

(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2010-526797

(P2010-526797A)

(43) 公表日 平成22年8月5日(2010.8.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 21/02 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	4 C 0 5 7
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-506953 (P2010-506953)	(71) 出願人	596124151
(86) (22) 出願日	平成20年5月9日 (2008.5.9)		エンゾン ファーマシューティカルズ、イ
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月6日 (2010.1.6)		ンコーポレーテッド
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/055779		アメリカ合衆国 08807 ニュージャ
(87) 国際公開番号	W02008/138904		ージー州、ブリッジウォーター、ルート
(87) 国際公開日	平成20年11月20日 (2008.11.20)		202/206 685
(31) 優先権主張番号	60/917, 392	(71) 出願人	504013269
(32) 優先日	平成19年5月11日 (2007.5.11)		サンタリス ファーマ アー／エス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		SANTARIS PHARMA A/S
(31) 優先権主張番号	61/023, 250		デンマーク、デーコー 2970ヘルスホ
(32) 優先日	平成20年1月24日 (2008.1.24)		ルム、コーレ・アレー6番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER3のモジュレーションのためのRNAアンタゴニスト化合物

(57) 【要約】

本発明は、細胞中のHER3 mRNAを標的とし、HER3および／またはHER2および／またはEGFRの発現の低下につながるオリゴマー化合物（オリゴマー）に関する。HER3および／またはHER2および／またはEGFR発現の低下は、広範囲の医学的障害、例えば癌を含む過剰増殖性疾患のために有益である。本発明は、オリゴマーを含有する治療的組成物、および、治療方法を含む、該オリゴマーを使用してHER3および／またはHER2および／またはEGFRの発現をモジュレートするための方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

合計して10～24個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む、長さが10～25個の核酸塩基のオリゴマーであって、i)該連続核酸塩基配列が配列番号211および配列番号200よりなる群から選択される配列の対応領域に対して100%相同であるか；またはii)該連続核酸塩基配列が配列番号211および配列番号200よりなる群から選択される配列の対応領域に対して1個以下のミスマッチを含む、該オリゴマー。

【請求項 2】

合計して10～50個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む、長さが10～50個の核酸塩基のオリゴマーであって、該連続核酸塩基配列が哺乳動物HER3遺伝子もしくはmRNA、例えば配列番号197または天然に生じるその変異体に対応する領域に対して少なくとも80%相同である、上記オリゴマー。

10

【請求項 3】

連続核酸塩基配列が、配列番号200～227、配列番号1～140、および配列番号228～233よりなる群から選択される配列、例えば配列番号1、54、200、および211よりなる群から選択される配列に対応する領域に対して少なくとも80%相同である、請求項1または2記載のオリゴマー。

【請求項 4】

連続核酸塩基配列が、配列番号197の対応領域とミスマッチを含まないか、または1もしくは2個以下のミスマッチを含む、請求項1～3のいずれか1項記載のオリゴマー。

20

【請求項 5】

オリゴマーの核酸塩基配列が連続核酸塩基配列からなる、請求項1～4のいずれか1項記載のオリゴマー。

【請求項 6】

連続核酸塩基配列が長さ10～18ヌクレオチドである、請求項1～5のいずれか1項記載のオリゴマー。

【請求項 7】

連続核酸塩基配列がヌクレオチド類似体を含む、請求項1～6のいずれか1項記載のオリゴマー。

【請求項 8】

ヌクレオチド類似体が、糖修飾ヌクレオチド、例えばロックされた核酸 (Locked Nucleic Acid) (LNA) 単位；2'-O-アルキル-RNA単位、2'-OMe-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、および2'-フルオロ-DNA単位よりなる群から選択される糖修飾ヌクレオチドである、請求項7記載のオリゴマー。

30

【請求項 9】

ヌクレオチド類似体がLNAである、請求項7記載のオリゴマー。

【請求項 10】

ギャップマー (gapmer) である、請求項7～9のいずれか1項記載のオリゴマー。

【請求項 11】

HER3遺伝子またはmRNAを発現している細胞においてHer-3遺伝子またはmRNAの発現を阻害する、請求項1～10のいずれか1項記載のオリゴマー。

40

【請求項 12】

上記オリゴマーが配列番号169～196および234、例えば配列番号169および180よりなる群から選択される、請求項1～11のいずれか1項記載のオリゴマー。

【請求項 13】

請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、および該オリゴマーに共有結合した少なくとも1個の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分を含むコンジュゲート。

【請求項 14】

請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲート、および製薬上許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含有する医薬組成物。

50

【請求項 15】

癌等の過剰増殖性障害の治療のため等の医薬としての使用のための、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

