

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-529295

(P2012-529295A)

(43) 公表日 平成24年11月22日(2012.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-515076 (P2012-515076)	(71) 出願人	511268694
(86) (22) 出願日	平成22年6月8日 (2010.6.8)		ミラゲン セラピューティクス
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月7日 (2012.2.7)		アメリカ合衆国、コロラド州 80301
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/037821		, ボルダー, ルックアウト ロード 6200
(87) 国際公開番号	W02010/144485	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		弁理士 稲葉 良幸
(31) 優先権主張番号	61/185,033	(74) 代理人	100109346
(32) 優先日	平成21年6月8日 (2009.6.8)		弁理士 大貫 敏史
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ヤマダ, クリスティーナ
			アメリカ合衆国, コロラド州, ボルダー
		(72) 発明者	マーシャル, ウィリアムズ エス.
			アメリカ合衆国, コロラド州, ボルダー
		Fターム(参考)	4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 GA13
			HA17
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 m i R N A阻害剤およびミメティクスの化学修飾モチーフ

(57) 【要約】

本発明は、そのm i R N A阻害剤またはm i R N Aミメティクスとしての使用に関して改善された安定性、効力、および／または毒性を付与する化学様式を有するポリヌクレオチドを提供する。本発明は、ポリヌクレオチドを含む医薬組成物および医薬製剤ならびにm i R N Aまたはm R N A発現に関連する病状を有する患者を治療する方法をさらに提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2' 位に 1 つまたは複数のヌクレオチド修飾および少なくとも 1 つの末端キャップ構造を有するポリヌクレオチドであって、m i R N A または m i R N A アンチセンスヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記末端キャップ構造が、ホスホロチオエートモノホスフェートまたは末端脱塩基残基を含む、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記 2' 位の 1 つまたは複数のヌクレオチド修飾が、O-メチル、フルオロ、デオキシ、およびロックド核酸から独立して選択される、請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 4】

実質的に全てのヌクレオチド 2' 位が修飾されている、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5】

各ヌクレオチド 2' 修飾が、O-メチルおよびフルオロから独立して選択される、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

各ヌクレオチド 2' 修飾が、O-メチルである、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 7】

各プリンヌクレオチドが 2' O-メチルを有し、各ピリミジンヌクレオチドが 2' -F を有する、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

少なくとも 1 つの末端ホスホロチオエートモノホスフェートを有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 9】

3' 末端および 5' 末端の両方で末端ホスホロチオエートモノホスフェートを有する、請求項 8 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの末端脱塩基ヌクレオチドを有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド

30

【請求項 11】

3' 末端および 5' 末端の両方で末端脱塩基ヌクレオチドを有する、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 12】

内部ホスホロチオエート結合を含まない、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

1 つまたは複数の内部ホスホロチオエート結合を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド

40

【請求項 14】

5' 末端の 2 つの末端ヌクレオチドおよび 3' 末端の 2 つの末端ヌクレオチドの間にのみ内部ホスホロチオエート結合を含む、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 15】

前記ホスホロチオエート結合が、ホスホジエステル結合で代替される、請求項 13 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 16】

短縮された成熟 m i R N A 配列または短縮された成熟 m i R N A アンチセンス配列を含む、請求項 1～15 に記載のポリヌクレオチド。

50

【請求項 17】

全長成熟miRNA配列または全長成熟miRNAアンチセンス配列を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド

【請求項 18】

5～25ヌクレオチドの長さである、請求項16または17に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

12～18ヌクレオチドの長さである、請求項18に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

16ヌクレオチドの長さである、請求項18に記載のポリヌクレオチド。

10

【請求項 21】

miR: 1、133a、133b、143、145、15a、15b、16、195、206、208a、208b、21、29a、29b、29c、424、および486から選択される成熟miRNA配列と少なくとも約75%相補的であるmiRNAアンチセンス配列を含む、請求項16または17に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 22】

前記miRNAアンチセンス配列が、miR: 1、133a、133b、143、145、15a、15b、16、195、206、208a、208b、21、29a、29b、29c、424、および486から選択される成熟miRNA配列と100%相補的である、請求項21に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 23】

前記アンチセンス配列が、成熟miR-15b、miR-21、またはmiR-208aと相補的である、請求項16または17に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 24】

図1または表6に示される配列および／または構造を有する、請求項23に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 25】

miR: 1、133a、133b、143、145、15a、15b、16、195、206、208a、208b、21、29a、29b、29c、424、および486から選択される成熟miRNA配列と少なくとも約75%相同であるmiRNA配列を含む、請求項16または17に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 26】

前記miRNA配列が、miR: 1、133a、133b、143、145、15a、15b、16、195、206、208a、208b、21、29a、29b、29c、424、および486から選択される成熟miRNA配列と100%相同である、請求項25に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 27】

請求項1～26のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよび薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 28】

コロイド分散系、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビード、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、またはリポソームとして製剤化される、請求項27に記載の医薬組成物。

40

【請求項 29】

皮内送達、皮下送達、筋内送達、腹腔内送達、または静脈内送達用に製剤化される、請求項27または28に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

心臓カテーテル系による投与用に製剤化される、請求項27または28に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

50

請求項 27～30 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、miRNA 発現に関連する病状を有する患者を治療する方法。

【請求項 32】

前記病状が、心臓肥大、心筋梗塞、心不全、血管傷害、および病的な心臓線維症のうちの 1 つまたは複数である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記組成物が心臓カテーテルによって投与される、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

(関連発明の相互参照)

本出願は、2009 年 6 月 8 日に出願された米国仮出願第 61/185,033 号（その全体について参照により本明細書に援用する）の優先権の利益を請求する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、microRNA (miRNA または miR) 阻害剤およびミメティクス (mimetics) の化学モチーフ、特に、患者に投与したときに効力 (potency)、安定性、および/または毒性における利点を有する化学修飾された miRNA センスおよびアンチセンスポリヌクレオチドに関する。

20

【背景技術】

【0003】

MicroRNA (miR) は、心臓機能の制御および維持を含む多くの生物学的プロセスに関与している (Chien KR, Molecular Medicine: MicroRNAs and the tell-tale heart, Nature 447, 389-390 (2007) を参照)。したがって、miR は、とりわけ、心臓肥大、心筋梗塞、心不全、血管傷害、および病的な心臓線維症 (pathologic cardiac fibrosis) などの病状についての比較的新しいクラスの治療標的を表す。miR は、約 18～約 25 ヌクレオチドの長さの小さな、タンパク質をコードしない (non-protein coding) RNA であり、配列が完全に相補的である場合には分解を促進することにより、あるいは、配列がミスマッチを含む場合には翻訳を阻害することにより、標的 mRNA のリプレッサーとして働く。成熟 miRNA 鎖は RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に導入され、ここで塩基対の相補性によって標的 RNA と会合する。

30

【0004】

miRNA 機能は、アンチセンスポリヌクレオチドまたは miRNA 機能を模倣するポリヌクレオチド (「miRNA ミメティック (mimetic)」) によって治療的に標的化され得る。しかしながら、該ポリヌクレオチドを無傷の細胞に導入しとき、それらはヌクレアーゼによって攻撃および分解され、活性が失われる。その分解を 2' 置換等によって回避しようとしてポリヌクレオチド類似体が調製されている一方 (B. Sproat et al, Nucleic Acids Research 17 (1989), 3373-3388)、該修飾は、意図する生物学的活性に関するポリヌクレオチドの効力に影響を与えることが多い。このような効力の低減は、各々の場合、修飾されたポリヌクレオチドが標的 RNA と安定な二重鎖を形成することができないことおよび/または細胞機構と相互作用がないことに起因し得る。

40

【0005】

治療場面において miRNA 機能を効果的に標的化するため、miRNA 阻害剤および miRNA ミメティクスの安定性、効力、および/または毒性プロファイルを改善するための化学様式またはモチーフが求められている。

【発明の概要】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、その miRNA 阻害剤または miRNA ミメティクスとしての使用に関して

50

改善された安定性、効力、および／または毒性を有する化学様式を付与するポリヌクレオチドを提供する。本発明は、ポリヌクレオチドを含む医薬組成物および医薬製剤、ならびにmiRNAまたはmRNA発現に関連する病状を有する患者を治療する方法をさらに提供する

【0007】

一態様において、本発明は、2'位に1つまたは複数のヌクレオチド修飾および少なくとも1つの末端または「キャップ (cap)」修飾を有するポリヌクレオチドを提供する。該化学修飾モチーフにより、全てホスホロチオエート結合した (fully phosphorothioate-linked) ポリヌクレオチドおよび／または全長アンチセンスまたはセンスmiRNA配列が不要となり得る。上記ポリヌクレオチドは、miRNA阻害剤またはmiRNAミメティックであり、本明細書に示すように、非修飾ポリリボヌクレオチドおよび／または他の可能なポリヌクレオチド修飾体を上回る改善された効力を与える。

