCTGGTGAACCGTATCC、本明細書中SEQ ID NO: 49と示される；リバース配列GGCTTAAGCAGGGAGCCAAAA、本明細書中SEQ ID NO: 50と示される；プロブ配列ACTTCATGATGAGCTCGGAGTTCAACX、本明細書中SEQ ID NO: 51と示される)を使用して、測定した。結果を、PBS対照のハンチンチン発現と比較して、ハンチンチン発現の減少%として算出し、それを表54に示した。ISIS 388241、ISIS 436684、ISIS 436754、ISIS 437175、ISIS 437507、およびISIS 443139はそれぞれ、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5)と比較して6塩基対またはそれ以上のミスマッチを有し、そしてしたがって対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 436665、ISIS 436668、ISIS 437442、ISIS 444615、およびISIS 444627はそれぞれ、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5)と比較して1つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 437168およびISIS 437441は、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5)と比較して2つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 436689およびISIS 444584は、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5)と比較して3つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。

【 0 2 9 2 】

【表 5 4】

表 54：ラットにおける

ラットハンチンチン mRNA レベルの%減少

ISIS No.	%減少
387916	70
419627	67
419628	57
419629	85
419630	11
419636	53
419637	84
436671	77
437527	86
444578	72
444591	35
444607	57
444608	68
444618	56
444652	75
444658	61
444659	55
444660	63
444661	52
444663	59

ACHDマウスにおける耐容性研究

選択された化合物を、以前に設計した化合物ISIS 388241と、BACHDマウスにおいてICV投与により比較した。

【0293】

選択された化合物 + ベンチマーク388241は、in vitroおよび全身性の強度および耐容性、並びにCNS強度および耐容性に基づいて、選択した。

BACHDマウスを、マウスにおけるICV投与の耐容性を評価することを目的として、規定のマウス脳領域、右側脳室、に対する脳室内 (ICV) 投与を介して、ISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【0294】

処置および手術

5匹のBACHDマウスのグループのそれぞれに、Alzet 2002ポンプを用いて12 μ L/日の速度で2週間にわたり150 μ g/日をICVに送達される、ISIS 388241、ISIS 437507、ISIS 443139、ISIS 419640、ISIS 419641、ISIS 419642、ISIS 444591、ISIS 436665、ISIS 436671、ISIS 444661、またはISIS 436689を投与した。4匹のBACHDマウスの対照群を、PBSにより同様に処置した。マウスに対して、以下のようにしてポンプを外科的に移植した：ポンプの移植のため、マウスを個別に3%イソフルレンを用いて麻酔した。2週間後、マウスを再び麻酔し、そしてポンプを外科的に取り除いた。ついで、動物をさらに2週間かけて回復させ、その後安楽死させた。

【0295】

マウスの体重を処置および回復期間のあいだ毎週測定した。4週間後、マウスをイソフルレンおよび頸椎脱臼を使用して安楽死させた。前頭部および後頭部から組織を得るために脳を取り出した。

【0296】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、前頭皮質の右半球およびカニニューレ部位小脳後葉部分から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を使用して測定した。結果を、対照と比較してヒトハンチンチンmRNA発現およびマウスハンチンチンmRNA発現の%阻害として算出し、表56および表57においてそれぞれ示す。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトハンチンチンmRNAレベルの顕著な阻害を生じる。ISIS 388241、ISIS 437507、およびISIS 443139はそれぞれ、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して8塩基対またはそれ以上のミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 444591は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して1つのミスマッチを有し、そして対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 436689は、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 3) と比較して3つのミスマッチを有し、そして、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。

【0297】

【表55】

表56：アンチセンスオリゴヌクレオチドのICV投与を介した、
BACHDマウスにおけるヒトハンチンチンmRNAレベルの%減少

【0298】

10

20

30

40

【表 5 6】

ISIS No.	マウス数	前頭皮質	後部皮質
388241	3	82	70
419640	1	60	46
419641	2	75	66
419642	3	29	42
436665	5	62	38
436671	3	69	77
436689	3	49	40
437507	3	77	66
443139	5	93	90
444591	5	79	78

10

【 0 2 9 9 】

【表 5 7】

表 57：アンチセンスオリゴヌクレオチドの ICV 投与を介した、
BACHD マウスにおけるマウス ハンチンチン mRNA レベルの % 減少

20

ISIS No.	マウス数	前頭皮質	後部皮質
419640	1	22	34
419641	2	40	26
419642	3	63	71
436665	5	72	56
436671	3	80	71

体重測定

マウスの体重を、研究の開始時およびその後は1週間に1回、測定した。マウスの体重を表58に示し、そして研究の開始時に測定した体重と比較した % 変化として表す。体重は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの ICV 投与に対するマウスの耐容性の測定値と考えられた。'n.d.'は、その時点で利用可能なデータが存在しなかったことを意味する。

30

【 0 3 0 0 】

【表 5 8】

表 58：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の間の
BACHD マウスの体重の%変化

	week 1	week 2	week 3	week 4
PBS	-1	+2	+6	+6
ISIS 388241	+3	+11	+15	+7
ISIS 437507	+21	+10	+13	-4
ISIS 443139	+10	+10	+16	+12
ISIS 419640	+21	+11	-10	+9
ISIS 419641	+24	+3	-5	-12
ISIS 419642	+45	+39	+12	+1
ISIS 444591	+18	+38	+27	+17
ISIS 436665	+34	+43	+23	+9
ISIS 436671	+19	+17	+11	0
ISIS 444661	+19	-10	-21	n.d.
ISIS 436689	+49	+40	+2	-17

マウスの生存

マウスの生存を、全研究期間にわたり評価した。以下の表59は、ISISオリゴヌクレオチドおよび対照により処置したマウスグループの生存パターンを示す。

【 0 3 0 1】

【表 5 9】

表 59：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置のあいだの生存数

	week 1	week 2	week 3	week 4
PBS	5	5	5	5
ISIS 388241	4	3	3	3
ISIS 437507	5	5	4	4
ISIS 443139	5	5	5	5
ISIS 419640	5	5	4	1
ISIS 419641	5	5	4	2
ISIS 419642	5	5	4	2
ISIS 444591	5	5	5	5
ISIS 436665	5	5	5	5
ISIS 436671	4	4	3	3
ISIS 444661	5	5	1	0
ISIS 436689	4	4	4	3

実施例7：C57/BL6マウスにおける、ハンチンチンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与

野生型C57/BL6マウスを、これらのマウスにおけるマウスハンチンチンに対するオリゴヌクレオチドの強度を評価することを目的として、ISISオリゴヌクレオチドを用いて、脳室内（ICV）投与を介して、規定のマウス脳領域、右側脳室、に対して処置した。

【 0 3 0 2】

処置および手術

各10匹のC57/BL6マウスのグループに対して、50 µg/日をAlzet 2002ポンプを用いて0.5 µL/日の速度で7日間または14日間ICVに送達される、ISIS 408737 (5' TCCTAGTGTACATTA CCGC 3' (SEQ ID NO: 52)、開始部位SEQ ID NO: 3の5263)を投与した。6匹のC57/BL6マウスの対照群を、PBSにより同様に処置した。マウスに対して、以下のようにしてポンプを外科的に移植した：簡単に述べると、Alzet浸透圧ポンプ (Model 2002) を、製造者の指示書に従って組み立てた。ポンプをアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する溶液で充填し、そして移植の24時間前に、37 °Cにて一晚、インキュベートした。動物を3%イソフルレンにより麻酔し、そして定位固定フレーム中に配置した。外科手術部位を消毒した後、頭蓋骨上で正中切開を行い、背部に皮下ポケットを作り、そこに事前に充填した浸透圧ポンプを移植した。小型のキリ穴を、右側脳室上に頭蓋骨を通して開けた。プラスチックカテーテルを介して浸透圧ポンプに対して接続したカニユーレを、脳室内に配置し、そしてLoctite接着剤を使用して適した位置に接着した。切開を縫合により閉じた。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSを7または14日間注入し、ポンプを取り出した後に、その後動物を、Institutional Animal Care and Use Committeeにより承認された人道的なプロトコルに従って安楽死させた。脳および脊髄の組織を回収し、液体窒素中で瞬間的に凍結した。凍結する前に、脳組織をマウス脳マトリクスを使用して5つの部分 (S1、S2、S3、S4、およびS5) に横方向に切断した。部分1~5は、約互いに2 mmずつ離れており、S1が最も前部であり、そしてS5が最も後部であった。

【0303】

RNA解析およびタンパク質解析

全RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、RNeasy Mini prep kit (Qiagen) を使用して、RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) によりマウス脳および脊髄から抽出した。Q-PCR反応を、ABI Prism 7700配列検出器 (Applied Biosystems) 上で行いそして解析した。マウスハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープローブセットABI # Mm01213820_m1 (Applied Biosystems) を使用して測定し、そしてペプチジルプロリルイソメラーゼA mRNAレベルに対して正規化した。タンパク質溶解物を、以前に記載されたように (Li S.H. and Li X.J., Methods in Molecular Biology (2008), 217:1940-6029)、マウス脳スラブから調製した。溶解物を3~8%のtris-酢酸ゲル上で泳動し、そしてiBlotドライプロットティングシステム (Invitrogen) を使用して転写した。プロットを、抗- チューブリン (Chemicon) およびマウスハンチンチンタンパク質に対して特異的に反応するモノクローナルMAB2166抗体 (Millipore) を用いてプローブ化した。イムノプロットを、Odyssey V3.0 softwareを使用して定量化した。