癌等の過剰増殖性障害の治療のための医薬の製造のための、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲートの使用。

【請求項 17】

癌等の過剰増殖性障害の治療方法であって、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲート、または請求項14記載の医薬組成物を、癌等の過剰増殖性障害に罹患しているか、または罹患する可能性のある患者に投与することを含む、該方法。

10

【請求項 18】

HER3を発現している細胞におけるHER3の阻害方法であって、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲートを該細胞に投与して該細胞におけるHER3を阻害することを含む、該方法。

【請求項 19】

(HER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFRを発現している)細胞または組織におけるHER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFRの発現を低減または阻害する方法であって、該細胞または組織を、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲート、または請求項14記載の医薬組成物と接触させる工程を含み、それによってHER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFRの発現が低減または阻害される、該方法。

20

【請求項 20】

癌細胞等の細胞におけるアポトーシスを誘発する方法であって、該細胞もしくは組織を、請求項1～12のいずれか1項記載のオリゴマー、または請求項13記載のコンジュゲート、または請求項14記載の医薬組成物と接触させる工程を含み、それによってHER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFRの発現が阻害または低減されるか、および/またはアポトーシスが誘発される、該方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、細胞中のHER3 mRNAを標的とし、HER3発現の減少を導くオリゴマー化合物(オリゴマー)に関する。HER3発現の減少は、様々な医学的障害、例えば癌を含む過剰増殖性疾患にとって有益である。本発明は、オリゴマーを含有する治療用組成物、および、治療方法を含め、該オリゴマーを用いてHER3発現をモジュレートするための方法を提供する。

【0002】

関連出願

以下の関連出願：米国特許出願第60/917,392号および米国特許出願第61/023,250号を参照により本明細書に組み入れる。

40

【背景技術】

【0003】

HER3は、4種の異なる受容体：ErbB-1(EGFR、HER1)、ErbB-2(neu、HER2)、ErbB-3(HER3)およびErbB-4(HER4)を含む受容体チロシンキナーゼErbBファミリーに属している(Yarden 等, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2001, 2(2):127-137)。このファミリーの受容体タンパク質は、細胞外のリガンド結合ドメイン、疎水性の膜貫通ドメイン、および細胞質のチロシンキナーゼ含有ドメインから構成されている。EGFファミリーの増殖因子はほとんどのErbB受容体に結合し、これらを活性化する。Her-3(ErbB3)はチロシンキナーゼ活性の欠損を特徴とする。EGFR、HER2、および最近になってHER3は、腫瘍形成と関連付けられている。例えば、近年の研究により、EGFRが、正常組織の対応物と比較して、多くの

50

ヒトの悪性組織で過剰発現していることが示された。EGFRをコードする遺伝子の過剰発現、増幅、欠失および構造的再配列は、脳腫瘍の生検で高い発生率で見出されている。多形性膠芽腫の腫瘍におけるEGFR遺伝子の増幅は、最も一貫した公知の遺伝的変化の一つである。ErbB-3 mRNAレベルの上昇はヒトの乳癌で検出されている。近年、チロシンキナーゼ阻害剤を使用してHer2およびEGFRチロシンキナーゼ活性を阻害すると、補償的なHER3発現の上昇およびそれに続くPI3K/Akt経路を通じたシグナル伝達のために、HER2-誘因性の乳癌に対して限定的効果が示されることが示された（Sergina等，Nature，2007，445:437-441）。

【0004】

HER3機能を効果的に阻害することができる薬剤に対して需要がある。

10

【発明の概要】

【0005】

本発明は、合計10～50個の核酸塩基、または10～30個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む、長さが10～50個の核酸塩基、例えば10～30個の核酸塩基のオリゴマーであって、上記連続核酸塩基配列が、哺乳動物HER3遺伝子もしくはmRNA、例えば配列番号197、または天然に生じるその変異体の対応する領域に対して少なくとも80%相同である、上記オリゴマーを提供する。

【0006】

本発明は、合計10～50個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む、長さが10～50個の核酸塩基のオリゴマーであって、上記連続核酸塩基配列が、配列番号200～227よりなる群から選択される核酸配列の対応領域に対して少なくとも80%相同である、上記オリゴマーを提供する。

20

【0007】

本発明は、合計10～50個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含む、長さが10～50個の核酸塩基のオリゴマーであって、上記連続核酸塩基配列が、配列番号1～140および228～233よりなる群から選択される核酸配列の対応領域に対して少なくとも80%相同である、上記オリゴマーを提供する。