【0008】

たとえば、本ポリヌクレオチドは、O-アルキル (たとえばO-メチルまたは「OMe」)、ハロ (たとえばフルオロ)、デオキシ (H)、およびロックド核酸 (locked nucleic acid) から選択される2'修飾などの本明細書に記載される2'修飾の1つまたはそれらの組み合わせを有するmiRNA阻害剤またはmiRNAミメティックであってもよく、いくつかの実施態様において、実質的に全てのまたは全てのヌクレオチド2'位が修飾される。末端またはキャップ修飾は、いくつかの実施態様において、5'および／または3'ホスホロチオエートモノホスフェートおよび／または脱塩基 (abaisc) 部分、または本明細書に記載するような他のキャップ構造であってもよい。本ポリヌクレオチドは、全てホスホロチオエート結合している必要はないが、このような結合が存在する場合、たとえば5'末端の2つの末端ヌクレオチドおよび3'末端の2つの末端ヌクレオチドの間にこのような結合が位置してもよい。ヌクレオチド配列は、成熟miRNAに対して全長であってもよいし、または全長アンチセンスmiRNA (成熟体) であってもよいが、いくつかの実施態様において、本ポリヌクレオチドは、短縮された (truncated) miRNA配列または短縮されたmiRNAアンチセンス配列を含む。このような修飾された短縮配列は、より長い (非修飾のまたは慣用的に修飾された) 対応物と比較しても、高レベルの効力を示すことができる。本ポリヌクレオチドは、miR-15b、miR-21、miR-208a、または本明細書に記載される他のもの (の全部またはその一部) と相補的なアンチセンス配列を有するアンタゴmirであってもよい。

【0009】

第2の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物または医薬製剤を提供する。医薬組成物は、コロイド分散系、高分子複合体 (macromolecular complex)、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビード、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、またはリボソームを含む種々の薬学的に許容可能な形態に製剤化することができる。該組成物は、コレステロールおよびポリヌクレオチドを標的哺乳類細胞に送達するための標的リガンドなど他の分子のとの接合体 (conjugates) を含むことができる。

【0010】

第3の態様において、本発明は、miRNAまたはmRNA発現に関連する病状を有する患者を治療する方法を提供する。たとえば、病状は、心臓肥大、心筋梗塞、心不全、血管傷害、および病的な心臓線維症のうちの1つまたは複数である。このような病状は、本発明のポリヌクレオチドおよび組成物を投与することによって治療、予防、または治癒される。したがって、本発明は、miRNAまたはmRNA発現に関連する病状の治療のための本発明の修飾ポリヌクレオチドおよび組成物の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】例示的なmiRNA修飾様式を示す表である。示した配列は、成熟miR15bのアンチセンス配列 (全長および短縮型) である。略記を表3に提供する。各々例示した

10

20

30

40

50

RNAの「別名」には、miRNA標的（たとえば15b）；2'構造（O-メチル，「OMe」；またはO-メチルおよびフルオロ，「Me/F」；またはO-メチルおよびデオキシ，「Me/H」；またはロックド核酸，「LNA」）；ポリヌクレオチドのサイズ（全長についてはFLまたは16mer）；および末端の構造または内部結合（ホスホジエステル結合（phosphodiester-linked）についてはPO、ホスホロチオエート結合についてはPS、全ての他のホスホロチオエート結合についてはPS__EO、ホスホロチオエート末端キャップについてはPS__EC、脱塩基（Abasic）、および5'および3'ホスホロチオエートモノホスフェートについてはPOS、を含む）が含まれる。

【図2】デュアル（dual）ルシフェラーゼアッセイを用いた、HeLa細胞における10nM（各組の左の棒）および0.1nM（各組の右の棒）の2つの濃度の図1の修飾ポリヌクレオチドについてのin vitro試験結果を示している。ルシフェラーゼ比の値が大きくなるほど、阻害剤の効力が良くなる。結果は、長さ（16merおよび全長）によってグループ分けしている。最も性能が良い化学物質を表4に示す。

【図3】デュアルルシフェラーゼアッセイを用いた、10nM（各組の左の棒）および0.1nM（各組の右の棒）での、ホスホジエステル骨格またはホスホロチオエート骨格と直接比較したホスホロチオエートモノホスフェート修飾ポリヌクレオチドの結果を示している。POはホスホジエステル結合であり、PSはホスホロチオエート結合であり、PO__POSは3'および5'末端に末端ホスホロチオエートモノホスフェートを有するホスホジエステル結合である。

【図4】表5のポリヌクレオチド5～14を用いたマウスでのmiR-15bのノックダウンを示している。肝臓（各組の左の棒）および心臓（各組の右の棒）の両方にmiR-15bが豊富にあると判別され、生理食塩水を注射したマウスとデータを比較している。

【図5】新生児ラット心筋細胞での修飾アンチセンスポリヌクレオチドを用いたmiR-208aの阻害を示している。図5の結果は、βMHC発現について定量PCRを行ったものである。左の棒は100nMの阻害剤の結果を示し、右の棒は1nMの阻害剤の結果を示している。

【図6】デュアルルシフェラーゼアッセイにおける、種々の修飾を有するアンチセンスポリヌクレオチドによるmiR-21の阻害を示している。

【図7】表示した投与量のマウス注射後の4つの異なる修飾miR-15bアンチセンスポリヌクレオチドのin vivo組織分布を示している。

【発明を実施するための形態】

【0012】

（発明の詳細な説明）

本発明は、miRNA阻害剤またはmiRNAミメティクスとしての使用に関して、改善された安定性、効力、および／または毒性を付与する化学様式を有するポリヌクレオチドを提供する。本発明は、ポリヌクレオチドを含む医薬組成物および医薬製剤、ならびにmiRNAまたはmiRNA発現に関連する病状を有する患者を治療する方法をさらに提供する。

【0013】

修飾ポリヌクレオチド

本ポリヌクレオチドは、以下の詳細に説明するとおり、2'位に1つまたは複数のヌクレオチド修飾および少なくとも1つの末端修飾または「キャップ」を有する。本ポリヌクレオチドは、miRNA阻害剤またはmiRNAミメティックであり、非修飾ポリリボヌクレオチドおよび／または他の可能なポリヌクレオチド修飾体を上回る改善された効力を示す。

【0014】

本明細書に記載する「miRNA阻害剤」は、成熟一本鎖miRNAまたはその一部に対し、本明細書に記載のように相補的または部分的に相補的な、アンチセンスである配列を有するポリヌクレオチドである。「miRNAミメティック」は、成熟一本鎖miRNAまたはその一部に対応する（本明細書に記載のようにこれらと相同または実質的に相同

10

20

30

40

50

である) 配列を有するポリヌクレオチドである。

【0015】

本ポリヌクレオチドは、2'位に(2'ヒドロキシルに関して)1つまたは複数のヌクレオチド修飾を有する。たとえばアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける2'修飾ヌクレオチドの導入により、該オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼに対する抵抗性および相補RNAとの熱安定性の両方が増加し得る。2'位の様々な修飾は、RNA標的または細胞機構との分子相互作用を弱めることなしにヌクレアーゼ感応性を増加させるものから独立して選択することができる。このような修飾は、*in vitro*または*in vivo*での効力の増加に基づいて選択することができる。*miRNA*阻害の増加した効力(たとえばIC50)を決定する例示的な方法は、本明細書に記載されている。

10

【0016】

いくつかの実施態様において、2'修飾は、(置換されてもよい)O-アルキル、ハロ、デオキシ(H)、およびロックド核酸から独立して選択してもよい。ある種の実施態様において、実質的に全てのまたは全てのヌクレオチド2'位が修飾され、たとえば、O-アルキル(たとえばO-メチル)、ハロ(たとえばフルオロ)、デオキシ(H)、およびロックド核酸から独立して選択される。たとえば、2'修飾は各々、O-メチルおよびフルオロから独立して選択することができる。例示的な実施態様において、各プリンヌクレオチドは2'OMeおよびピリミジンを有し、各ヌクレオチドは2'-Fを有する。ある種の実施態様において、1~約5の2'位または約1~約3の2'位は、(たとえば2'ヒドロキシルとして)非修飾とする。

20

【0017】

本発明による2'修飾には、小さい炭化水素置換基も含まれる。炭化水素置換基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアルコキシアルキルを含み、ここで、アルキル(アルコキシのアルキル部分を含む)、アルケニル、およびアルキニルは置換されてもよいし非置換であってもよい。アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、C1~C10アルキル、アルケニル、またはアルキニル(C2またはC3など)であってもよい。炭化水素置換基は、N、O、および/またはSから独立して選択することができる1つ、2つ、または3つの非炭素原子を含んでもよい。2'修飾は、O-アルキル、O-アルケニル、およびO-アルキニルとして、アルキル、アルケニル、およびアルキニルをさらに含んでもよい。

30

【0018】

本発明による例示的な2'修飾には、2'-O-アルキル(2'OMeまたは2'OEtなどのC1~3アルキル)、2'-O-メトキシエチル(2'-OMOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMA P)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)置換が含まれる。