【0304】

結果をPBS対照と比較した%減少として表60に示し、そしてday 7およびday 14の両方で、アンチセンスオリゴヌクレオチドにより、ハンチンチンmRNAおよびタンパク質レベルの顕著な阻害を示した。

【0305】

【表60】

表 60 : C57/BL6 マウスにおける

マウスハンチンチンmRNA の%阻害

	day 7	day 14
mRNA	66	68
タンパク質	21	49

実施例8：カニクイザルにおける、ハンチンチンmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの脳室内投与

カニクイザルを、ハンチンチンmRNA発現に対する脳組織におけるオリゴヌクレオチドの活性をスクリーニングすることを目的として、ISISオリゴヌクレオチドを用いて、脳室内（ICV）投与を介して、規定の脳領域、側脳室、に対して処置した。

【0306】

処置および手術

各3頭のカニクイザルの2グループに対して、0.05 ml/時間の速度で4週間、個別の歩行可能なポンプ（Pegasus Vario）によりICV送達される、0.635 mg/ml（1.5 mg/日）または1.67 mg/ml（4 mg/日）のISIS 436689のいずれかを投与した。2頭のカニクイザルの対照群に対して、PBSにより同様に投与した。グループには、ISIS 436689を両側性に投与した。1頭の動物に対して、右脳室にISIS 436689を4 mg/日用量で片側性に投与した。

10

【0307】

動物を、注入を行う前に、手術から10日間回復させた。手術後の回復期間のあいだ、動物を、0.05 mL/hの流速で、脳室当たり1個の歩行可能な注入ポンプを使用して、PBSをICV注入しながら維持した。回復期間の最後に、それぞれのカニューレを霊長類用ジャケット（Lomir, PJ-02NB）中に配置した個別の歩行可能なポンプ（Pegasus Vario）に対して接続した。ポンプを、注入期間の完了まで、接続したままにした。4週間の投与後、動物を安楽死させ、そして脳、肝臓および腎臓を回収した。

【0308】

htt mRNAのRNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、前部尾状核、後部尾状核、側頭皮質、頭頂皮質、視床下部、中脳、海馬、および脊髄、並びに肝臓および腎臓から抽出した。ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープローブセットRTS2617を使用して測定し、そしてサルシクロフィリンAレベルに対して正規化した。結果を、PBS対照と比較して、ハンチンチンmRNA発現の%阻害として算出し、そして表61に示す。ISIS 436689は、CNSにおいてヒトハンチンチンmRNAレベルの顕著な阻害を生じる。

20

【0309】

【表61】

表 61：アンチセンスオリゴヌクレオチドのICV投与を介した、
カニクイザルにおけるハンチンチン mRNA レベルの%減少

30

組織	投与量 (mg/日)			
	1.5 (両側性)	4 (両側性)	4 (右片側性)	4 (左片側性)
前部尾状核	59	49	85	12
後部尾状核	52	81	63	0
側頭皮質	10	34	41	31
頭頂皮質	22	38	46	24
視床下部	59	71	35	100
中脳	32	38	2	0
海馬	18	18	28	10
頸髄	58	65	n.d.	n.d.
胸髄	50	67	n.d.	n.d.
腰髄	49	62	n.d.	n.d.
肝臓	0	13	n.d.	n.d.
腎臓	0	13	n.d.	n.d.

n.d.= データなし

40

実施例9:1回ボース投与を介したC57/BL6マウス的大脑基底核線条体におけるISIS 387898の半減期の測定

50

C57/BL6マウスに、大脳基底核線条体組織におけるハンチンチンmRNA発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの半減期および作用期間を測定することを目的として、大脳基底核線条体に対して1回ボースとして、ISIS 387898を投与した。

【0310】

処置

40匹のC57/BL6マウスを、実施例5において記載される方法と同様の方法において、50 μ gの1回ボースとして送達した、ISIS 387898 (5' CTCGACTAAAGCAGGATTTC 3' (SEQ ID NO: 53) ; 開始部位はSEQ ID NO: 1の4042および開始位置はSEQ ID NO: 3の4001) により処置した。8匹の対照C57/BL6マウスを、同様の手法でPBSにより処置した。各4匹のマウスのグループを、様々な時点で安楽死させ、そして大脳基底核線条体組織を実施例5に記載される方法と同様の方法で取り出した。

【0311】

RNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、抽出した。大脳基底核線条体組織から、マウス正常ハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープローブセットRTS2633を使用して測定した。結果を、表62に示し、そしてday 7でのPBS対照グループと比較して、%阻害としてあらわした。ISIS 387898の阻害作用は、少なくとも91日延長されることが観察された。

【0312】

【表62】

表 62 : 1 回ボース投与としての ISIS 387898 の、C57/BL6 線条体において
様々な時点でのマウスハンチンチン mRNA 発現に対する作用

処置	投与後日数	% 阻害
ISIS 387898	1	66
	7	74
	14	68
	21	77
	28	75
	50	63
	73	55
	91	48
PBS	50	5

脳におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の解析：

脳組織を細かく切断し、秤量し、ホモジナイズし、そしてフェノール/クロロホルム液-液抽出法を使用して抽出した。この次に、キャピラリーゲル電気泳動電気学的注射の前に、フェニル-結合カラム上の上清の固相抽出を行う。P/ACE MDQキャピラリー電気泳動装置 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) をゲル-充填キャピラリー電気泳動解析のために使用した。オリゴヌクレオチドピークを、260 nmのUV吸収により検出した。

【0313】

脳内での ISIS 387898の濃度 (μ g/g) を、PBS対照の%として、ヒトハンチンチンの発現に対してプロットした (表63および図1)。ハンチンチンmRNAの発現の50%阻害を達成

するISIS 387898の濃度 (EC_{50}) を、算出した。 EC_{50} を、 $0.45 \mu\text{g/g}$ であると決定した。脳組織におけるISIS 387898の時間依存的濃度および対応する% ハンチンチン mRNA発現をプロットし (表64および図2) そしてオリゴヌクレオチドの半減期を、21日と算出した。

【 0 3 1 4 】

【表 6 3】

表 63：脳組織中の ISIS 387898 濃度、および対照の%としての
htt mRNA 発現に対するその作用

濃度 ($\mu\text{g/g}$)	% mRNA 発現
0	105.0
25	28.8
50	28.2
75	27.9
100	27.8
125	27.8

10

【 0 3 1 5 】

【表 6 4】

表 64：脳組織中の ISIS 387898 の時間-依存的濃度、および対照の%としての
htt mRNA 発現に対するその作用

時間 (日)	濃度 ($\mu\text{g/g}$)	mRNA %発現
1	116	35
7	65.7	27
14	30	32
23	34.9	24
30	12.2	26
51	2.1	38
73	1.4	47
92	1.1	53

20

30

実施例10: ICV投与を介してBACHDマウスの側脳室におけるISIS 387898の半減期の測定
BACHDマウスに対して、脳組織におけるハンチンチン mRNA発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドに対する半減期および作用期間を測定することを目的として、ICVにより脳の側脳室に対してISIS 387898を投与した。

【 0 3 1 6 】

処置

28匹のBACHDマウスを、実施例9において記載されるのと同様の手法において、 $75 \mu\text{g/日}$ でICV投与により2週間にわたり送達した、ISIS 387898により処置した。28匹の対照BACHDマウスを、実施例9において記載されるのと同様の手法において、PBSにより処置した。処置グループおよび対照グループの両方から得たそれぞれ4匹のマウスのグループを、隔週の時点で安楽死させ、そして前頭皮質組織を、実施例9に記載される方法と同様の方法において抽出した。

40

【 0 3 1 7 】

RNA解析

RNAを、ハンチンチン mRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、カニューレ部位に対し

50

て前部および後部両方の右半球から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロブセットRTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を使用して測定した。ヒト変異型ハンチンチンmRNA発現レベルを、表65に示し、そしてPBS対照グループにおいて測定された%阻害の平均と比較した%阻害として表す。マウス正常ハンチンチンmRNA発現レベルを表66に示し、そしてPBS対照グループにおいて測定された%阻害の平均と比較した、%阻害として表す。ISIS 387898の阻害作用は、91日間にわたり延長されたことが観察された。

【 0 3 1 8 】

【表 6 5】

表 65 : ISIS 387898 を投与された ICV の、様々な時点での
ヒトハンチンチン mRNA 発現に対する作用

処置	投与後日数	前部	後部
ISIS 387898	14	74	65
	28	67	61
	42	70	61
	56	57	52
	70	57	43
	91	41	61
	127	28	16
PBS	14	0	0
	28	0	0
	42	1	0
	56	9	10
	70	13	10
	91	13	25
	127	11	0

【 0 3 1 9 】

【表 6 6】

表 66 : ISIS 387898 投与された ICV の、様々な時点での
マウス ハンチンチン mRNA 発現に対する作用

処置	投与後日数	前部	後部
ISIS 387898	14	85	81
	28	81	69
	42	86	79
	56	74	69
	70	73	58
	91	39	63
	127	39	0
PBS	14	0	0
	28	0	0
	42	0	0
	56	17	14
	70	5	24
	91	9	17
	127	32	0

脳内におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の解析:

脳組織を、実施例9に記載される方法と同様の方法で処理した。脳の前頭皮質における ISIS 387898 の濃度 ($\mu\text{g/g}$) を、ヒト ハンチンチン の阻害に対して PBS 対照の % としてプロットし (表 67 および 図 3)、そして EC_{50} を、 $26.4 \mu\text{g/g}$ と算出した。脳組織における時間-依存性の ISIS 387898 濃度もまた、プロットし (表 68 および 図 4)、そしてオリゴヌクレオチドのを 21 日と算出した。

【 0 3 2 0 】

【表 6 7】

表 67 : 脳組織内の ISIS 387898 の濃度、および対照の % として示される

htt mRNA 発現に対するその効果

濃度 ($\mu\text{g/g}$)	% mRNA 発現
0	105
10	90.7
100	19.3
200	14.3
300	13.2
400	12.7
500	12.5
600	12.4

【 0 3 2 1 】

【表 6 8】

表 68：脳組織内での ISIS 387898 の時間-依存的濃度および
対照の％で示される htt mRNA 発現に対するその効果

最終投与後日数	濃度 (mg/g)	% mRNA 発現
14	554.3	12
28	219.8	15
42	154	13
56	146.9	32
70	48.3	28
91	46.1	66
127	11.8	90

10

実施例11: ICV投与を介したBACHDマウスの側脳室における ISIS 388241およびISIS 443139の半減期の測定

BACHDマウスに、組織におけるハンチンチンmRNA発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの半減期および作用期間を測定することを目的として、脳の側脳室に対してICVにより、ISIS 388241またはISIS 443139を投与した。

【 0 3 2 2 】

20

処置

20匹のBACHDマウスを、実施例9に記載される方法と同様の方法において、50 µg/日で2週間にわたり、ICV投与により送達した、ISIS 38241により処置した。20匹のBACHDマウスを、実施例9に記載される方法と同様の方法において、50 µg/日で2週間にわたり、ICV投与により送達した、ISIS 443139により処置した。20匹の対照BACHDマウスを、実施例9に記載される方法と同様の方法において、PBSにより処置した。処置グループおよび対照グループの両方に由来する各4匹のマウスのグループを、1週間おきの間隔で安楽死させ、そして組織を、実施例9に記載される方法と同様の方法で抽出した。

【 0 3 2 3 】

RNA解析

30

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、前頭部および後頭部の両方からカニューレ部位まで、右半球から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープロベセットRTS2617を使用して測定した。結果を表69に示し、そしてPBS対照群において測定された平均と比較して、%阻害として表す。ISIS 388241およびISIS 443139両方の阻害活性は、少なくとも16週間にわたり延長されたことが観察された。

【 0 3 2 4 】

ISIS 388241、およびその混合バックボーン対応物、ISIS 443139、は両方共、マウスハンチンチンmRNA (SEQ ID NO: 5) とは3つ以上のミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。

40

【 0 3 2 5 】

【表 6 9】

表 69 : ICV 投与された ISIS 388241 および ISIS 443139 の、
様々な時点でのヒト ハンチンチン mRNA 発現に対する作用

処置	投与後週数	前部	後部
ISIS 388241	0	63	64
	4	79	56
	8	67	51
	12	76	68
	16	35	34
ISIS 443139	0	35	55
	4	20	62
	8	61	59
	12	67	53
	16	46	37
PBS	0	15	10
	4	0	2
	8	5	0
	12	32	4
	16	6	2

脳におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の解析：

脳組織を、実施例9に記載された方法と同様の方法で処理した。後頭部脳組織における ISIS 388241の時間-依存的濃度をプロットし（表70および図5）、そしてオリゴヌクレオチドの半減期を20日と算出した。後頭部脳組織における ISIS 443139の時間-依存的濃度をプロットし（表71および図6）、そしてオリゴヌクレオチドの半減期を20日と算出した。

【 0 3 2 6 】

【表 7 0】

表 70 : 脳組織における ISIS 384241 の濃度と、対照の%としての
htt mRNA 発現に対するその作用

最終投与後日数	濃度 (ug/g)	% mRNA 発現
0	170.3	36
28	65.2	43
56	13	49
84	8.2	32
112	6.9	66

【 0 3 2 7 】

【表 7 1】

表 71：脳組織における ISIS 443139 の濃度と、対照の％としての

htt mRNA 発現に対するその作用

最終投与後日数	濃度 (ug/g)	% mRNA 発現
0	71.3	45
28	47.4	38
56	11.3	41
84	11.1	46
112	5.6	63

10

実施例12：変異型ヒトハンチンチンのBACHDマウスの運動筋肉能力に対するアンチセンス阻害の作用

BACHDマウスを、ハンチンチンmRNA発現に対するオリゴヌクレオチドのその運動筋肉能力に対する作用をローターロッドアッセイを介して評価することを目的として、脳室内（ICV）投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【0328】

処置

加速性ローターロッドアッセイを、Ugo Basileローターロッド上で行った。動物を2 RPMのスピートのローターロッド上に配置し、ローターロッドを5分間かけて40 RPMまで加速した。落下するまでの期間を記録した。落下するまでの期間を、動物がローターロッドから落下するか、または動物その走るのをやめ、ローターロッドにぶら下がり、そしてその上で回転するかのいずれかで定義される。6ヶ月齢のBACHDマウスおよびそれらの非-トランスジェニック同腹子を、処置の前に1週間、ローターロッド上で走るように訓練した。これは、試行の間に20分間の休憩時間を含む、各5分間の3回連続の試行から構成された。15匹のBACHDマウスのグループを、12 µL/日の速度で2週間にわたりAlzet 2002ポンプでICV送達した、50 µg/日のISIS 388241で処置した。マウスに対して、実施例6の方法と同様の方法でポンプを外科的に移植した。14匹のBACHDマウスの対照群を、同様にPBSにより処置した。9匹の非-トランスジェニック同腹子の対照群を、同様にPBSにより処置した。

20

【0329】

ローターロッド運動性能アッセイ

処置期間の最後に、ポンプを取り出し、そして2週間後に、最初の処置後ローターロッドアッセイを行った。ローターロッド行動を、マウスが11ヶ月齢になるまで毎月解析した。各月に、1日あたり3回の試行を2日間行うため、動物をローターロッド上に配置した。結果を、図7ならびに、落下するまでの期間（秒）として表した表72に示す。6ヶ月齢でのベースライン値を処置の前にとり、そして所定の時点は、アッセイを行ったマウスの週齢である。データは、ISIS 388241によるBACHDマウスの処置は、非処置BACHDマウスにおいて観察された場合、落下するまでの期間が増加したことを示す。

30

【0330】

【表 7 2】

40

表 72：変異型ハンチンチン mRNA のアンチセンス阻害の

落下までの期間（秒）に対する作用

	6 箇月	7 箇月	8 箇月	9 箇月	10 箇月	11 箇月
ISIS 388241	97	108	154	148	144	159
PBS 対照	94	117	115	104	99	92
非-トランスジェニック対照	197	198	215	207	198	199

実施例13：変異型ヒトハンチンチンmRNAおよび野生型マウスハンチンチンmRNAのアンチ

50

センス障害のBACHDマウスの運動筋肉能力に対する作用

BACHDマウスを、ハンチンチンmRNA発現に対するオリゴヌクレオチドのその運動筋肉能力に対する作用をローターロッドアッセイを介して評価することを目的として、脳室内（ICV）投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【0331】

処置

加速性ローターロッドアッセイを、Ugo Basileローターロッド上で行った。動物を2 RPMのスピードのローターロッド上に配置し、ローターロッドを5分間かけて40 RPMまで加速した。落下するまでの期間を記録した。落下するまでの期間を、動物がローターロッドから落下するか、またはその走るのをやめ、ローターロッドにぶら下がり、そしてその上で回転するかのいずれかで定義される。2ヶ月齢のBACHDマウスおよびそれらの非-トランスジェニック同腹子を、処置の前に1週間、ローターロッド上で走るように訓練した。これは、試行の間に20分間の休憩時間を含む、各5分間の3回連続の試行から構成された。各17~21匹のBACHDマウスのグループを、0.5 µL/時間の速度で2週間にわたりAlzet 2002ポンプでICV送達された、50 µg/日のISIS 388241、75 µg/日のISIS 408737、または75 µg/日のISIS 387898で処置した。マウスに対して、実施例6で記載された方法と同様の方法で、ポンプを外科的に移植した。20匹のBACHDマウスの対照群を、同様の方法でPBSにより処置した。非-トランスジェニック対照マウスのグループはまた、ISISオリゴヌクレオチドまたはPBSにより、同一様式で投与される。

【0332】

ローターロッド運動性能アッセイ

処置期間の最後に、ポンプを取り出し、そして2週間後に、-処置ローターロッドアッセイを行った。ローターロッド行動を、マウスが10ヶ月齢になるまで毎月解析した。各月に、1日当たり3~5回の試行走を3日間行うため、動物をローターロッド上に配置した。結果を、落下前の期間を秒として表した表73に示す。2ヶ月齢でのベースライン値を処置の前にとり、そして所定の時点はアッセイを行ったマウスの週齢である。ISIS 387898（表においてヒト-マウスASOと表示される）は、マウスハンチンチンmRNAおよびヒトハンチンチンmRNAの両方ともに、交差反応性であり、そしてしたがって、マウスにおいてヒト変異型ハンチンチンmRNAおよび野生型マウスハンチンチンmRNAの両方共を阻害する。ISIS 388241（表においてヒトASOと表示される）は、ヒトハンチンチンmRNAを特異的に標的とし、そしてマウスハンチンチンmRNAとは8塩基対ミスマッチを有する。したがって、ISIS 388241は、ヒト変異型ハンチンチンmRNAのみを特異的に阻害するが、マウスにおける野生型マウスハンチンチンmRNAを特異的には阻害しなかった。ISIS 408737（表においてマウスASOと表示される）は、マウスハンチンチンmRNAを特異的に標的とし、そしてヒトハンチンチンmRNAと7塩基対のミスマッチを有する。したがって、ISIS 408737は、野生型マウスハンチンチンmRNAのみを特異的に阻害するが、マウスにおけるヒト変異型ハンチンチンmRNAは特異的には阻害しなかった。‘Tg’はBACHDマウスを示し、‘非-Tg’は非-トランスジェニック対照マウスを示す。