【0008】

本発明は更に、本発明に係るオリゴマーを含むコンジュゲート、例えばオリゴマーの核酸塩基配列に加えて、本発明のオリゴマーに共有結合した少なくとも1個の非ヌクレオチド（すなわち非核酸塩基）または非ポリヌクレオチド部分を含むコンジュゲートを提供する。非ヌクレオチド/非核酸塩基または非ポリヌクレオチド部分は、コレステロール等のステロール基、または細胞中への侵入を容易にする他の部分から構成されるか、これを含み得る。

30

【0009】

本発明は、本発明に係るオリゴマーを含むコンジュゲート、例えば、オリゴマーの核酸塩基配列に加えて、正に荷電した部分を含むポリマー性コンジュゲート、例えばポリエチレングリコール（PEG）を含むコンジュゲートを提供する - すなわち、本発明に係るオリゴマーは、場合によってPEG化されていても良い。

【0010】

本発明は、本発明に係るオリゴマーまたはコンジュゲート、および製薬上許容される希釈剤、担体、塩もしくはアジュバントを含有する医薬組成物を提供する。

40

【0011】

本発明は、例えば本明細書で言及した1種以上の疾患の治療のための、例えば癌等の本明細書で言及したような過剰増殖性疾患の治療のための医薬として使用するための、本発明に係るオリゴマーまたはコンジュゲートを提供する。

【0012】

本発明は更に、医薬における使用のための、本発明に係るオリゴマーを提供する。

【0013】

本発明は、癌等の本明細書で言及したような過剰増殖性疾患の治療のための医薬の調製

50

もしくは製造のための、本発明に係るオリゴマーまたはコンジュゲートの使用を提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明は、癌等の本明細書で言及したような過剰増殖性疾患を治療する方法であって、本発明に係るオリゴマー、コンジュゲートもしくは医薬組成物を、治療を必要とする患者、例えば癌等の本明細書で言及したような過剰増殖性疾患に罹患しているか、または罹患する可能性のある患者に投与することを含む、上記方法を提供する。

【 0 0 1 5 】

本発明は、HER3を発現している細胞におけるHER3の阻害のための方法であって、本発明に係るオリゴマーまたはコンジュゲートを、該細胞におけるHER3の阻害をもたらすように該細胞に投与することを含む、上記方法を提供する。

10

【 0 0 1 6 】

更に、細胞または組織においてHER3、場合によって更にEGFRおよび／もしくはHER2の発現をダウンレギュレートする方法であって、該細胞または組織をin vitroもしくはin vivoにおいて1種以上の本発明のオリゴマー、コンジュゲートまたは組成物と接触させることを含む、上記方法が提供される。

【 0 0 1 7 】

更に、HER3（および／もしくはEGFRおよび／もしくはHER2）の発現または過剰発現と関連した疾患または状態を有するおそれがあるか、またはその傾向がある動物、哺乳動物もしくはヒトを、該動物またはヒトに治療的もしくは予防的有効量の1種以上の本発明のオリゴマー、コンジュゲートまたは組成物を投与することによって治療する方法が開示される。

20

【 0 0 1 8 】

更に、HER3、および場合によって更にEGFRおよび／もしくはHER2の発現の阻害のため、およびHER3（および／もしくはEGFRおよび／もしくはHER2）の活性と関連した疾患の治療のための、オリゴマーの使用方法が提供される。

【 0 0 1 9 】

本発明は、本明細書で言及するような疾患または障害、例えば癌等の過剰増殖性疾患の治療方法であって、本発明に係るオリゴマー、コンジュゲート、または医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、上記方法を提供する。

30

【 0 0 2 0 】

本発明は、細胞または組織におけるHER3、および場合によって更にEGFRおよび／もしくはHER2の発現を阻害または低減する方法であって、該細胞または組織を、HER3、および場合によって更にEGFRおよび／もしくはHER2の発現が阻害または低減されるように本発明に係るオリゴマー、コンジュゲート、または医薬組成物と接触させる工程を含む、上記方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明は、癌細胞等の細胞におけるアポトーシスの誘発方法であって、該細胞または組織を、HER3、および場合によって更にEGFRおよび／もしくはHER2の発現が阻害もしくは低減され、および／またはアポトーシスが誘発されるように本発明に係るオリゴマー、コンジュゲート、または医薬組成物と接触させる工程を含む、上記方法を提供する。

40

【 0 0 2 2 】

本発明は更に、配列番号1～140および228～233および配列番号200～227よりなる群から選択される配列、例えば配列番号200、211、54および1よりなる群から選択される配列に対応する領域に対して少なくとも80%相同である連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなるオリゴマーを提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明は更に、配列番号169～196および配列番号234から選択される配列、例えば配列番号169または配列番号180中に存在する等価配列に対応する連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなるオリゴマーを提供する。