【0019】

2'修飾は、全てのヌクレオチド残基または全てのプリンヌクレオチド上でOMeであってもよい。

40

【0020】

ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、(たとえば2'ヒドロキシルに代えて)少なくとも1つの2'-ハロ修飾、たとえば、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブロモ、および2'-ヨードを含む。いくつかの実施態様において、2'-ハロ修飾は、フルオロである。本ポリヌクレオチドは、1~約20の2'-ハロ修飾(たとえばフルオロ)または1~約10もしくは1~約5の2'-ハロ修飾(たとえばフルオロ)を含んでもよい。いくつかの実施態様において、本ポリヌクレオチドは、全て2'-フルオロヌクレオチド、または全てのピリミジンヌクレオチド上に2'-フルオロを含む。ある種の実施態様において、2'-フルオロ基は、独立して、ジメチル化またはトリメチル化されてもよいし、メチル化されてなくてもよい。

50

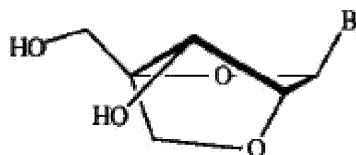
【0021】

本ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の2'-デオキシ修飾（たとえば2'-ヒドロキシルの代わりにH）を有してもよいが、1～約20の2'-デオキシ修飾、または1～約10もしくは1～約5の2'-デオキシ修飾を含んでもよい。いくつかの実施態様において、本ポリヌクレオチドは全て2'-デオキシヌクレオチドを含む。

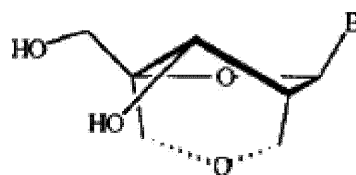
【0022】

ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の「コンホメーションが束縛された（conformationally constrained）」または二環式糖ヌクレオシド修飾（BSN）を含み、これは、BSNを含むポリヌクレオチドとその相補的なmicroRNA標的鎖との間で形成された複合体に高い熱安定性を与える。たとえば、一実施態様において、本ポリヌクレオチドは、1つまたは複数のロックド核酸（LNA）残基を含む。LNAは、たとえば、米国特許第6,268,490号、米国特許第6,316,198号、米国特許第6,403,566号、米国特許第6,770,748号、米国特許第6,998,484号、米国特許第6,670,461号、および米国特許第7,034,133号に記載され、これら全てを全体について参照により本明細書に援用する。「ロックド核酸」（LNA）は、「ロックされた（locked）」コンホメーションをもたらすリボース糖部分の2'および4'炭素間に過剰な架橋を含む、修飾されたヌクレオチドまたはリボヌクレオチドである。一実施態様において、本ポリヌクレオチドは、構造Aに示される構造を有する1つまたは複数のLNAを含む。他の一実施態様において、本ポリヌクレオチドは、構造Bに示される構造を有する1つまたは複数のLNAを含む。さらに他の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、構造Cに示される構造を有する1つまたは複数のLNAを含む。

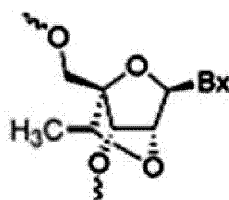
【化1】



A



B



C

【0023】

本発明のポリヌクレオチドで用いることができる他の好適なBSN修飾には、米国特許第6,403,566号および米国特許第6,833,361号に記載されるものが含まれ、これらの両方をその全体について参照により本明細書に援用する。ある種の一実施態様において、本ポリヌクレオチドは、約1～約10のロックド核酸または2～約5のロックド核酸を含む。

【0024】

例示的な実施態様において、本ポリヌクレオチドは、2'-OMeとして修飾された2'位を含む。あるいは、プリンヌクレオチドは、2'-OMeとして2'位で修飾され、ピリミジンヌクレオチドは、2'-フルオロとして2'位で修飾される。

【0025】

本ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの末端修飾または「キャップ」をさらに含む。キャップは、5'および/または3'キャップ構造であってもよい。「キャップ」または「末端キャップ」には、ポリヌクレオチドのいずれかの末端における化学修飾（末端リボヌクレオチドに関して）が含まれ、5'末端の最後の2つのヌクレオチドおよび3'末端の最後の2つのヌクレオチドの間の結合における修飾が含まれる。本明細書に記載するキャップ構造は、RNA標的または細胞機構との分子相互作用を弱めることなく、エキソヌクレアーゼに対するオリゴヌクレオチドの抵抗性を増加する。このような修飾は、*in vitro*または*in vivo*での増加した効力に基づいて選択することができる。*miRNA*阻害の増加した効力（たとえばIC50）を決定するための例示的な方法は、本明細書に記載されている。

10

【0026】

キャップは、5'末端（5'キャップ）または3'末端（3'キャップ）に存在してもよいし、あるいは両端に存在してもよい。ある種の実施態様において、5'および/または3'キャップは、ホスホロチオエートモノホスフェート、脱塩基残基（部分）、ホスホロチオエート結合、4'-チオヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、逆方向（*inverted*）ヌクレオチドまたは逆方向脱塩基部分（2'-3'または3'-3'）、ホスホロジチオエートモノホスフェート、およびメチルホスホネート部分から独立して選択される。ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート結合は、キャップ構造の一部である場合、5'末端の2つの末端ヌクレオチドおよび3'末端の2つの末端ヌクレオチドの間に通常位置する。

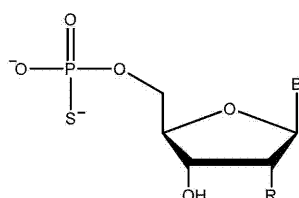
20

【0027】

ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、上記の1つまたは複数の2'修飾に加えて、少なくとも1つの末端ホスホロチオエートモノホスフェートを有する。ホスホロチオエートモノホスフェートは、エキソヌクレアーゼ作用を阻害することにより、*miRNA*阻害剤および*miRNA*ミメティクスのより高い効力を付与することができ、いくつかの実施態様において全てホスホロチオエート結合したポリヌクレオチドおよび/または全長阻害剤が不要となる。ホスホロチオエートモノホスフェートは、オリゴヌクレオチドの5'および/または3'末端にあってもよい。ホスホロチオエートモノホスフェートは、以下の構造によって定義され、ここで、Bは塩基であり、Rは上記の2'修飾である。

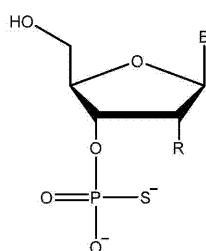
30

【化2】



5' ホスホロチオエートモノホスフェート

40



3' ホスホロチオエートモノホスフェート

【0028】

50

ある種の実施態様において、5' および／または 3' 末端のホスホロチオエートモノホスフェートに加え、本ポリヌクレオチドは、2' OMeとして修飾された全ての2' 位を含み、あるいは、プリンヌクレオチドは、2' OMeとして2' 位で修飾され、ピリミジンヌクレオチドは、2' -フルオロとして2' 位で修飾される。miR-15b阻害剤について本明細書で例示したとおり、これらの実施態様における本ポリヌクレオチドは、全てホスホロチオエート結合している必要はなく、および／または（対応する成熟miRNA配列に関して）全長である必要はない。ホスホロチオエート結合は、いくつかの実施態様において、たとえば（キャップ構造の一部などとして）5' および 3' 末端の最後の2つのヌクレオチド間に存在してもよいし、あるいはホスホジエステル結合で代替されてもよい。

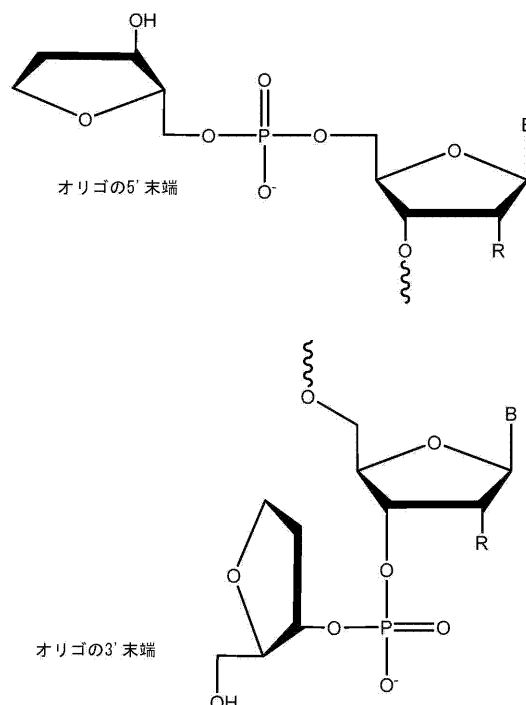
10

【0029】

これらの実施態様または他の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、5' および 3' 末端のいずれかまたは両端で少なくとも1つの末端脱塩基残基を含むことができる。脱塩基部分は、アデノシン、グアニン、シトシン、ウラシル、またはチミンなどの一般的に認知されるプリンまたはピリミジンヌクレオチド塩基を含まない。したがって、このような脱塩基部分は、ヌクレオチド塩基を欠くか、または他の非ヌクレオチド塩基化学基を1' 位に有する。たとえば、脱塩基ヌクレオチドは、逆脱塩基ヌクレオチドであってもよく、たとえば逆脱塩基ホスホアマリダイトが（3' アマリダイトの代わりに）5' アマリダイトを介して結合し、5' -5' リン酸結合となる。ポリヌクレオチドの5' および 3' 末端の逆脱塩基ヌクレオチドの構造を以下に示す。miR-21について本明細書（図6）に示すように、2' OMe修飾を有し、このような脱塩基キャップ構造を有するポリヌクレオチドは、特に有効であり得る。