【0333】

研究の結果は、ISIS 388241（Tg-ヒトASO）によるヒト変異型ハンチンチンmRNAの阻害は、対照（Tg-PBS）と比較して、ローターロッドアッセイにおいてマウスの運動性能を顕著に向上させたことを示す。結果はまた、変異型ハンチンチンmRNAおよびマウスにおける野生型ハンチンチンmRNAの両方を標的とするISIS 387898（Tg-ヒト-マウスASO）によるマウスの処置は、マウスの運動筋肉能力に対する有害な作用を何ら引き起こさず、そして実際、対照（Tg-PBS）と比較して、ローターロッド運動性能を顕著に向上させたことを示す。ISIS 408737（Tg-マウスASO）により処置されたマウスは、このオリゴヌクレオチドが変異型ハンチンチンmRNAを標的としないため、PBS対照と比較した場合、予測された通り、ローターロッド運動性能の向上を示さなかった。非-トランスジェニック対照は、このアッセイにおいて陽性対照として使用された。

【0334】

【表 7 3】

表 73：ハンチンチン mRNA のアンチセンス阻害の落下までの期間（表）に対する作用

	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	5ヶ月	6ヶ月	7ヶ月	8ヶ月	9ヶ月	10ヶ月
Tg-ヒト ASO	146	167	190	192	190	188	181	191	191
Tg-マウス ASO	151	142	152	143	139	144	139	123	130
Tg-ヒト-マウス ASO	149	187	203	199	196	194	189	194	171
Tg-PBS	152	164	169	160	159	155	148	135	136
非-Tg-ヒト ASO	212	223	234	236	247	248	245	247	235
非-Tg-マウス ASO	201	212	215	213	231	243	244	250	247
非-Tg-ヒト-マウス ASO	220	240	239	224	243	244	246	229	235
非-Tg-PBS	193	220	228	227	228	216	220	208	208

実施例14：ハンチンチン mRNA のアンチセンス阻害の R6/2 マウスの脳の大きさに対する作用

R6/2 マウスを、ハンチンチン mRNA 発現に対するオリゴヌクレオチドの脳重量および脳容量に対する作用を評価することを目的として、脳室内（ICV）投与を介して ISIS オリゴヌクレオチドにより処置した。

【0335】

処置

R6/2 マウスを、ケージ当たり5匹までのグループで飼育した（混合遺伝子型、単一性別）。すべてのマウスを、滅菌されたウッドチップの寝床で底部を覆った靴箱型のケージ中で飼育し、動物に乾燥した寝床を提供するために、必要に応じて頻繁に交換した。この基本的な環境は、すべてのマウス用に、遊び用トンネル、寸断された小巢（nestlet）、およびプラスチックの骨を追加した；すなわち、マウストンネル（琥珀色、公認、透明、BioServ Product# K3323）、Petite Green Gumabone（BioServ Product # K3214）および小巢（Hockley et al., Ann Neurol. 2002; 51: 235-242）、を含有する環境的に向上されたケージである。食餌および水は、そのケージ中でマウスに対して自由に利用可能とした。

【0336】

10匹の6ヶ月齢 R6/2 マウスのグループに対して、0.12 μ l/時間の速度で4週間 Alzet 1004 ポンプで ICV 送達した、50 μ g/日の ISIS 388817 を投与した。2匹の非-トランスジェニック同腹子のグループには、同様にして送達し 50 μ g/日の ISIS 388817 を送達した。5匹の R6/2 マウスの対照群には同様の方法で送達された 50 μ g/日の ISIS 141923 を投与した。9匹の R6/2 マウスの対照群は、同様の方法において送達された PBS により、投与した。8匹の非-トランスジェニック同腹子のグループに、同様の方法で送達された PBS を投与した。4匹の非処置8週齢の発症前の R6/2 のグループもまた、研究に含まれた。

【0337】

脳重量測定

動物をイソフルレンで麻酔し、そしてその後経心臓氷-冷ソレノセンのリン酸緩衝液（SPB）の対照となり、そして SPB 中の 4% により固定化した。脳を取り出し、そして前脳に対してすぐ吻側（嗅球を除去する）および小脳（脊髄）に対してすぐ尾側を冠状切断して、トリミングした。残りの脳を、mg で秤量した。結果は、図8中および表74に提示され、そして ISIS 388817 による R6/2 マウス処理において PBS 対照と比較して、脳重量を増加させる。

【 0 3 3 8 】

【表 7 4】

表 74：脳重量 (mg)に対する、変異型ハンチンチン mRNA における
アンチセンス阻害の作用

マウスモデル	処置	脳重量
R6/2	PBS	367
	ISIS 141923	375
	ISIS 388817	394
R6/2 (8 週齢)	なし	402
非-トランスジェニック	ISIS 141923	452
	ISIS 388817	436

10

実施例15: ハンチンチンmRNAのアンチセンス阻害のYAC128マウスの不安動作に対する作用

YAC128マウスを、オープンフィールドアッセイおよび高架式十字迷路アッセイにおいてそれらの性能により測定するように、ハンチンチンmRNA発現に対するオリゴヌクレオチドのこれらのマウスにおける不安に対する作用を評価することを目的として、脳室内 (ICV) 投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【 0 3 3 9 】

20

処置

7匹の5ヶ月齢YAC128マウスのグループを、0.5 μ l/hrの速度で14日にわたり、Alzet 100 4ポンプでICV送達された50 μ g/日のISIS 388241で処置した。4匹のYAC128マウスの対照群を、同様にPBSにより処置した。8匹の非-トランスジェニックFVB/NJ同腹子の対照群を研究に含ませたが、何の処置も与えなかった。マウスに対して以下のようにしてポンプを外科的に移植した：簡単に述べると、Alzet浸透圧ポンプ (Model 2002) を、製造者の指示書に従って組み立てた。ポンプをアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する溶液で充填し、そして移植の24時間前に、37℃にて一晩、インキュベートした。動物を3%イソフルレンにより麻酔し、そして定位固定フレーム中に配置した。外科手術部位を消毒した後、頭蓋骨上で正中切開を行い、背部に皮下ポケットを作り、そこに事前に充填した浸透圧ポンプを移植した。小型のキリ穴を、右側脳室上に頭蓋骨を通して開けた。プラスチックカテーテルを介して浸透圧ポンプに対して接続したカニューレを、脳室内に配置し、そしてLoctite接着剤を使用して適した位置に接着した。切開を縫合により閉じた。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSを7または14日間注入し、その後、ポンプを取り出した。動物をさらに2週間かけて回復させ、その後行動解析を行い、そしてマウスを最終的にはInstitutional Animal Care and Use Committeeにより承認された人道的なプロトコルに従って安楽死させた。脳および脊髄の組織を回収し、液体窒素中で瞬間的に凍結した。凍結する前に、脳組織をマウス脳マトリクスを使用して5つの部分 (S1、S2、S3、S4、およびS5) に横方向に切断した。部分1～5は、約互いに2 mmずつ離れており、S1が最も前部であり、そしてS5が最も後部であった。

30

40

【 0 3 4 0 】

オープンフィールドアッセイ

マウスを、光ビーム中断を使用して30分間のテストセッションの間水平的移動および垂直的移動を測定する、オープンフィールドアリーナ (Med Associates) 中に配置した。データを活性モニターソフトウェアを使用して解析し、アリーナ中での全回廊移動、そして不安の測定値としてのアリーナの中央部での移動を測定した。YAC128対照マウスは、それらの非-トランスジェニックの、不安-傾向のより少ないFVB/NJ同腹子と比較して、アリーナ中央部で過ごす時間がより少ないものと予想された。結果を、図9および表75に示し、そしてYAC128マウスのアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置により、オープンフィールドアッセイのパラメータに従って、これらのマウスにおいて不安が低下したことが示さ

50

れる。

【 0 3 4 1 】

【表 7 5】

表 75：変異型 htt mRNA のアンチセンス阻害の、
YAC128 マウスのオープンフィールド動作に対する作用

マウスモデル	中央にいる時間 (秒)
FVB 対照	1326
YAC128 対照	964
ISIS 388241 処理 YAC128	1433

10

高架式十字迷路アッセイ

装置は、2つの開放されたアーム部および2つの閉じられたアーム部からなり、65×6.25 cmを測定し、そして底部から50 cm上を評価した。マウスを装置の中央部に配置し、そしてそれらの位置を5分間のテストセッションにわたり記録した。YAC128対照マウスは、それらの非-トランスジェニックの、不安-傾向のより少ないFVB/NJ同腹子と比較して、装置の開放されたアーム部にて過ごす時間がより短いことが予想された。結果を、図10および表76に示し、そしてそしてYAC128マウスのアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置により、高架式十字迷路アッセイのパラメータに従って、これらのマウスにおいて不安が低下したことが示される。