50

【 0 0 2 4 】

本発明は更に、配列番号169～196および234よりなる群から選択される配列、例えば配列番号169もしくは180を含むか、またはこれよりなるオリゴマー、あるいは上記配列に対応する連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなるオリゴマーを提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 - 1 】 配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139、および140のオリゴヌクレオチド配列にそれぞれ対応するHER3標的配列を太字で下線を引いて示し、HER3転写物中のその位置を示す（Genbank登録番号 NM_001982 - 配列番号197）。

10

【 図 1 - 2 】 図 1 - 1 の続きである。

【 図 2 】 配列番号169-179のトランスフェクション24時間後の15PC3におけるHER3 mRNA発現を示す。

【 図 3 】 配列番号169-179のトランスフェクション24時間後の15PC3におけるEGFR mRNA発現を示す。

【 図 4 】 配列番号169-179のトランスフェクション24時間後の15PC3におけるHER2 mRNA発現を示す。

【 図 5 】 配列番号180-194のトランスフェクション24時間後の15PC3におけるHER3 mRNA発現を示す。

【 図 6 】 データは、5および25nMの濃度のオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされたH UH7細胞において、種々の時点で活性化カスパーゼ3/7として測定したアポトーシスの誘導を示す。結果をモック処理細胞と相対的にプロットする。配列番号235はスクランブルした対照オリゴヌクレオチドである。

20

【 図 7 - 1 】 データは、5および25nMの濃度のオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされたH UH7細胞において、種々の時点でMTSアッセイを使用してOD490で測定した生存細胞を示す。配列番号235はスクランブルした対照オリゴヌクレオチドである。

【 図 7 - 2 】 図 7 - 1 の続きである。

【 図 7 - 3 】 図 7 - 2 の続きである。

【 図 7 - 4 】 図 7 - 3 の続きである。

【 図 8 A 】 データは、25および50mg/kgの配列番号180でq3dx10日間i.v.処理した雌のヌードマウスに移植した15PC3異種移植片の腫瘍における腫瘍体積の変化（％）を示す。生理食塩水で処理したマウスを対照として使用した。

30

【 図 8 B 】 データは、25および50mg/kgの配列番号180でq3dx10日間i.v.処理した雌のヌードマウスに移植した15PC3異種移植片の腫瘍におけるHER3 mRNA発現を示す。結果をGAPDHに対して標準化し、生理食塩水処理対照のパーセンテージ（％）で示す。

【 図 9 】 データは、1または5mg/kgの配列番号180または配列番号234のオリゴヌクレオチドで連続して3日間i.v.処理した後のマウスの肝臓におけるHER3 mRNA発現を示す。結果をGAPDHに対して標準化し、生理食塩水処理対照のパーセンテージ（％）で示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

40

オリゴマー

本発明は、HER3（および／またはEGFRおよび／またはHER2）の発現をモジュレートするための配列、組成物および方法を提供する。特に、本発明は、HER3の発現をダウンレギュレートすることができる対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製するために使用するのにその配列情報が好適な、HER3遺伝子中の標的配列に関する。本発明は更に、HER3をコードする核酸に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（オリゴマー）、およびその医薬調製物、およびHER3発現と関連する疾患、特に癌疾患の治療としてのその使用を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドは、HER3の発現をダウンレギュレートすることが示された。本発明のオリゴヌクレオチドはまた、HER3、および場合によっては更にHER2および／またはEGFRの発現をダウンレギュレートすることが示された。

50

【0027】

本明細書において、用語HER3は、用語ErbB-3と互換可能に使用する。

【0028】

本発明は、哺乳動物のHER3をコードする核酸分子、例えば配列番号197に示すHER3核酸、および哺乳動物のHER3をコードするこのような核酸分子の天然に生じる変異体の機能をモジュレートする上で使用するためのオリゴマー化合物（本明細書においてオリゴマーという）を使用する。

【0029】

本発明の文脈において、用語「オリゴマー」は、2個以上の核酸塩基の共有結合によって形成される分子（すなわちオリゴヌクレオチド）をいう。本明細書において、各々の単独の核酸塩基は、モノマーまたは単位ということもできる。オリゴマーは、長さが10～50個、例えば10～30個の核酸塩基の連続核酸塩基配列からなるか、またはこれを含む。