20

【化3】



30

40

【0030】

ホスホロチオエート結合は、ヌクレアーゼ開裂に対するポリヌクレオチドの抵抗性をより高めるために使用されている。本明細書に記載された化学修飾様式は、ホスホロチオエート結合（上記のキャップ構造として含まれる）を受容することができる一方、ある種の実施態様において、内部ホスホロチオエート結合は、記載した2' 修飾およびキャップ修飾によって不必要となる。それに関わらず、ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、（キャップのもの以外に）1つまたは複数の内部ホスホロチオエート結合を含む。たとえば、本ポリヌクレオチドは、部分的にホスホロチオエート結合してもよく、たとえば、ホスホロチオエート結合は、ホスホジエステル結合で代替されてもよい。

50

【0031】

本ポリヌクレオチドは、全長または短縮されたm i R N A 配列または全長または短縮されたm i R N A アンチセンス配列を含み、これらから本質的になり、またはこれらからなってもよい。m i R N A 配列に関して本明細書に記載する「全長」とは、成熟m i R N A 配列またはそのアンチセンス対応物の長さをいう。したがって、本明細書に記載される阻害剤およびミメティクスは、短縮されたまたは全長（センスまたはアンチセンス）成熟m i R N A 配列であってもよいし、あるいは他のポリヌクレオチド配列と組み合わせてこれらの配列を含んでもよい。たとえば、該阻害剤およびミメティクスは、いくつかの実施態様において、p r e - m i R N A 配列およびp r i - m i R N A 配列またはその一部に対応してもよいし、あるいは他の非m i R N A 配列を含んでもよい。ある種の実施態様において、本明細書に記載される化学修飾モチーフによって、全長アンチセンスまたはセンスm i R N A （成熟）配列が不必要となる。

10

【0032】

ある種の実施態様における本ポリヌクレオチドは、5～25ヌクレオチドの長さ、8～18ヌクレオチドの長さ、または12～16ヌクレオチドの長さである。ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、約8ヌクレオチド未満、約10ヌクレオチド未満、約12ヌクレオチド未満、または約16ヌクレオチド未満の長さである。いくつかの実施態様において、本ポリヌクレオチドは、約16ヌクレオチドの長さである。

【0033】

本ポリヌクレオチドは、成熟m i R N A、たとえば、以下の表1に列記した成熟m i R N A を模倣するまたは標的にするように設計されたヌクレオチド配列を有してもよい。これらの実施態様または他の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、さらにまたはあるいは、p r e - m i R N A またはp r i - m i R N A 体を標的化するように設計してもよい。ある種の実施態様において、m i R N A を阻害するように設計されたポリヌクレオチドは、（以下の表1に示す）完全に相補的なm i R N A 配列に対して1～5つ（たとえば、2つ、3つ、または4つ）のミスマッチを含む配列を有してもよい。他の実施態様において、m i R N A を模倣するように設計されたポリヌクレオチドは、（以下の表1に示す）成熟m i R N A 配列に対して1～5つ（たとえば、2つ、3つ、または4つ）のヌクレオチド置換を含む配列を有してもよい。そのようなアンチセンスおよびセンス配列は、s h R N A、またはステムおよびループ部分などを含む他のR N A 構造に導入されてもよい。そのような配列は、特に、心臓肥大、心筋梗塞、心不全（たとえば、鬱血性心不全）、血管傷害、および／または病的な心臓線維症の治療または治癒のためにm i R N A 機能を模倣または標的化するのに特に有用である。例示的なm i R N A 治療の有用性は、以下の表1に列記した米国特許および国際公開公報の参照文献に開示され、その各々をその全体について参照により本明細書に援用する。

20

30

【表 1 - 1】
表 1

<u>miRNA</u>	<u>miRNA 配列</u>	<u>参考文献</u>
1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	WO 2009/012468
100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	WO 2009/012468
10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	WO 2009/012468
125b	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	WO 2009/012468
128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	WO 2007/070483
133a	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	WO 2009/012468
133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	WO 2009/012468
139	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	WO 2009/012468
143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	WO 2007/070483
145	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU	WO 2007/070483
150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	WO 2009/012468
15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUG	WO 2009/062169
15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	WO 2009/062169
16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	WO 2009/062169
181b	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	WO 2009/012468
195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	WO 2009/012468
197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	WO 2009/012468
199a	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	WO 2009/012468

10

20

30

40

【表 1 - 2】

<u>miRNA</u>	<u>miRNA 配列</u>	<u>参考文献</u>
199b	miR-199b-5p CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC miR-199b-3p ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	US 61/047,005
206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	WO 2007/070483
208a	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	WO 2008/016924
208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	WO 2009/018492
20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	US 60/950,565
21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	WO 2009/058818
214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	US 61/047,005
22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	WO 2009/012468
221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	WO 2009/012468
222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	WO 2009/012468
224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	WO 2009/012468
23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	WO 2009/012468
26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	WO 2007/070483
26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	WO 2009/012468
28	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	WO 2009/012468
29a	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	WO 2009/018493
29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	WO 2009/018493

10

20

30

40

【表 1 - 3】

<u>miRNA</u>	<u>miRNA 配列</u>	<u>参考文献</u>
29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	WO 2009/018493
30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	PCT/US2010/031147
30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	PCT/US2010/031147
30c	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	WO 2009/012468
30d	UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG	PCT/US2010/031147
30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	PCT/US2010/031147
342-3p	UCUCACACAGAAAU CGCACCCGU	WO 2009/012468
382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	WO 2009/012468
422a	ACUGGACUUAGGGUCAGAAGGC	US 2009/0226375
378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	WO 2009/012468
424	CAGCAGCAAUUC AUGUUUGAA	WO 2009/062169
483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU	WO 2009/012468
484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	WO 2009/012468
486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	WO 2009/012468
497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU	WO 2009/062169
499	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	WO 2009/018492
542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	WO 2009/012468
92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	WO 2009/012468
92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	WO 2009/012468
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	WO 2009/012468
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	WO 2009/012468

10

20

30

40

【表 1 - 4】

<u>miRNA</u>	<u>miRNA 配列</u>	<u>参照文献</u>
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	WO 2009/012468
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	WO 2009/012468
let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	WO 2009/012468
let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	WO 2009/012468
let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	WO 2009/012468
451	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	PCT/US2010/034227

10

【0034】

ある種の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、（上記のような）p r i -、p r e -、または成熟m i R - 1 5 b、m i R - 2 0 8 a、またはm i R - 2 1の全てまたは一部に完全にまたは部分的に相補的なアンチセンス配列を含む。

20

【0035】

m i R - 1 5 b（その構造および処理を含む）および（とりわけ）心臓肥大、心不全、または心筋梗塞を治療するその可能性は、国際公開第2009/062169号に記載され、これはその全体について参照により本明細書に援用する。本発明による阻害m i R N Aの設計に用いることができるヒトm i R - 1 5 bのp r e - m i R N A配列（5'から3'）は、

【化4】

UUGAGGCCUU AAAGUACUGU AGCAGCACAU CAUGGUUUAC AUGCUACAGU
CAAGAUGCGA AUCAUUAUUU GCUGCUCUAG AAAUUUAAGG AAUUCAU

30

である。

【0036】

m i R - 2 0 8 a（その構造および処理を含む）および（とりわけ）心臓肥大、心不全、または心筋梗塞を治療するその可能性は、国際公開第2009/018492号に記載され、これをその全体について参照により本明細書に援用する。本発明による阻害m i R N Aの設計に用いることができるヒトm i R - 2 0 8 aのp r e - m i R N A配列（5'から3'）は、

【化5】

acgggcgagc uuuuggcccg gguauaccu gaugcucacg uauaagacga
gcaaaaagcu tguuggucag a

40

である。

【0037】

m i R - 2 1（その構造および処理を含む）および（とりわけ）心臓肥大、心不全、または心筋梗塞を治療するその可能性は、国際公開第2009/058818号に記載され、これをその全体について参照により本明細書に援用する。本発明による阻害m i R N Aの設計に用いることができるヒトm i R - 2 1のp r e - m i R N A配列（5'から3'）は、