20

【 0 3 4 2 】

【表 7 6】

表 76：htt mRNA のアンチセンス阻害の YAC128 マウスの
高架式十字迷路動作に対する作用

マウスモデル	開放されたアーム部にいる時間%
FVB 対照	32
YAC128 対照	18
ISIS 388241 処置 YAC128	27

30

RNA解析およびタンパク質解析

全RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、RNeasy Mini prep kit (Qiagen) を使用して、RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) によりマウス脳および脊髄から抽出した。Q-PCR反応を、ABI Prism 7700配列検出器 (Applied Biosystems) 上で行いそして解析した。ヒトハンチンチンmRNAレベルを、ヒトプライマープローブセットRTS2686を使用して測定し、そしてペプチジルプロリルイソメラーゼA mRNAレベルに対して正規化した。

【 0 3 4 3 】

タンパク質溶解物を、以前に記載されたように (Li S.H. and Li X.J., Methods in Molecular Biology (2008), 217:1940-6029)、マウス脳スラブから調製した。溶解物を3~8%のtris-酢酸ゲル上で泳動し、そしてiBlotドライプロットティングシステム (Invitrogen) を使用して転写した。プロットを、抗- チュープリン (Chemicon) およびヒトハンチンチンタンパク質に対して特異的に反応するモノクローナルEM48抗体 (Millipore) を用いてプローブ化した。イムノプロットを、Odyssey V3.0 softwareを使用して定量化した。

40

【 0 3 4 4 】

結果をPBS対照と比較した%減少として表77に示し、そしてアンチセンスオリゴヌクレオチドにより、ハンチンチンmRNAおよびタンパク質レベルの顕著な阻害を示す。

【 0 3 4 5 】

【表 77】

表 77：YAC128 マウスにおける
ハンチンチン mRNA の%阻害

	%阻害
mRNA	85
タンパク質	86

実施例16:C57/BL6マウスにおけるハンチンチンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチ
ドの脳室内投与 10

C57/BL6マウスを、これらのマウスにおけるオリゴヌクレオチドの耐容性を評価すること
を目的として、右側脳室に対して脳室内（ICV）投与することを介してISISオリゴヌク
レオチドにより処置した。

【0346】

処置および手術

各5匹のC57/BL6マウスのグループに対して、0.5 μ L/日の速度で2週間にわたり、Alzet
2002ポンプでICV送達された150 μ g/日のISIS 387916、ISIS 437527、ISIS 444578、ISIS
444584、ISIS 444607、ISIS 444608、ISIS 444627、ISIS 444652、ISIS 444659、ISIS 44
4660、またはISIS 444661を投与した。6匹のC57/BL6マウスの対照群を、PBSにより同様に
処置した。ポンプを移植しおよびオリゴヌクレオチド投与するための手順は、実施例6に
記載される通りである。 20

【0347】

動物をさらに2週間かけて回復させ、その後イソフルレンを使用して安楽死させた。脳
および脊髄の組織を回収し、液体窒素中で瞬間的に凍結した。凍結する前に、脳組織をマ
ウス脳マトリクスを使用して5つの部分（S1、S2、S3、S4、およびS5）に横方向に切断し
た。部分1～5は、約互いに2 mmずつ離れており、S1が最も前部であり、そしてS5が最も後
部であった。

【0348】

RNA解析

全RNAを、脳のハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、RNeasy Mini pr
ep kit（Qiagen）を使用して、前頭皮質および後頭皮質から抽出した。RT-PCR反応を、AB
I Prism 7700配列検出器（Applied Biosystems）上で行った。マウスハンチンチンmRNAレ
ベルを、マウスプライマープローブセットRTS2633を使用して測定し、そしてシクロフィ
リンmRNAレベルに対して正規化した。結果をPBS対照と比較した%減少として表78に示し
た。ISIS 387916、ISIS 437527、ISIS 444627、およびISIS 444652はすべて、マウスハン
チンチンmRNA（SEQ ID NO: 3）とのあいだで1つのミスマッチを有し、そしてしたがって
、対照と比較して、マウスmRNAレベルの顕著な阻害を示さなかった。 30

【0349】

ミクログリアマーカーAIF1もまた、マウスプライマープローブセットmAIF1_LTS00328（
フォワード配列TGGTCCCCCAGCCAAGA、本明細書中にてSEQ ID NO: 54と示される；リバー
ス配列CCCACCGTGTGACATCCA、本明細書中にてSEQ ID NO: 55と示される；プローブ配列AGCTA
TCTCCGAGCTGCCCTGATTGG、本明細書中にてSEQ ID NO: 56と示される）を使用して、RT-PCR
解析により測定された。結果を表79に示し、そして試験されたISISオリゴヌクレオチドが
炎症性応答を誘導しなかったことを示す。 40

【0350】

【表 7 8】

表 78 : C57/BL6 マウスにおける対照と比較した
マウスハンチンチン mRNA の%阻害

ISIS No	前頭部	後頭部
387916	72	74
437527	59	62
444578	69	69
444584	0	9
444607	59	79
444608	41	66
444627	41	45
444652	61	64
444660	35	33
444661	72	69

10

【 0 3 5 1】

【表 7 9】

表 79 : C57/BL6 マウスにおける対照と比較した
AIF1 mRNA 発現の%増加

ISIS No	前頭部	後頭部
387916	159	67
437527	102	77
444578	22	7
444584	33	37
444607	34	58
444608	29	1
444627	46	22
444652	59	50
444660	-3	11
444661	67	62

20

30

体重測定

体重を、研究期間のあいだにわたり定期的な間隔で測定し、そして表80に示す。これらの体重は、耐容性の指標として使用された。ISIS 437527、ISIS 444584、およびISIS 444652により処置されたマウスは、研究期間のあいだにわたり一貫した体重を有し、そして本研究において含まれるISISオリゴヌクレオチドのすべての中で最も耐容性であるとみなされた。‘n/a’は、そのマウスグループについてはデータがないことを示す。

40

【 0 3 5 2】

【表 80】

表 80：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の C57/BL6 マウスの体重

	Day 0	Day 4	Day 8	Day 12	Day 16	Day 19	Day 23	Day 26	Day 28
PBS	105	108	111	114	111	111	113	114	112
ISIS 387916	107	108	106	111	106	104	101	101	97
ISIS 437527	105	116	116	120	111	112	112	108	108
ISIS 444578	105	116	112	115	103	98	83	81	87
ISIS 444584	105	117	115	111	105	105	103	104	102
ISIS 444607	105	115	112	110	101	98	106	109	106
ISIS 444608	102	111	112	112	97	91	78	75	87
ISIS 444627	105	116	124	126	105	104	93	94	91
ISIS 444652	106	122	124	126	119	113	111	111	108
ISIS 444659	105	118	123	116	92	89	68	n/a	n/a
ISIS 444660	104	115	120	118	103	93	89	84	90
ISIS 444661	107	125	120	106	76	86	89	86	91

実施例17: ラットの脳基底核線条体組織における、アンチセンスオリゴヌクレオチドのボース投与の神経毒性作用についてのアッセイ。

Sprague-Dawleyラットを、CNS毒性の測定としてミクログリアマーカーAIF1の誘導についてスクリーニングすることを目的として、脳基底核線条体へのボース投与を介してISISオリゴヌクレオチドにより処置した。

【0353】

処置および手術

4匹のSprague-Dawleyラットのグループに対して、1回ボースとして送達された25 µg、50 µg、75 µg、または100 µgの濃度のISIS 388241、ISIS 443139、ISIS 436671、ISIS 437527、ISIS 444584、ISIS 444591、またはISIS 444652を投与した。

【0354】

4匹のラットのグループを、1回ボースとして送達された10 µg、25 µg、50 µg、または75 µgの濃度のISIS 387916により、同様に処置した。4匹のラットの対照群を、PBSにより同様に処置した。ボース投与の7日後、ラットをイソフルレンを使用して安楽死させ、そして器官を取り出した。動物を頸椎脱臼させ、脳基底核線条体組織の詳細な調査のために脳を取り出した。精密に湾曲したピンセット一對を、海馬の直前の脳中にまっすぐ下に配置し、皮質に横断方向の切り込みを作り、そしてその下の組織を鈍性切開した。精密に湾曲させたピンセットもう一對の先端を、海馬と嗅球とのあいだの中程の正中洞に沿ってまっすぐ下に配置し、縦方向の切り込みを作り、脳梁を鈍性切開により切断した。その後、最初の一対のピンセットを使用して、生じた皮質の一隅を反転させて、脳基底核線条体および内包を暴露し、ついで内包を切断して脳基底核線条体から取り去った。2つめの一對のピンセットを湾曲した末端が脳基底核線条体のいずれかの側面に接触するように配置し、それを押し下げて組織を単離した。最初の一対のピンセットを使用して、脳基底核線条体の後部末端をつまみ、脳から脳基底核線条体を取り出した。

【0355】

AIF1発現レベルのRNA解析

RNAを、AIF1 mRNAレベルのリアルタイムPCR解析のために、大脳基底核線条体組織から抽出した。ラットAIF1レベルを、ラットプライマープロブセットrAif1_LTS00219を使用して測定した。結果を、PBS対照のAIF1発現と比較して、AIF1発現%として算出し、そして表81に示す。結果は、ISIS 388241、ISIS 443139、ISIS 436671、ISIS 444591、ISIS 437527、ISIS 444584、およびISIS 444652は、ラット脳において十分に耐容であったことを示す。