【0030】

オリゴマーは、天然のヌクレオチド単位、例えばリボ核酸（RNA）もしくはデオキシリボ核酸（DNA）、または好ましくはロックされた核酸（Locked Nucleic Acid）（LNA）を含む核酸類似体、または本明細書において言及するその混合物から構成され得る。従って、天然に生じる核酸塩基、糖、核酸塩基間結合から構成されるオリゴマー、並びに、同様に機能するか、もしくは特定の機能が改善した非天然の核酸塩基を有するオリゴマーを含む。完全もしくは部分的に改変または置換されたオリゴマーは、こうしたオリゴマーのいくつかの望ましい特性、例えば細胞膜透過能、細胞外および/または細胞内のヌクレアーゼに対する高い抵抗性、および核酸標的に対する高い親和性および特異性のために、天然の形態よりも好ましいことがしばしばある。LNA類似体は、例えば上記の特性に関して特に好ましい。従って、非常に好ましい実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体単位、例えばLNA単位の双方から、または種々の分類のヌクレオチド類似体単位から組み立てられ、10～50個、好ましくは10～25個の核酸塩基、より好ましくは10～16個の核酸塩基、そして更により好ましくは12～16個の核酸塩基のオリゴヌクレオチドを形成する。

【0031】

種々の実施形態において、本発明のオリゴマーはRNA（単位）を含まない。本発明に係る化合物は線状分子であるか、または線状分子として合成することが好ましい。オリゴマーは一本鎖分子であり、好ましくは、例えば同じオリゴマー内で等価な領域に相補的な少なくとも3、4または5個の連続核酸塩基の短い領域（すなわち二本鎖）を含まない。この点で、オリゴマーは（本質的に）二本鎖でない。種々の実施形態において、オリゴマーは本質的に二本鎖でなく、例えばsiRNAではない。オリゴマーは連続核酸塩基配列を含むか、またはこれから構成される。種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは完全に連続核酸塩基領域から構成され得る。オリゴマーは連続核酸塩基配列を含むか、またはこれから構成される。種々の実施形態において、オリゴマーの核酸塩基配列は連続核酸塩基配列から構成される。

【0032】

しかしながら、オリゴマーが、典型的には5'または3'末端のいずれかで連続核酸塩基配列にフランキングする更なる核酸塩基配列、または5'および3'末端の双方でフランキングする更なる核酸塩基配列を含み得ることも認識される。好適には、これらの5'および/または3'の「フランキング」領域は長さが1、2、3、4、5、または6個の核酸塩基であり得る。本発明のオリゴマーの末端にあるDNAもしくはRNA核酸塩基は、in vivoで使用した場合に内在性エキソヌクレアーゼによってオリゴマーから切断されることが予測され、フランキングするDNAもしくはRNA単位を含めることでオリゴマーのin vivoにおける性能に影響しない場合がある。このような更なる核酸塩基または塩基は、本明細書でギャップマー（gapmer）オリゴマーの文脈で記載する領域Dと等価であり得る。種々の実施形態において、更なる核酸塩基の1個以上は、in vivoでオリゴマーを安定化する、例えばヌクレアーゼ分解からオリゴマーを保護するヌクレオチド類似体、例えば本明細書に記載したヌクレオ

チド類似体である。

【 0 0 3 3 】

種々の実施形態において、連続核酸塩基配列の3'末端には1、2もしくは3個のDNAまたはRNA単位が隣接する。3'のDNA単位はオリゴマーの固相合成の際に使用されることがしばしばである。同じかもしくは別の種々の実施形態において、連続核酸塩基配列の5'末端には1、2もしくは3個のDNAまたはRNA単位が隣接する。

【 0 0 3 4 】

標的

哺乳動物のHER3は、好ましくはヒトHER3、例えば配列番号197に示す核酸によってコードされるHER3、またはその天然に生じる変異体、例えば対立遺伝子変異体もしくはそのイソ型である。

10

【 0 0 3 5 】

本明細書において使用する用語「標的核酸」は、哺乳動物HER3ポリペプチド（および／もしくはHer2および／もしくはEGFR ポリペプチド）をコードするDNA、すなわちHER3（および／もしくはHer2および／もしくはEGFR）ポリペプチドをコードする核酸、例えば配列番号197等のヒトHER3、または天然に生じるその変異体、および、これらに由来するRNA核酸、好ましくはmRNA、例えばプレ-mRNA、好ましくは成熟mRNAをいう。種々の実施形態において、例えば研究または診断において使用する場合、「標的核酸」は、上記DNAもしくはRNA核酸標的に由来するcDNAまたは合成オリゴヌクレオチドであり得る。本発明に係るオリゴマー化合物は、好ましくは標的核酸にハイブリダイズすることができる。