【化6】

UGUCGGGUAG CUUAUCAGAC UGAUGUUGAC UGUUGAAUCU CAUGGCAACA
CCAGUCGAUG GGCUGUCUGA CA

50

である。

【0038】

標的miRNAがmiR-15b、miR-208a、またはmiR-21である場合、本ポリヌクレオチドは、上記のように全て2'OMeまたは2'OMeおよび2'-Fを含んでもよく、5'および3'末端にホスホロチオエートモノホスフェートキャップを含んでもよく、および／または5'および／または3'末端に脱塩基残基を含んでもよく、および／またはホスホロチオエート結合で末端キャップしてもよい。本ポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート末端キャップを任意選択により有することを除き、部分的にホスホロチオエート結合してもよいし、または全てホスホジエステル結合してもよい。アンチセンスポリヌクレオチドは、たとえば約8、約10、約12、約14、約15、約16、約17、または約18ヌクレオチドの長さ（たとえば約14～約18ヌクレオチドの長さ）の短縮された成熟miRNA配列と完全に相補的であってもよい。いくつかの実施態様において、本ポリヌクレオチドは、（成熟miRNAに対して）全長アンチセンス配列を含むか、またはこれからなる（またはこれから本質的になる）。このコンテキストにおいて、「本質的になる」とは、標的に対するポリヌクレオチドの効力および／または特異性に影響がない限り、追加のヌクレオチドを5'末端および／または3'末端に追加してもよく、たとえば、各末端で1～3個のヌクレオチドを追加してもよいことを意味する。

10

【0039】

本ポリヌクレオチドは、図1または以下の表2から選択される配列／構造を有することができる。略記を表3に示す。

20

【表 2】
表 2

miRNA 標的	別名	配列(5'から 3')	長さ
15b	15b_OMe_16_POS	ps-mAmCmCmAmUmGmAmUmGmUmGmCmUmGmCmU-ps	16
15b	15b_Me/F_16_POS	ps-mAfCfCmAfUmGmAfUmGfUmGfCfUmGfCfU-ps	16
15b	15b_OMe_FL_POS	ps-mUmGmUmAmAmAmCmCmAmUmGmAmUmGmUmGmCmUmGmCmUmA-ps	22
15b	15b_Me/F_FL_POS	ps-fUmGfUmAmAmAfCfCmAfUmGmAfUmGfUmGfCfUmGfCfUmA-ps	22
208	208a_OMe_16_POS	ps-mCmUmUmUmUmUmGmCmUmCmGmUmCmUmUmA-ps	16
208	208a_Me/F_16_POS	ps-fCfUfUfUfUfUmGfCfUfCmGfUfCfUfUmA-ps	16
208	208a_OMe_FL_POS	ps-mAmCmAmAmGmCmUmUmUmUmUmGmCmUmCmGmUmCmUmUmAmU-ps	22
208	208a_Me/F_FL_POS	ps-mAfCmAmAmGfCfUfUfUfUfUmGfCfUfCmGfUfCfUfUmAfU-ps	22
21	21_OMe_16_POS	ps-mAmUmCmAmGmUmCmUmGmAmUmAmAmGmCmU-ps	16
21	21_Me/F_16_POS	ps-mAfUfCmAmGfUfCfUmGmAfUmAmAmGfCfU-ps	16
21	21_OMe_FL_POS	ps-mUmCmAmAmCmAmUmCmAmGmUmCmUmGmAmUmAmAmGmCmUmA-ps	22
21	21_Me/F_FL_POS	ps-mFfCmAmAfCmAmFfCmAmGmFfCmFmGmAmFmAmAmGfCmFmA-ps	22

【 0 0 4 0 】

固相合成による修飾ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの合成は周知であり、New Chemical Methods for Synthesizing Polynucleotides. Caruthers MH. Beaucage SL. Efcavitch JW, Fisher EF. Matteucci MD, Stabinsky Y. Nucleic Acids Symp. Ser. 1980: (7):215-23に概説されている。

【 0 0 4 1 】

組成物、製剤、および送達

本ポリヌクレオチドは、種々の高分子集合体または組成物内に導入してもよい。このような送達のための複合体には、患者への送達のために製剤化される種々のリボソーム、ナノ粒子、およびミセルが含まれてもよい。複合体は、細胞膜浸透を行うために1つまたは

10

20

30

40

50

複数の融合性または親油性分子を含んでもよい。このような分子は、たとえば、米国特許第 7, 404, 969 号および米国特許第 7, 202, 227 号に記載され、これらはその全体について参照により本明細書に援用する。

【0042】

本組成物または製剤は、本明細書に記載のように、各々独立して、複数の治療用ポリヌクレオチドを用いてもよい。たとえば、組成物または製剤は、たとえば表 1、表 2、および図 1 について、上記のように各々独立して、1～5つの miRNA 阻害剤および／または miRNA ミメティクスを用いてもよい。

【0043】

本発明のポリヌクレオチドは、種々の医薬組成物として製剤化することができる。該医薬組成物は、意図する用途に適切な形態で調製されるであろう。一般に、これは、発熱原およびヒトまたは動物に有害となり得る他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することを包含する。例示的な送達／製剤系は、コロイド分散系、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビード、脂質ベース系、たとえば、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含む。本発明の核酸を心臓および骨格筋組織に送達するのに好適な市販の脂肪エマルジョンには、Intra 脂質（登録商標）、Liposyn（登録商標）、Liposyn（登録商標）II、Liposyn（登録商標）III、Nutrilipid、および他の類似の脂質エマルジョンが含まれる。in vivo での送達運搬体としての使用に好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち人工膜小胞）である。そのような系の調製および使用は、当業界において周知である。例示的な製剤は、米国特許第 5, 981, 505 号；米国特許第 6, 217, 900 号；米国特許第 6, 383, 512 号；米国特許第 5, 783, 565 号；米国特許第 7, 202, 227 号；米国特許第 6, 379, 965 号；米国特許第 6, 127, 170 号；米国特許第 5, 837, 533 号；米国特許第 6, 747, 014 号；および国際公開第 03/093449 号に開示され、これらはその全体について参照により本明細書に援用する。

【0044】

本医薬組成物および製剤は、送達運搬体を安定にし、標的細胞による取り込みを可能とするための適切な塩および緩衝剤を用いてもよい。本発明の水性組成物は、薬学的に許容可能な担体または水性媒体に溶解または分散された、阻害剤としてのポリヌクレオチドまたは miRNA ポリヌクレオチド配列（たとえばリポソームまたは他の複合体）を含む送達運搬体を有効量含む。「薬学的に許容可能な」または「薬理学的に許容可能な」とは、動物またはヒトに投与したときに副作用、アレルギー、または他の有害な反応を生じない分子部分および組成物をいう。本明細書に用いられる「薬学的に許容可能な担体」には、医薬、たとえばヒトへの投与に好適な医薬の製剤化での使用に許容される 1 つまたは複数の溶剤、緩衝剤、液剤、分散媒体、コーティング剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤などが含まれてもよい。医薬活性物質のためのこのような媒体および剤の使用は、当業界において周知である。補充活性成分も組成物に含ませることができる。

【0045】

本発明の医薬組成物の投与または送達は、その経路によって標的組織が利用可能である限り、任意の経路とすることができる。たとえば、投与は、皮内、皮下、筋内、腹腔内または静脈内注入であってもよいし、または標的組織（たとえば心臓組織）への直接注入によるものであってもよい。miRNA 阻害剤または miRNA 配列を含む発現構築物を含む医薬組成物は、カテーテル系または治療剤を心臓へ送達するための冠循環を同定する系によって投与することもできる。心臓および冠血管系に治療剤を送達するための種々のカテーテル系は、当業界で公知である。カテーテルをベースとした送達方法または本発明での使用に好適な冠状同定（coronary isolation）法のいくつかの非限定的な例は、米国特許第 6, 416, 510 号、米国特許第 6, 716, 196 号、米国特許第 6, 953, 466 号、国際公開第 2005/082440 号、国際公開第 2006/089340 号、米国特許公開第 2007/0203445 号、米国特許公開第 2006/0148742 号、および米国特許公開第 2007/0060907 号に記載され、これらはその全

体について参照により本明細書に援用する。

【0046】

本組成物または製剤は、非経口投与してもよいし、または腹腔内投与してもよい。例示のため、遊離塩基または薬理学的に許容可能な塩としての接合体の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合される水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中、ならびに油中で調製してもよい。通常の貯蔵および使用状態下では、これらの調製は、微生物の成長を妨げるための防腐剤を一般に含む。

【0047】

注入可能な使用またはカテーテル送達に好適な医薬形態には、たとえば、無菌の水溶液または分散液、および注入可能な無菌の溶液または分散液を即時調製するための無菌粉末が含まれる。一般に、これらの調製は、注入が容易になる程度まで無菌かつ流動的とする。製剤は、製造および貯蔵状態で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して予防される必要がある。適切な溶剤または分散媒体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物油を含んでもよい。適切な流動性は、たとえば、レクチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合には必要な粒子サイズの保持により、および界面活性剤の使用により、保持することができる。微生物の働きは、種々の抗菌剤、抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって予防される。多くの場合、糖または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注入可能な組成物の吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収遅延剤を組成物中で使用することによって延ばすことができる。