【 0 3 5 6 】

【表 8 1】

表 81：神経毒性の測定としての in vivo での

AIF1 mRNA レベルの%発現

ISIS No	投与量 (μg)	%増加
387916	10	145
	25	157
	50	247
	75	316
388241	25	29
	50	12
	75	30
	100	41
436671	25	37
	50	2
	75	13
	100	50
443139	25	0
	50	7
	75	167
	100	26
444591	25	18
	50	80
	75	50
	100	207
437527	25	98
	50	45
	75	23
	100	126
444584	25	-1
	50	10
	75	35
	100	31
444652	25	17
	50	46
	75	39
	100	48

10

20

30

40

50

ハンチンチン発現レベルのRNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、大脳基底核線条体組織から抽出した。ラットハンチンチンmRNAレベルを、ラットプライマープロープセットrHtt_LTS00343を使用して測定した。結果を、PBS対照のハンチンチン発現と比較したハンチンチン発現の減少%として算出し、そして表82に示す。ISIS 388241およびISIS 443139は、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5) とそれぞれ6塩基対またはそれ以上のミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。ISIS 444584は、ラット遺伝子配列 (SEQ ID NO: 5) と3つのミスマッチを有し、そしてしたがって、対照と比較して、ラットmRNAレベルの顕著な阻害を示さない。

【 0 3 5 7 】

【表 8 2】

表 82：ラットにおけるラットハンチンチン mRNA レベルの%減少

ISIS No	投与量 (μg)	%阻害
387916	10	6
	25	39
	50	55
	75	60
388241	25	8
	50	23
	75	27
	100	19
436671	25	52
	50	57
	75	57
	100	70
443139	25	35
	50	29
	75	28
	100	27
444591	25	26
	50	57
	75	68
	100	69
437527	25	40
	50	55
	75	60
	100	74
444584	25	43
	50	38
	75	38
	100	41
444652	25	49
	50	70
	75	55
	100	59

実施例18: カニクイザル初代肝細胞における、ハンチンチンmRNAの用量-依存性アンチセンス阻害

ISIS 437527、ISIS 444584、およびISIS 444652を、様々な濃度で、カニクイザル初代肝細胞において試験した。ベンチマークオリゴヌクレオチド、ISIS 387916およびISIS 388241もまた、比較のために含ませた。細胞を、ウェル当たり35,000細胞の密度でまき、そして39.0625 nM、78.125 nM、156.25 nM、312.5 nM、625 nM、1,250 nM、2,500 nM、5,000 nM、10,000 nM、および20,000 nMの濃度のそれぞれのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトした。約16時間後、RNAを細胞から単離し、そしてハンチンチンmRNA転写物レベルを、プライマープロブセットRTS2686を使用した定量的リアルタイムPCRにより測定した。ハンチンチンmRNA転写物レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定されるように、全RNA含量に対して正規化した。結果を、非処置対照細胞と比較して、ハンチンチンの%阻害として、表83において示す。対照オリゴヌクレオチド、ISIS 141923を、このアッセイに含ませ、そして予想されたように、ハンチンチンmRNAの阻害を示さなかった。

【0358】

ISIS 437527、ISIS 444584、およびISIS 444652は、ベンチマークオリゴヌクレオチド、ISIS 388241と比較して、より低いIC₅₀値を有した。ISIS 437527およびISIS 444652は、ベンチマークオリゴヌクレオチド、ISIS 387916と比較して、同じくらい低いIC₅₀値またはより低いIC₅₀値を有した。

【0359】

【表83】

表 83：カニクイザル初代肝細胞における、
ハンチンチン mRNA の用量依存的アンチセンス阻害

	ISIS 387916	ISIS 388241	ISIS 437527	ISIS 444584	ISIS 444652	ISIS 141923
39.0625 nM	0	6	0	0	0	0
78.125 nM	17	4	19	0	16	0
156.25 nM	6	0	27	11	12	3
312.5 nM	19	0	23	16	35	0
625.0 nM	31	0	37	30	50	0
1250.0 nM	45	0	28	23	52	0
2500.0 nM	62	4	33	47	74	0
5000.0 nM	78	54	55	42	86	0
10000.0 nM	82	80	68	77	91	0
20000.0 nM	84	75	70	69	92	0
IC ₅₀ (μM)	1.4	5.4	2.0	4.0	0.8	>20

実施例19：線条体内1回ボラス投与を介した、BACHDマウスにおけるISISオリゴヌクレオチドの半減期の測定

BACHDマウスに対して、大脳基底核線条体におけるハンチンチンmRNA発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用期間、またはその半減期を測定することを目的として、大脳基底核線条体に対する1回ボラスとして、ISISオリゴヌクレオチドを投与した。

【0360】

処置および手術

各25匹のBACHDマウスのグループを、実施例4に記載された手順と同様の手順で、40 μgの

1回ボーラスとして送達される、ISIS 388241、ISIS 436689、ISIS 436671、またはISIS 444591で処置した。25匹のBACHDマウスの対照群を、同様の手順でPBSにより処置した。様々な時点において、各グループ由来の5匹のマウスを安楽死させ、そして大脳基底核線条体組織を取り出した。精密に湾曲したピンセット一對を、海馬の直前の脳中にまっすぐ下に配置し、皮質に横断方向の切り込みを作り、そしてその下の組織を鈍性切開した。精密に湾曲させたピンセットもう一對の先端を、海馬と嗅球とのあいだの中程の正中洞に沿ってまっすぐ下に配置し、縦方向の切り込みを作り、脳梁を鈍性切開により切断した。その後、最初の一対のピンセットを使用して、生じた皮質の一隅を反転させて、大脳基底核線条体および内包を暴露し、ついで内包を切断して大脳基底核線条体から取り去った。2つめの一對のピンセットを湾曲した末端が大脳基底核線条体のいずれかの側面に接触するように配置し、それを押し下げて組織を単離した。最初の一対のピンセットを使用して、大脳基底核線条体の後部末端をつまみ、脳から大脳基底核線条体を取り出した。

【0361】

RNA解析

RNAを、組織ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、大脳基底核線条体前部および後部から抽出した。ヒト変異型ハンチンチンmRNAレベルを、RTS2617を使用して測定した。マウス正常ハンチンチンmRNAレベルを、マウスプライマープロブセットRTS2633を使用して測定した。結果を表84および表85に示し、そしてweek 1、week 10、およびweek 20にて、PBS対照群の平均と比較した%阻害として表す。脳の前頭部におけるISISオリゴヌクレオチドの半減期を阻害データから算出し、そして表86に示す。

【0362】

【表84】

表 84：様々な時点でのヒトハンチンチン mRNA 発現の%阻害

ISIS No	時間 (週)	後頭部	前頭部
388241	1	72	91
	5	65	86
	10	52	73
	15	26	56
	20	14	53
436671	1	82	92
	5	78	89
	10	68	82
	15	61	77
	20	30	77
444591	1	60	85
	5	58	76
	10	48	60
	15	27	43
	20	27	36
436689	1	72	83
	5	72	87
	10	60	74
	15	50	74
	20	44	59

【0363】

【表 8 5】

表 85：様々な時点でのマウスハンチンチン mRNA 発現の%阻害

ISIS No	時間 (週)	後頭部	前頭部
388241	1	1	12
	5	22	36
	10	17	14
	15	7	18
	20	9	38
436671	1	84	96
	5	77	80
	10	64	86
	15	51	78
	20	19	75
444591	1	74	95
	5	70	90
	10	57	67
	15	34	47
	20	33	38
	5	47	40
	10	35	18
	15	34	22
	20	36	5

10

20

【 0 3 6 4】

【表 8 6】

表 86：線条体内ボラス注射後の、BACHD マウスの
脳前頭部における ISIS オリゴヌクレオチドの半減期

ISIS No	半減期 (日)
436671	46.6
436689	39.4
444591	24.3
388241	25.8

30

体重測定

体重を通常の間隔で測定し、そして研究の開始時のマウスの体重の%として表87に示す。これらの体重を、耐容性の指標として使用した。ISISオリゴヌクレオチドで処置したマウスのいずれにおいても、体重の不都合な変化は存在しなかった。

【 0 3 6 5】

40

【表 87】

表 87：アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後の
BACHD マウスの体重の%変化

	Week 5	Week 10	Week 15	Week 20
PBS	8	19	26	28
ISIS 388241	9	22	29	26
ISIS 436671	5	19	35	38
ISIS 444591	7	21	30	43
ISIS 436689	3	18	31	38

10

実施例20:Sprague DawleyラットにおけるISIS 437527のくも膜下腔投与の作用

Sprague Dawleyラットに対して、単回投与、繰り返し投与、または持続的注入のいずれかとして、くも膜下腔（IT）投与によりISIS 437527を投与した。

【0366】

処置および手術

ラットをイソフルレンを使用して安楽死させ、そして28-ゲージのポリウレタンカテーテルを各ラットのIT腰部スペース中に配置した。カテーテルの基部末端を、投与軸受台に接着させ、それを皮膚を介してボラス注射を与えたグループの動物に対して進展させた。持続的注入を受けるグループの動物のためのカテーテルを、ALZETポンプ（Model 2ML1）に対して接続し、それを各動物の背部側の皮下ポケットに配置した。手術後に、動物は、セフチオフルナトリウム（5 mg/kg）および酒石酸ブトルファノール（0.05 mg/kg）の単回筋肉内投与を受けた。持続的注入を受けるラットは、オリゴヌクレオチド投与をすぐに受け始めた。ボラス注射を受ける動物には、少なくとも5日の手術回復期間を与え、その後カテーテルの開存性を評価した。