20

【 0 0 3 6 】

用語「標的核酸」は、種々の実施形態において、例えば配列番号197等の哺乳動物HER3 mRNAであり得る。他の哺乳動物HER3 mRNAの例としては、限定するものではないが、登録番号 NM_010153（マウスHER3 mRNA）；NM_017218（ラットHER3 mRNA）；またはXM_509131（チンパンジーHER3 mRNAと推測されている）のものが挙げられる。

【 0 0 3 7 】

当然のことながら、上記の登録番号はcDNA配列をいうものであり、mRNA配列自体ではないことが認識されるべきである。成熟したmRNA配列は、当然のことながら、チミン(T)残基をウラシル(U)残基で置き換えてcDNA配列から直接導き出すことができる。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する「ハイブリダイゼーション」は、相補的ヌクレオチド/核酸塩基間の水素結合を意味し、これはワトソン-クリック、Hoogsteen、逆Hoogsteen水素結合等であって良い。ワトソンとクリックは、およそ50年前に、デオキシリボ核酸（DNA）が二本鎖から構成され、この二本鎖の中の対になった相補的核酸塩基間で形成される水素結合によってヘリックス構造に保持されていることを示した。DNA中に一般に見られる4種の核酸塩基はグアニン（G）、アデニン（A）、チミン（T）およびシトシン（C）であり、G核酸塩基はCと対になり、そしてA核酸塩基はTと対になる。RNAにおいては核酸塩基チミンは核酸塩基ウラシル(U)と置き換えられ、これはT核酸塩基と同様にAと対になる。標準的な二本鎖の形成に関わる核酸塩基中の化学基はワトソン-クリック面を構成する。Hoogsteenはその2~3年後、プリン核酸塩基（GおよびA）がそのワトソン-クリック面に加え、二重螺旋の外側から認識され、これを利用して水素結合を介してピリミジンオリゴヌクレオチドに結合し、それによって三重螺旋構造を形成することができるHoogsteen面を有することを示した。

30

40

【 0 0 3 9 】

本発明の化合物は、標的核酸、例えばmRNAにハイブリダイズすることができることが非常に好ましい。

【 0 0 4 0 】

好適には、本発明のオリゴマーはHER3遺伝子の発現をダウンレギュレートする等の阻害をすることができる。オリゴマーは、HER3遺伝子を発現しているヒト等の哺乳動物の細胞に導入された場合、好ましくはHER3 mRNAレベルの低下を生じ、その結果、その細胞にお

50

けるHER3の発現レベルが低下する。オリゴマーは、HER3遺伝子を発現している細胞に導入された場合、好ましくはHER3 mRNAレベルの低下を生じ、その結果、その細胞におけるHER3の発現レベルが低下する。ヒト細胞において、HER3はスプライシングの異なる2種のイソ型で存在する（NP_001973.2およびNP_001005915.1、そのアミノ酸および対応する核酸を参照により本明細書に組み入れる）。イソ型1はより長いイソ型であり、mRNA NM_001982によってコードされている（参照により本明細書に組み入れる）。標的mRNAはこの2種の「イソ型」のいずれか、または双方であり得るが、種々の実施形態において、イソ型1をコードするmRNAが標的mRNAである。例えば、配列番号180は双方のイソ型を標的とする。

【0041】

種々の実施形態において、オリゴマーは、HER2遺伝子を発現しているヒト等の哺乳動物の細胞に導入された場合、好ましくはHER2 mRNAレベルの低下を生じ、その結果、その細胞におけるHER2の発現レベルが低下する。

【0042】

種々の実施形態において、オリゴマーは、EGFR遺伝子を発現しているヒト等の哺乳動物の細胞に導入された場合、好ましくはEGFR mRNAレベルの低下を生じ、その結果、その細胞におけるEGFRの発現レベルが低下する。

【0043】

ヒトHER2 mRNAは配列番号199として示す。ヒトEGFR mRNAは配列番号198として示す。

【0044】

種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは標的核酸に結合し、正常な発現レベルと比較して少なくとも10%または20%の発現阻害、より好ましくは正常な発現レベルと比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%の阻害をもたらす。いくつかの実施形態において、このようなモジュレーションは1~25nMの本発明の化合物を使用した場合に見られる。同じか、または異なる実施形態において、発現阻害は100%未満、例えば98%未満の阻害、95%未満の阻害、90%未満の阻害、80%未満の阻害、例えば70%未満の阻害である。発現レベルのモジュレーションは、例えばSDS-PAGE、続いて標的タンパク質に対して作製された好適な抗体を使用したウエスタンブロッティング等の方法によって、タンパク質レベルを測定することによって決定することができる。あるいはまた、発現レベルのモジュレーション、例えば阻害は、例えばノーザンブロッティングまたは定量的RT-PCRによってmRNAのレベルを測定することで決定することができる。mRNAレベルを介して測定する場合、適切な投与量、例えば1~25nMの濃度を用いた場合の阻害またはダウンレギュレーションのレベルは、種々の実施形態において、典型的には本発明の化合物の不在下における正常レベルの10~20%のレベルまでである。