【0048】

注入可能な無菌溶液は、所望する場合には任意の他の成分（たとえば、上記で列挙したもの）とともに接合体を適切な量で溶媒中に入れることによって調製することができる。一般に、分散液は、種々の無菌化活性成分を、塩基性分散媒体および所望の他の成分（たとえば上記のもの）を含む無菌運搬体に入れることによって調製する。注入可能な無菌溶液を調製するための無菌粉末の場合、その好ましい調製方法には真空乾燥技術および凍結乾燥技術が含まれ、これは、予め無菌ろ過した溶液由来の活性成分および所望する任意の追加成分の粉末を生成する。

【0049】

製剤化に際し、溶液は、投与製剤に適合するように、かつ、治療に有効な量で投与することが好ましい。製剤は、種々の剤形、たとえば、注入可能な溶液、薬物放出カプセルなどで容易に投与することができる。たとえば、水溶液での経口投与のため、溶剤は一般に好適に緩衝化され、液体希釈剤は十分な生理食塩水またはグルコースなどで最初に等張化する。そのような水性溶剤は、静脈内、筋内、皮下、および腹腔内投与などに用いることができる。無菌水性媒体は、当業者に知られているようにして使用すること、特に本開示に照らして使用することが好ましい。例示として、単一用量をNaCl等張溶液1mlに溶解し、皮下注入液1000mlに添加するか、または予定の注入部位で注入してもよい（たとえば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 第15版、第1035～1038頁および第1570～1580頁を参照のこと）。治療対象の病状に応じて用量を変えることは必然的に必要となるであろう。いずれにしても、投与責任者が個々の対象に適切な用量を決定するであろう。さらにヒト投与のためには、製剤は、FDA部局生物学基準によって要求される無菌性、発熱原性、一般的な安全性、および純度の基準を満たす必要がある。

【0050】

治療方法

本発明は、ポリヌクレオチドを哺乳類細胞に送達する方法、および哺乳類患者の病状の進行を治療、改善、または予防する方法を提供する。本方法は、一般に、本明細書に記載

のとおり、ポリヌクレオチドまたはこれを含む組成物を哺乳類患者に投与することを含む。本ポリヌクレオチドは、上述のように、（たとえば、miRNA発現または活性を阻害するように設計されたヌクレオチド配列を有する）miRNA阻害剤またはmiRNAミメティックであってもよい。したがって、患者は、miRNA発現などのRNA発現に関係する病状を有してもよい。そのような病状には、たとえば、心臓肥大、心筋梗塞、心不全（たとえば鬱血性心不全）、血管傷害、再狭窄、または病的な心臓線維症が含まれる。したがって、本発明は、このような病状を治療するための、および上記のこのような治療のための医薬を調製するための、本発明の修飾ポリヌクレオチドおよび組成物の使用を提供する。

【0051】

10

心臓肥大、心筋梗塞、心不全（たとえば鬱血性心不全）、血管傷害、再狭窄、および／または病的な心臓線維症などの病状に關与するmiRNA、およびmiRNA機能を標的化する配列は、国際公開第2008/016924号、国際公開第2009/058818号、国際公開第2009/018492、国際公開第2009/018493号、国際公開第2009/012468号、国際公開第2009/062169号、および国際公開第2007/070483号に記載され、これらは各々、その全体について参照により本明細書に援用される。このようなmiRNAおよび配列はさらに表1に列記され、これらの配列に基づく修飾ポリヌクレオチドは表2および図1に示され、本明細書に記載される。

【0052】

20

ある種の実施態様において、患者は、長期の制御不能な高血圧、不修正（uncorrected）心臓弁膜症、慢性狭心症、亜急性心筋梗塞、心疾患の先天性素因、および病的な肥大などを含む1つまたは複数のリスク要因を有する。あるいは、またはさらに、患者は、心臓肥大などの遺伝的素因を有すると診断されていてもよいし、または心臓肥大などの家族歴を有していてもよい。

【0053】

この態様において、本発明は、心不全または心臓肥大を患う患者における運動耐性の向上、少ない入院、より高い生活の質、罹患率の低下、および／または死亡率の低下をもたらすことができる。

【0054】

30

本発明は、以下のさらなる実施例によってさらに例示するが、これらは限定するものと解すべきではない。当業者は、本開示に照らして、開示された特定の実施態様について多くの変更が可能であり、また、本発明の真意および範囲から逸脱せずに、同様のまたは類似の結果が得られることを理解するであろう。

【実施例】

【0055】

miRNA、miR-15bを標的化するmiRNA阻害剤（一本鎖オリゴヌクレオチド）の一群を合成した。配列および修飾様式を、略記とともに以下の表3に示す。

【表 3】

表 3. 化学最適化スクリーニングのために合成した分子のリスト

ヌクレオチド単位 または修飾	略記	ヌクレオチド単位 または修飾	略記
リボ A	rA	リボ A P=S	rAs
リボ G	rG	リボ G P=S	rGs
リボ C	rC	リボ C P=S	rCs
リボ U	rU	リボ U P=S	rUs
O-メチル A	mA	O-メチル A P=S	mAs
O-メチル G	mG	O-メチル G P=S	mGs
O-メチル C	mC	O-メチル C P=S	mCs
O-メチル U	mU	O-メチル U P=S	mUs
フルオロ C	fC	フルオロ C P=S	fCs
フルオロ U	fU	フルオロ U P=S	fUs
デオキシ A	dA	デオキシ A P=S	dAs
デオキシ G	dG	デオキシ G P=S	dGs
デオキシ C	dC	デオキシ C P=S	dCs
デオキシ T	dT	デオキシ T P=S	dTs
LNA A	IA	LNA A P=S	IAs
LNA G	IG	LNA G P=S	IGs
LNA C	IC	LNA C P=S	ICs
LNA T	IT	LNA T P=S	ITs
ホスフェート	p		
ホスホロチオエート モノホスフェート	ps		
別記号			
全長	FL		
全ての他の PS 結合	EO		
ホスホロチオエート 結合	PS		
PS 結合による 末端キャップ	EC		
5'および 3'ホスホロ チオエートモノホスフ エート	POS		
ホスホジエステル結合	PO		

3つの異なる長さの逆相補RNA阻害剤を、成熟miR15-b、8nt、16nt、および全長(22nt)に対して合成した。この実施例における化学修飾は、2'-OMe、2'-F、2'-デオキシ、ホスホロチオエート結合、およびLNAが含まれ、これらを特定のモチーフにおいて組み合わせた。モチーフは、いずれかの側の2つの塩基間にホスホロチオエート結合を含むものであった(ホスホロチオエート末端キャップした)。追加修飾は、脱塩基を有する末端キャップ(本明細書に記載のように、5'末端の5'-5'リン酸結合および/または3'末端の3'-3'リン酸結合を有する逆脱塩基モチーフ)または3'および5'末端の両端のホスホロチオエートモノホスフェートを有するものであった。

【0057】

10

合成したポリヌクレオチドの構造を図1に示す。

【0058】

実施例1: *in vitro*でのmiR15-bの阻害

HeLa細胞において、10nMおよび0.1nMの2つの濃度で一群を試験した。デュアルルシフェラーゼアッセイで読み出した。本アッセイはmiRNAの阻害を直接に試験するものではなく、miRNAの阻害効果はウミシイタケルシフェラーゼの増加として示される。第2のルシフェラーゼ(ホタル)は、miRNAの阻害によって影響はなく、内部コントロールとして用いる。ルシフェラーゼ比の値が大きくなるほど、阻害剤の効力は良くなる。Vermeulen A, et al, Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function RNA 13:723-730 (2007)を参照のこと。スクリーニングの結果を図2に示す。

20

【0059】

図2は、長さ(16merおよび全長)によってグループ分けした結果である。1つの注目すべき化学モチーフは、ホスホロチオエートモノホスフェートを有する2'-OMeであった。

【0060】

図3は、ホスホジエステルまたはホスホロチオエート骨格と直接比較したホスホロチオエートモノホスフェートについて示している。「全長」の阻害剤に関し、10nm濃度では比較物と等しいが、0.1nM濃度では非常により効力があることが明らかである。16merの長さに関し、ホスホロチオエートモノホスフェートを有しない阻害剤は活性をあまり示さない。全てホスホロチオエートの分子が効力を有しているといえないことも注目すべきである。したがって、この末端キャップ化方法は、効力に対して有意に寄与していると考えられる。