20

【0367】

5匹のSprague Dawleyラットのグループに対して、くも膜下腔に送達される、350 μ gのISIS 437527の1回ボラス注射を投与した。5匹のSprague Dawleyラットの別のグループに対して、1週間の経過のあいだに3回くも膜下腔に送達される、120 μ gのISIS 437527のボラス注射を投与した。5匹のSprague Dawleyラットの別のグループに対して、1週間の経過のあいだに3回くも膜下腔に送達される、350 μ gのISIS 437527のボラス注射を投与した。5匹のSprague Dawleyラットの別のグループに対して、0.01 mL/時の速度で7日間持続的注入することにより送達される、50 μ g/日のISIS 437527を投与した。5匹のSprague Dawleyラットの対照群に対して、1週間の経過のあいだに3回くも膜下腔に送達される、PBSのボラス注射を投与した。各グループには、7日の回復期間を与え、その後ラットを安楽死させた。脳および脊髄をすべてのグループから採取し、そして解析した。

30

【0368】

ハンチンチン発現レベルのRNA解析

RNAを、ハンチンチンmRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、前頭皮質、側頭皮質、および頸髄から抽出した。ラットハンチンチンmRNAレベルを、シクロフィリンレベルに対して正規化して、プライマープロベセットrHtt_LTS00343を使用して測定した。結果を表88に示し、そしてPBS対照群の平均と比較した%阻害として表す。

40

【0369】

【表 8 8】

表 88：Sprague Dawley ラットにおけるハンチンチン mRNA 発現の%阻害

組織	投与スケジュール	投与量	%阻害
前頭皮質	IT 注射	50 μ g/日	11
	単回 IT ポーラス	350 μ g	28
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	21
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	0
側頭皮質	IT 注射	50 μ g/日	0
	単回 IT ポーラス	350 μ g	34
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	44
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	48
頸髄	IT 注射	50 μ g/日	22
	単回 IT ポーラス	350 μ g	45
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	58
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	46

AIF1発現レベルのRNA解析

RNAを、AIF1 mRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、前頭皮質、側頭皮質、および頸髄から抽出した。ラットAIF1レベルを、ラットプライマープロベセットrAif1_LTS002 19を使用して測定した。結果を、PBS対照のAIF1発現と比較してAIF1発現の%として算出し、そして表89に示す。結果は、繰り返しITポーラス投与により、頸髄組織にて炎症を引き起こすことを示す。持続的IT投与および単回ITポーラス投与は、ラットにおいて良好な耐容性を示した。

【 0 3 7 0 】

【表 8 9】

表 89：神経毒性の測定としての、Sprague Dawley ラットにおける

AIF1 mRNA レベルの%発現

組織	投与スケジュール	投与量	%阻害
前頭皮質	IT 注射	50 μ g/日	-36
	単回 IT ポーラス	350 μ g	-4
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	41
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	-7
側頭皮質	IT 注射	50 μ g/日	15
	単回 IT ポーラス	350 μ g	22
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	25
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	76
頸髄	IT 注射	50 μ g/日	108
	単回 IT ポーラス	350 μ g	72
	繰り返し IT ポーラス	120 μ g \times 3	473
	繰り返し IT ポーラス	350 μ g \times 3	268

実施例21：くも膜下腔投与を介したカニクイザルのCNS組織における、ISIS 436689の半減期の測定

カニクイザルに対して、様々なCNS組織におけるハンチンチンmRNA発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの半減期および作用期間を測定することを目的として、ISIS 436689をくも膜下腔（IT）に投与した。

【 0 3 7 1 】

処置

研究を、Northern Biomedical Research, MIにて行った。処置の開始前に、サルを4週間のあいだ隔離して飼育し、その間に血清化学および血液学の標準的なパネル、卵および寄生虫に関する糞便サンプルの調査、および結核試験を行なって、異常なサルまたは病気のサルをスクリーニング抽出した。サルに対して、皮下チタンアクセスポート (P.A.S. PORT (登録商標) Elite Plastic/Titanium portal with Ultra lock connector) に接続したポリウレタンカテーテルを使用して、くも膜下腔腰部カテーテルにより移植した。外部ポンプを使用した持続的注入のため、動物を麻酔して、投与装置をポートに接続した。動物を、0.04 mg/kgの投与量の硫酸アトロピンで、皮下注射により事前処置した。およそ15分後、8 mg/kgのケタミンHClの筋肉内投与を行い、鎮静を誘導した。動物を、麻酔の手術面に対してマスクし、挿管し、そして約1 L/分の酸素および2%のハロセンまたはイソフルレンで維持した。動物に5 mg/kgのセフチオフルナトリウム抗生物質の単回筋肉内投与を与えた。改変ニードルサポートの配置のため、ポートのそばに切開を行った。改変ニードルを、ポートに配置し、そして縫合して固定した。手術からの回復の際、ジャケットを動物に装着した。

10

【 0 3 7 2 】

15頭のオスのカニクイザルに対して、1.67 mg/mLの濃度で2.4 mL/日の流速で、21日間、4 mg/日のISIS 436689を投与した。3頭のカニクイザルの対照群に対して、同様の方法で同一の期間、PBSを投与した。3頭のサルのグループにはそれぞれ、1日、2週間、4週間、または8週間の回復期間を与え、その後安楽死させた。研究期間のあいだ、病気または苦痛の兆候に関して、サルを毎日観察した。

20

【 0 3 7 3 】

すべての動物を8.0 mg/kgのケタミンHClの筋肉内注射により鎮静し、ハロセンまたはイソフルレン/酸素混合物で維持し、そして200 IU/kgのヘパリンNaの静脈内ボラスを与えた。動物に対して、食塩水中0.001%亜硝酸ナトリウムにより、左心室を介して灌流した。

【 0 3 7 4 】

犠死させる時点で、脳を、脳マトリクス中で3 mm厚の冠状スライスで切断した。いくつかの脳構造を4 mmバイオプシーパンチを使用してサンプリングした。各構造から1つの4 mm直径のサンプルを1.0 mLのRNAlater RNA安定化溶液 (Qiagen, CA) を含有する2 mLのスクリュウキャップチューブ中に配置し、周囲温度にて1時間インキュベートし、その後凍結した。隣接する6 mm直径のサンプルを、2 mLのスクリュウキャップチューブ中に配置し、そして薬物動態解析用に凍結した。

30

【 0 3 7 5 】

脊髄を頸部、胸部、そして腰部に分割し、そして脊髄の各領域の約3 mm厚の切片を、RNA解析および薬物動態解析用に採取した。これらのサンプルを、脳サンプルの場合と同様の方法で処理した。

【 0 3 7 6 】

肝臓のサンプルを、RNA解析および薬物動態解析用に採取した。これらのサンプルを、上述した脳および脊髄の場合と同様の方法で処理した。

40

RNA解析

RNAを、ハンチンチン mRNAレベルのリアルタイムPCR解析のため、プライマープローブセットRTS2617を用いて、腰髄、胸髄、頸髄、前頭皮質、後頭皮質、小脳皮質、尾状組織、海馬、中脳、および脳橋から抽出した。脊髄の様々な部分で測定された結果を、表90に示し、そして8週にPBS対照群において測定された結果と比較した%阻害として示す。脳の様々な部分で測定された結果を、表91に示し、そして8週にPBS対照群において測定された結果と比較した%阻害として示す。

【 0 3 7 7 】

【表 90】

表 90：様々な時点、脊髄における、IT で投与された ISIS 436689 の

ハンチンチン mRNA 発現に対する作用

回復期間	腰髄	胸髄	頸髄
1 日	36	66	65
2 週	56	55	54
4 週	0	63	65
8 週	48	48	44

10

【0378】

【表 91】

表 91：様々な時点、様々な脳組織における、IT で投与された ISIS 436689 の

ハンチンチン mRNA 発現に対する作用

回復期間	前頭皮質	後頭皮質	小脳皮質	尾状	海馬	中脳 脳	脳橋
1 日	53	37	8	21	19	24	22
2 週	42	28	16	3	28	0	32
4 週	47	32	25	7	22	2	43
8 週	33	34	11	17	27	5	22

20

ELISAによるオリゴヌクレオチド濃度測定

組織（20 mg）を細かく切断し、秤量し、そしてホモジナイズして、フェノール/クロロホルムを使用して液体/液体抽出を行った。上清を取り出し、凍結乾燥し、そしてヒト EDTA血漿（1 mL）中で戻し、その後ハイブリダイゼーションELISA法を使用して解析した。

【0379】

ISIS 436689を、標識された相補的な切断用プローブ（5'末端にジゴキシゲニン、そして3'末端にC18スペーサーとBioTEG）に対してハイブリダイゼーションすることにより、組織中で検出した。ついで、複合体をニュートラアビジンでコートしたプレート上で捕捉し、そしてS1ヌクレアーゼを添加して、ハイブリダイズしなかった切断用プローブを消化した。ISIS 436689は切断用プローブを消化することから防御するため、消化されない切断用プローブを、オリゴヌクレオチド濃度の測定として使用した。消化されない切断用プローブを、アルカリホスファターゼを結合した抗-ジゴキシゲニン抗体を使用し、その後蛍光性基質読み取りを使用して検出した。オリゴヌクレオチド濃度を、回復期間のday 7、day 20、day 34、そしてday 62において、脊髄の頸部、胸部、そして腰部において測定し、そして肝臓において測定し、そして表92に示す。これらの組織中のISIS 436689の半減期を、このデータから算出し、そして表93に示す。データは、オリゴヌクレオチドが、全身性組織では無視できる程度の濃度だが、CNSでは主として濃縮されることを示している。