【0045】

従って、本発明は、HER3タンパク質および/もしくはmRNAを発現している細胞におけるHER3タンパク質および/もしくはmRNAの発現をダウンレギュレートするか、または阻害する方法であって、該細胞に本発明に係るオリゴマーまたはコンジュゲートを投与して該細胞におけるHER3タンパク質および/もしくはmRNAの発現をダウンレギュレートまたは阻害することを含む、上記方法を提供する。好適には、細胞は、ヒトの細胞等の哺乳動物細胞である。投与は、種々の実施形態において、in vitroであり得る。投与は、種々の実施形態において、in vivoであり得る。

【0046】

本明細書で用いる用語「標的核酸」は、ヒトHER3等の哺乳動物HER3ポリペプチドをコードするDNA、例えば配列番号197をいう。HER3をコードする核酸または天然に生じるその変異体、および、これらに由来するRNA核酸、好ましくはmRNA、例えばプレmRNAであるが、好ましくは成熟mRNAである。種々の実施形態において、例えば研究または診断において使用する場合、「標的核酸」は、上記DNAもしくはRNA核酸標的に由来するcDNAまたは合成オリゴヌクレオチドであり得る。本発明に係るオリゴマーは、好ましくは標的核酸にハイブリダイズすることができる。

【0047】

10

20

30

40

50

用語「天然に生じるその変異体」は、規定された分類学的な群、例えばマウス、サル、および好ましくはヒト等の哺乳動物内で天然に生じるHER3ポリペプチドまたは核酸配列の変異体をいう。典型的には、ポリヌクレオチドの「天然に生じる変異体」に言及する場合、この用語はまた、染色体転座または重複によって染色体 Chr 12: 54.76 - 54.78 Mbで見られるHER3をコードするゲノムDNAの任意の対立遺伝子変異体、および、例えばこれらから誘導されるmRNA等のRNAも包含し得る。「天然に生じる変異体」はまた、HER3 mRNAの選択的スプライシングから導かれる変異体も含み得る。特定のポリペプチド配列について言及する場合、この用語は、例えば翻訳中または翻訳後の修飾、例えばシグナルペプチドの切断、タンパク分解、グリコシル化等によって処理され得る、タンパク質の天然に生じる形態も包含する。

10

【0048】

変異体配列、例えば、限定するものではないが、対立遺伝子変異体（例えばヒト遺伝子座染色体Chr 12: 54.76 - 54.78 Mbに存在するHER3遺伝子等）のこのような標的配列も本発明の範囲内である。変異体配列は、HER3中の標的配列に対して少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%または少なくとも98%の配列相同性を有し得る。典型的には、上記変異体配列に対応する本発明のオリゴマーはなおかつHER3をダウンレギュレートすることができる。HER2および/またはEGFR遺伝子（1種または複数種）由来の標的配列が、HER3標的配列に対してこのような相同性を有することがあり、そして上記変異体配列に対応する本発明のオリゴヌクレオチドがなおかつHER3をダウンレギュレートすることができることは理解されるべきである。

20

【0049】

用語「少なくとも1」は、1と等しいかそれより大きい整数、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等を含む。種々の実施形態において、本発明の化合物の核酸またはタンパク質標的に言及する場合等で、用語「少なくとも1」は用語「少なくとも2」および「少なくとも3」および「少なくとも4」を含み、同様に、用語「少なくとも2」は用語「少なくとも3」および「少なくとも4」を含み得る。

【0050】

配列

本発明は、HER3（および場合によってHer2および/またはEGFR）の発現をダウンレギュレートするためのオリゴマー、組成物および方法を提供する。特に、本発明は、HER3を標的とするオリゴマーおよびオリゴヌクレオチド配列に関する。標的HER3 mRNA/cDNA配列上のどこにオリゴヌクレオチドを設計するかに関して制限はないが、このようなオリゴヌクレオチド配列は、種々の実施形態において、配列番号200~227から選択される配列を含むもの、またはこれらに由来するもの（例えば上記配列番号中に見られる対応する連続核酸塩基配列を含むもの）である。

30

【0051】

オリゴマーは、標的核酸中に存在するヌクレオチド配列、例えば配列番号197、もしくは配列番号200~227、1~140および228~233よりなる群から選択される配列（表1を参照のこと）に対応する連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなり、上記オリゴマー（またはその連続核酸塩基部分）は場合によって上記の選択された配列に対して1、2、もしくは3個のミスマッチを含み得る。16個の核酸塩基を含むオリゴマー配列の例を配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139、および140に示す。より短い配列はそれから誘導することができる。より長い配列は、例示された配列番号のものの全て、または少なくとも10個の核酸塩基を含み得る。