30

【0061】

スクリーニングから得られる14個の最も優れた性能の阻害剤をIC50測定に対して選択し、これらを表4に列記する。

【表 4】

表 4

最も性能が良い化学物質
15b_OMe_16_脱塩基
15b_OMe_16_POS
15b_Me/F_16_POS
15b_LNA_16_PO
15b_LNA_16_PS
15b_LNA_16_PS_EO
15b_OMe_FL_PS_EC
15b_OMe_FL_脱塩基
15b_OMe_FL_POS
15b_Me/F_FL_PO
15b_Me/F_FL_PS_EO
15b_Me/F_FL_脱塩基
15b_Me/F_FL_POS
Tiny_15_8

10

20

【0062】

該分子を100 nM～1 pMの範囲の6つの濃度においてHeLa細胞にトランスフェクトした。48時間後、全RNAを精製し、定量PCRを行ってmiR-15bおよびコントロールRNAのレベルを測定した。IC50を計算し、これを以下の表に示した。末端ホスホロチオエートモノホスフェートを含む分子を表5において太線で列記した。

【表 5】

表 5

		IC50 (nM)	平均平方 による誤差
1	Tiny_15_8	2.28	0.0209
2	15b_LNA_16_PS	0.00	0.0001
3	15b_LNA_16_PS_EO	0.00	0.0002
4	15b_LNA_16_PO	0.12	0.0004
5	15b_OMe_16_脱塩基	0.17	0.0159
6	15b_OMe_16_POS	0.08	0.0100
7	15b_Me/F_16_POS	1.04	0.0333
8	15b_OMe_FL_脱塩基	0.06	0.0037
9	15b_OMe_FL_POS	0.01	0.0036
10	15b_Me/F_FL_PO	0.13	0.0125
11	15b_Me/F_FL_POS	0.18	0.0051
12	15b_Me/F_FL_脱塩基	0.86	0.0090
13	15b_Me/F_FL_PS_EO	0.03	0.0022
14	15b_OMe_FL_PS_EC	0.06	0.0039

【0063】

実施例 2：in vivoでのmiR-15bの阻害

miR-15bを標的とする10個の阻害剤（表5のポリヌクレオチド5～14）を合成し、miR-15bレベルへの影響について健常なマウスで試験した。尾静脈の低圧注射によりマウス（n=4）に80mg/kgを投与し、miR-15bレベルについて4日後に組織を分析した。肝臓および心臓の両方を分析し、生理食塩水を注射したマウスとデータ比較した。

【0064】

肝臓および心臓の両方において、ホスホロチオエートモノホスフェートキャップ（POS）を有する阻害剤は、miR-15bの強い阻害を示した（図4を参照のこと）。内部ホスホロチオエート結合またはコレステロール接合体のいずれも有しないこれらの分子が心臓でこのような効果を示すことが可能であり、これは非常に驚くべきことであった。

【0065】

これらの実験は、miRNA阻害剤の効力を高める特有の修飾モチーフがあることを実証している。2' OMe修飾を有するすべてホスホジエステル結合した分子はホスホロチオエート結合を有する分子よりも効果が低いため、ヌクレアーゼ安定性は重要な指標となり得る。1つの例外は、脱塩基ヌクレオシドまたは末端ホスホロチオエートモノホスフェートで末端がキャップされた場合であると考えられる。16merでさえ、この末端キャップを有する分子は80pMのIC50を有する一方、全長ポリヌクレオチドは180pMのIC50を有する。この修飾様式：末端ホスホロチオエートモノホスフェートを有する2' OMeポリヌクレオチドは、特有のモチーフである。

【0066】

実施例 3：miR-208aの阻害

全長および16merのmiR-208阻害剤を調製し、新生児ラット心筋細胞においてトランスフェクションから48時間後にbMHCの発現（定量PCRによって決定した）によって試験した。阻害剤を100nMおよび1nMで試験した。

【0067】

試験した阻害剤は、全て2'OMe；2'OMeとしてAおよびGが修飾され、かつ、2'-FとしてCおよびUが修飾され；デオキシAおよびG、かつ、2'OMe CおよびUのいずれかとして修飾された2'位を含むものであった。キャップ構造は、脱塩基およびホスホロチオエートモノホスフェートキャップを含むものであった。

【0068】

miR-208は、心臓ストレスに応じたbMHC発現のアップレギュレーションおよび心臓における速骨格筋遺伝子の抑制に必要である。国際公開第2009/018492号および国際公開第2008/016924号を参照のこと（これらの各々を参照により本明細書に援用する）。

10

【0069】

結果を図5に示す。示されるように、末端キャップを有する2'修飾ポリヌクレオチドは、1nMの濃度でもmiR-208a阻害効果を有する。

【0070】

実施例4：miR-21の阻害

【0071】

デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて、miR-21阻害剤（末端キャップされたもの）を100nMで、HeLa細胞において*in vitro*試験を行った。結果を図6に示す。示されるように、脱塩基部分末端キャップを有するかまたはホロチオエートモノホスフェートで末端キャップされた、全て2'OMeを有する阻害剤が、特に有効である。

20

【0072】

miR-15b、miR208、およびmiR-21阻害剤に関する以下の表6に示すポリヌクレオチドを合成した。

【表 6】
表 6

miRNA 標的	別名	配列(5'から 3')	長さ
15b	15b_OMe_16_POS	ps-mAmCmCmAmUmGmAmUmGmUmGmCmUmGmCmU-ps	16
15b	15b_Me/F_16_POS	ps-mAfCfCmAfUmGmAfUmGfUmGfCfUmGfCfU-ps	16
15b	15b_OMe_FL_POS	ps-mUmGmUmAmAmAmCmCmAmUmGmAmUmGmUmGmCmUmGmCmUmA-ps	22
15b	15b_Me/F_FL_POS	ps-fUmGfUmAmAmAfCfCmAfUmGmAfUmGfUmGfCfUmGfCfUmA-ps	22
208	208a_OMe_16_POS	ps-mCmUmUmUmUmUmGmCmUmCmGmUmCmUmUmA-ps	16
208	208a_Me/F_16_POS	ps-fCfUfUfUfUfUmGfCfUfCmGfUfCfUfUmA-ps	16
208	208a_OMe_FL_POS	ps-mAmCmAmAmGmCmUmUmUmUmUmGmCmUmCmGmUmCmUmUmAmU-ps	22
208	208a_Me/F_FL_POS	ps-mAfCmAmAmGfCfUfUfUfUfUmGfCfUfCmGfUfCfUfUmAfU-ps	22
21	21_OMe_16_POS	ps-mAmUmCmAmGmUmCmUmGmAmUmAmAmGmCmU-ps	16
21	21_Me/F_16_POS	ps-mAfUfCmAmGfUfCfUmGmAfUmAmAmGfCfU-ps	16
21	21_OMe_FL_POS	ps-mUmCmAmAmCmAmUmCmAmGmUmCmUmGmAmUmAmAmGmCmUmA-ps	22
21	21_Me/F_FL_POS	ps-mFfCmAmAfCmAmFfCmAmGmFfCmFmGmAmFmAmAmGfCmFmA-ps	22

10

20

30

【0073】

実施例 5: *in vivo*でのmiR-15b阻害剤の組織分布

【0074】

miR-15bの4つの阻害剤(表7)を合成し、マウスに注射し、その組織生体分布を評価した。マウスをヒトアンギオテンシンII(AngII)で処置し、背面において皮下挿入した浸透圧ポンプにより投与した。AngII処理の7日後、マウスに1×0.33mg/kg、1×1mg/kg、1×3.3mg/kg、1×33mg/kg、または3×0.33mg/kgのいずれかで投与した。最後の投与量は、その後の3日間、0.33mg/kgでマウスに投与したことを示している。動物を4日目に犠牲死させ、生体分布アッセイのために組織を処理した。投与計画の間、AngII処理を続けた。

40

【0075】

表7は、本実験で用いた各オリゴの配列および特定の修飾を列記している。化合物10134は、LNA、2'デオキシヌクレオチド、および全て(full)ホスホロチオエート骨格からなるものであった。化合物10115は、2'OMe修飾および全てホスホロチオエート骨格からなるものであった。化合物10623は、2'OMe修飾、全てホスホ

50

ロチオエート骨格、ならびに 3' および 5' ホスホロチオエートモノホスフェートからなるものであった。化合物 10624 は、2' OMe 修飾、互換性のホスホロチオエート結合およびホスホジエステル結合、ならびに 3' および 5' ホスホロチオエートモノホスフェートからなるものであった。

【表 7】

表 7

化合物#	別名	配列(5'から 3')	長さ
10134	15b_DNA_LNA_16_PS	lAs;dCs;dCs;lAs;lTs;dGs;lAs;lTs;dGs;lTs;lGs;dCs;dTs;lGs;dCs;lT	16
10623	15b_OMe_16_PS_POS	ps;mAs;mCs;mCs;mAs;mUs;mGs;mAs;mUs;mGs;mUs;mGs;mCs;mUs;mGs;mCs;mUs;p	16
10624	15b_OMe_16_PSEO_POS	ps;mAs;mC;mCs;mA;mUs;mG;mAs;mU;mGs;mU;mGs;mC;mUs;mG;mCs;mUs;p	16
10116	15b_OMe_16_PS	mAs;mCs;mCs;mAs;mUs;mGs;mAs;mUs;mGs;mUs;mGs;mCs;mUs;mGs;mCs;mU	16