30

【0380】

40

【表 9 2】

表 92：様々な組織、様々な時点におけるハンチンチン mRNA 発現に対する
IT で投与された ISIS 436689 の濃度 (μg/g 組織)

器官	Day 7	Day 20	Day 34	Day 62
頸髄	118.9	78.7	79.8	42.8
胸髄	503.5	215.8	101.6	61.4
腰髄	557.1	409.5	143.3	49.5
肝臓	33.6	10.3	2.0	0.2

10

【 0 3 8 1】

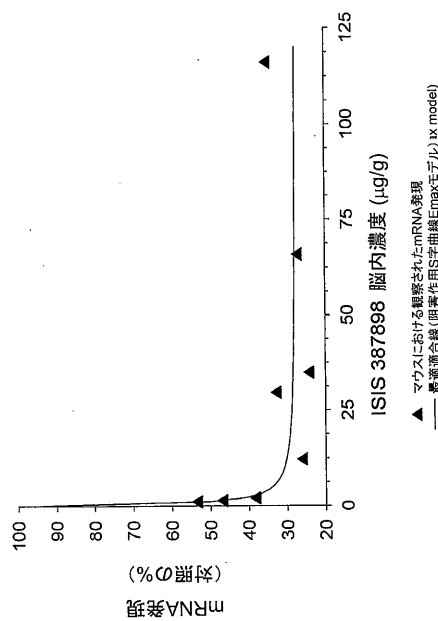
【表 9 3】

表 93：様々な組織におけるハンチンチン mRNA 発現に対する
IT で投与された ISIS 436689 の半減期

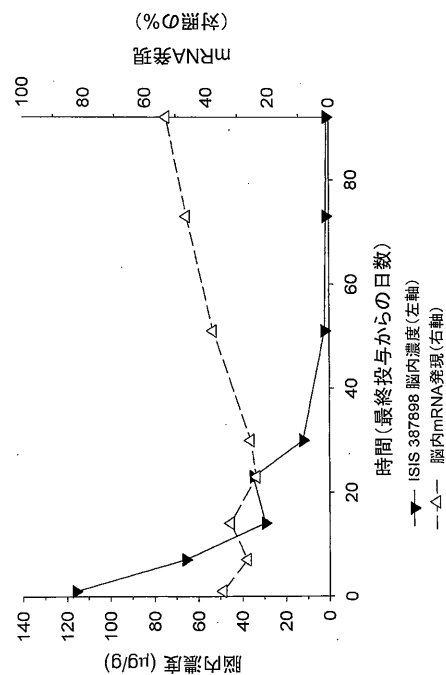
器官	半減期
頸髄	4.0
胸髄	15.1
腰髄	18.7
肝臓	7.6

20

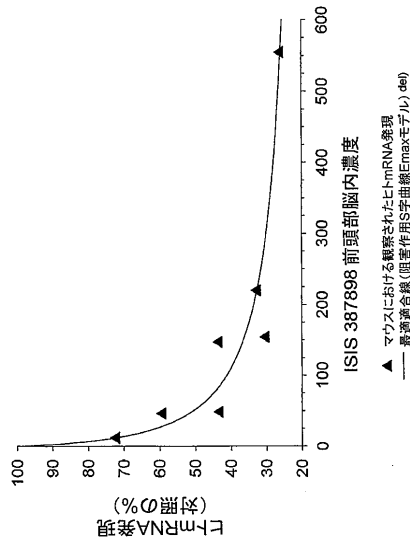
【図 1】



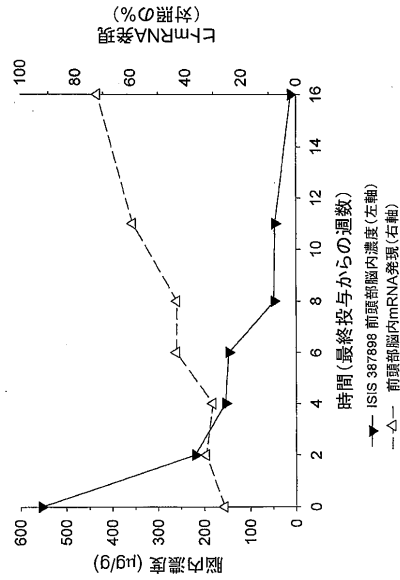
【図 2】



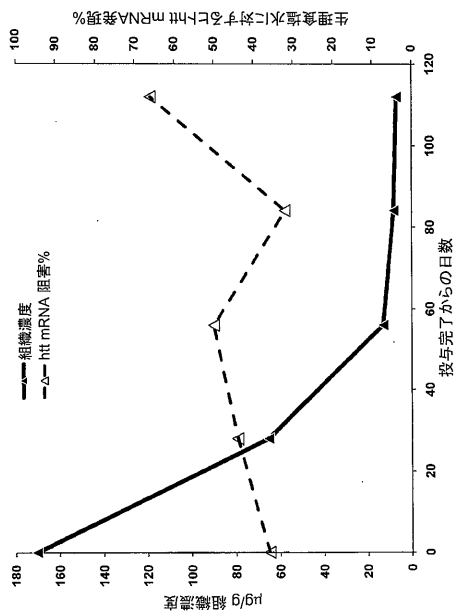
【図 3】



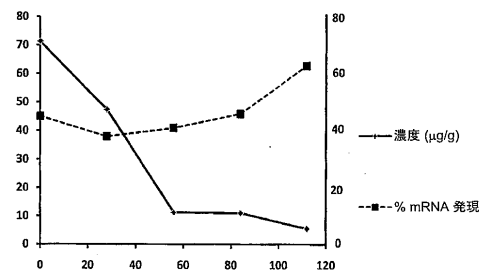
【図 4】



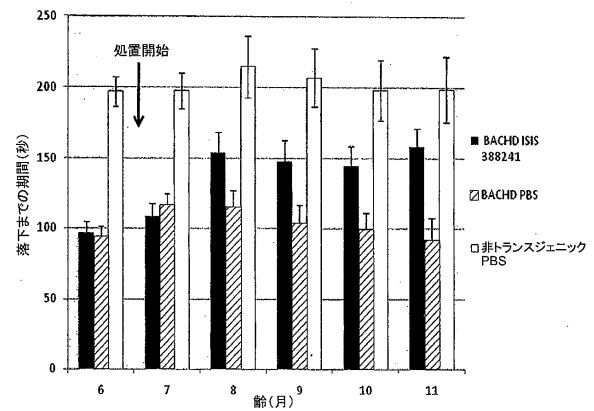
【図 5】



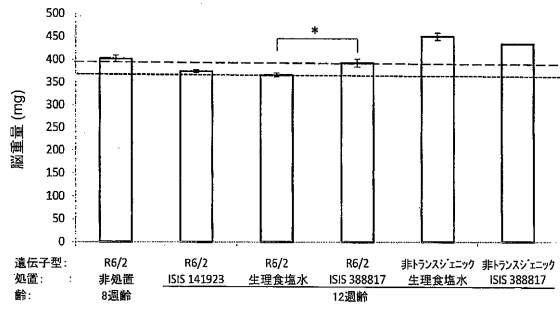
【図 6】



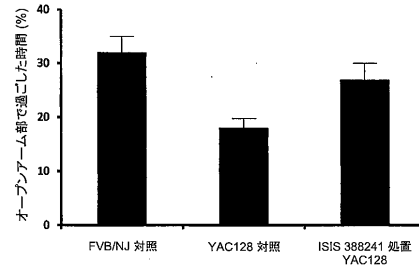
【図 7】



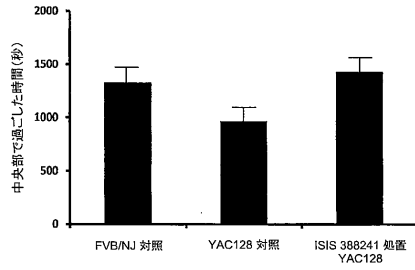
【図 8】



【図 10】



【図 9】



【配列表】

0005809146000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100117813
弁理士 深澤 憲広
- (72)発明者 ハン, ジーン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 8 , カールスバッド, ルーサーフォード・ロード 1 8
9 6
- (72)発明者 ベネット, シー・フランク
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 8 , カールスバッド, ルーサーフォード・ロード 1 8
9 6
- (72)発明者 フレアー, スーザン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 0 8 , カールスバッド, ルーサーフォード・ロード 1 8
9 6
- (72)発明者 コーダジーウィクツ, ホリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 1 5 , サン・ディエゴ, アラゴン・ドライブ 4 7 1 8
- (72)発明者 スタネック, リサ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, オールストン・ストリート 6 4
, アpartment 1
- (72)発明者 クリーブランド, ドン・ダブリュー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 4 , デル・メア, ハーフ・ムーン・ベイ・ドライブ
1 4 1 8 1
- (72)発明者 シハブッディン, ラミア
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 3 1 5 , ブライトン, コモンウェルス・アベニュー 1 9
3 3
- (72)発明者 チェン, セン・エイチ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 7 6 0 , ナティック, ジェニソン・サークル 1 0

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 2 4 4 3 1 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9
A 6 1 K 3 1 / 7 1 1 5
A 6 1 K 3 1 / 7 1 2
A 6 1 K 3 1 / 7 1 2 5
A 6 1 P 2 5 / 1 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)