10

【0076】

図 7 は、心臓、肝臓、腎臓、および肺における阻害剤の蓄積を示している。キャップした 2' OMe オリゴとキャップしない 2' OMe オリゴとを比較すると、全ての器官に送達された阻害剤の量は、POS 修飾でキャップした場合により高いことが多い。1 × 0.33 mg/kg の最小投与量で、効果が最も高くなる。腎臓への送達は、全ての 4 つの修飾様式でほとんど等しい。修飾された全てホスホロチオエート骨格はまた、全ての他の修飾と比較して、心臓、肝臓、および肺でより高い送達を示している。

20

【0077】

本明細書で議論され引用された全ての公開公報、特許公報、および特許出願は、その全体について参照により援用する。開示した発明は、記載された特定の方法論、プロトコル、および材料（これらは変わり得るものであるゆえ）に限定されるものではないと理解する。また、本明細書で用いた用語は、単に特定の実施態様を記述する目的のものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではなく、該本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるものと理解する。

30

【0078】

当業者は、ルーチンにすぎない実験を用いて、本明細書に記載される本発明の特定の実施態様の多数の等価物を認識または確認することが可能であろう。このような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【0079】

参考文献

以下の参考文献は、全ての目的のため、その全体について参照により本明細書に援用する。

40

B. Sproat et al., Nucleic Acids Research 17: 3373-3388 (1989).

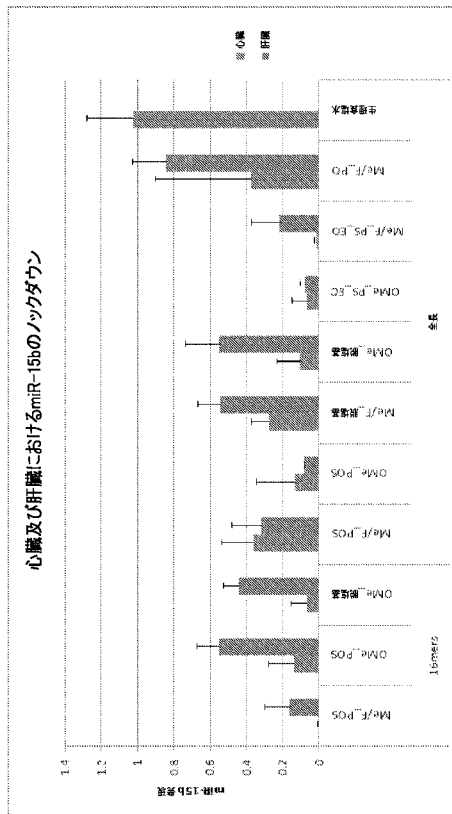
E. L Ruff et al., Journal of Organic Chemistry, 61: 1547-1550 (1998).

H. Cramer et al., Helvetica Chimica Acta, 79: 21 14-2138 (1996).

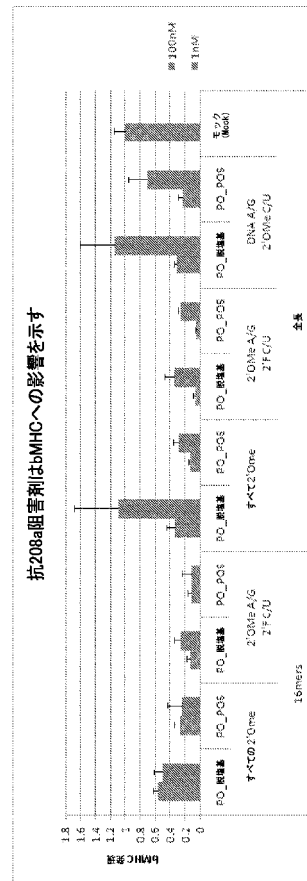
Vermeulen A, et al., RNA 13:723-730 (2007),

米国特許第 5, 998, 203 号

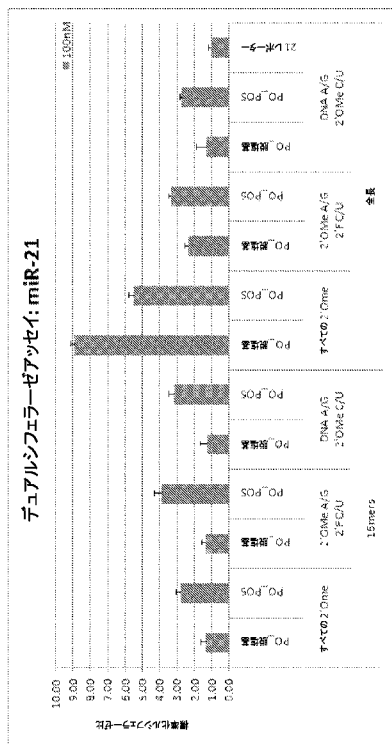
【図 4】



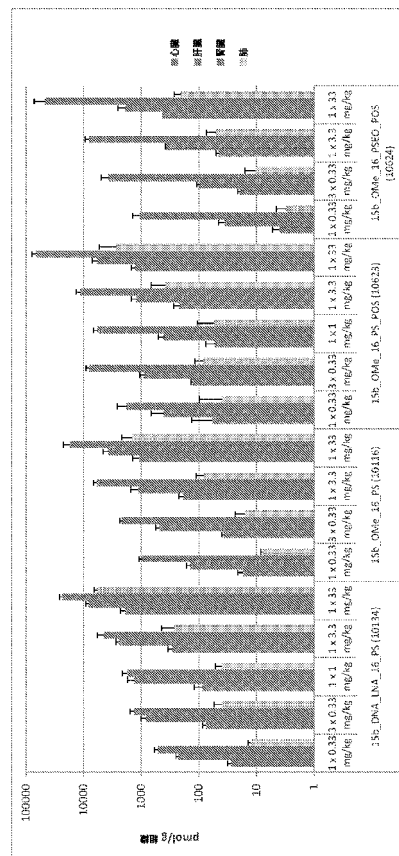
【圖 5】



【図 6】



【 図 7 】



【配列表】

2012529295000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年2月8日(2012.2.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

約10個以下のポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであって、成熟miR15bと相補的なアンチセンス配列を含み、miR15bの阻害に有効であり、1つまたは複数の内部ホスホロチオエート結合および1つまたは複数のロックド核酸残基を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項2】

成熟miR15bと少なくとも約75%相補的である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

約8以下のポリヌクレオチドであり、成熟miR15bと100%相補的である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

全てホスホロチオエート結合している、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

少なくとも1つの末端ホスホロチオエートモノホスフェートを含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

全てロックド核酸残基からなる、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

5'-GTGCTGCT-3'配列を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

5'-GTGCTGCT-3'配列からなり、全てホスホロチオエート結合し、全てロックド核酸からなる、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドおよび薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項10】

コロイド分散系、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビード、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、またはリポソームとして製剤化される、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

皮内送達、皮下送達、筋内送達、腹腔内送達、または静脈内送達用に製剤化される、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項12】

心臓カテーテル系による投与用に製剤化される、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項13】

miRNA発現に関連する病状を有する患者の治療に使用するための請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項14】

前記病状が、心臓肥大、心筋梗塞、心不全、血管傷害、および病的な心臓線維症のうちの

1つまたは複数である、請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記組成物が心臓カテーテルによって投与される、請求項13または14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

2'位に1つまたは複数のヌクレオチド修飾および少なくとも1つの末端キャップ構造を有するポリヌクレオチドであって、miRNAまたはmiRNAアンチセンスヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項17】

5～25のポリヌクレオチドの長さである、請求項16に記載のポリヌクレオチド。

【請求項18】

請求項16または17に記載のポリヌクレオチドおよび薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項19】

miRNA発現に関連する病状を有する患者の治療に使用され、前記病状が、心臓肥大、心筋梗塞、心不全、血管傷害、および病的な心臓線維症のうちの1つまたは複数である、請求項18に記載の医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/37821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07H 21/04; C12N 15/11 (2010.01) USPC - 536/24.5; 514/44A According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC 536/24.5 514/44A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google Scholar: miRNA 2' modification terminal cap abasic, phosphorothioate monophosphate		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0287383 A1 (QUAY et al.), 20 November 2008 (20.11.2008); para [0037], [0106]	1-3
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 September 2010 (01.09.2010)		Date of mailing of the international search report 08 SEP 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/37821

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	

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

Fターム(参考) 4C084 AA13 MA22 MA24 MA37 MA38 MA55 MA66 MA67 NA14 ZA361
 ZA371 ZA441
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA22 MA24 MA37 MA38 MA55
 MA66 MA67 NA14 ZA36 ZA37 ZA44