40

【0052】

本発明は更に、HER3遺伝子中の標的配列、特に配列番号1~140に対応するもの（すなわちその逆相補体）を提供するが、上記標的配列に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴマー）はHER3をダウンレギュレートすることができる。例えば、配列番号1、1

50

6、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139および140のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列にそれぞれ対応する標的配列を図1に示す（上記の対応オリゴの配列番号と共に太字および下線で示す）。オリゴヌクレオチドの設計も開示されており、例えば配列番号141～168に示すものである。LNAオリゴヌクレオチドの具体的な設計も開示されており、例えば配列番号169～196および234、特に配列番号169、170、173、174、180、181、183、185、187、188、189、190、191、192、194、および／または配列番号169、170、172、174、175、176、および179で示すものである。一実施形態において、本発明のオリゴマーは、配列番号169、180もしくは234からなるか、これを含み、あるいは、配列番号169、180もしくは234に対応するか、またはそのコンジュゲートの形態である、連続した核酸塩基配列からなるか、これを含む。好ましい実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドはHER3 mRNAおよびタンパク質の発現の強力な阻害剤であると考えられる。

10

【0053】

一態様において、本発明は、HER3遺伝子の標的配列に結合し、HER3の発現をダウンレギュレートすることができるアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴマー）であって、標的配列に対応する10～50個、好ましくは10～25個の核酸塩基、より好ましくは10～16個の核酸塩基の（連続）配列からなるか、もしくはこれを含み、そして好ましくは上記核酸塩基の少なくとも2個がヌクレオチド類似体である、該オリゴヌクレオチドを提供する。こうしたオリゴの配列例の一覧を表1（実施例3）に挙げる。

【0054】

好ましくは、オリゴヌクレオチド配列は10～16個の核酸塩基の配列を含む。16個の核酸塩基を含むオリゴヌクレオチド配列の例は、配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139、および140よりなる群から選択される配列番号で示す。従って、より核酸塩基の数が少ない、例えば10、11、12、13、14、または15個のオリゴヌクレオチド配列は、配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139、および140中に見られる、例えば少なくとも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個または15個の連続核酸塩基のサブ配列に対応する連続核酸塩基配列を有し得る。従ってより短い配列はこれらに由来し得る。より長い配列は、例示した配列番号のものの全て、または少なくとも10個の核酸塩基を含み得る。典型的には、オリゴヌクレオチドの配列の一部のみが配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139、および140から選択される配列番号中に存在する場合、オリゴヌクレオチドの配列の残りの部分は上記配列番号に隣接する対応ヌクレオチドに対して相同である。

20

30

【0055】

興味ある2つの配列モチーフは、配列番号1および配列番号54である。

【0056】

種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは、配列番号141～168、例えば配列番号141および152よりなる群から選択されるギャップマー核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

40

【0057】

特定の実施形態において、オリゴマーは、哺乳動物HER3をコードする核酸の等価領域に完全に相補的（完璧に相補的）な連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる - すなわちアンチセンスヌクレオチド配列を含む。

【0058】

しかしながら、いくつかの実施形態において、オリゴマーは標的配列にハイブリダイズした場合に1、2、3、または4個（以上）のミスマッチを含み、それでも十分に標的に結合して所望の効果、すなわち標的のダウンレギュレーションを示すことができる。ミスマッチは、例えばオリゴマー核酸塩基配列の長さを長くすること、および／または核酸塩基配

50

列内に存在するヌクレオチド類似体、例えばLNAの数を増すことで補うことができる。

【0059】

種々の実施形態において、連続核酸塩基配列は、標的配列、例えば哺乳動物HER3をコードする核酸の対応領域に対して3個以下、例えば2個以下のミスマッチを含む。

【0060】

種々の実施形態において、連続核酸塩基配列は、標的配列、例えば哺乳動物HER3をコードする核酸の対応領域に対して1個以下のミスマッチを含む。

【0061】

本発明のオリゴマーの核酸塩基配列または連続核酸塩基配列は、配列番号200～227、1～140および228～233よりなる群から選択される対応配列に対して好ましくは少なくとも80%相同であり、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相同であり、例えば100%相同（同一）である。 10

【0062】

本発明のオリゴマーのヌクレオチド配列または連続核酸塩基配列は、配列番号197中に存在する対応配列に対し、好ましくは少なくとも80%相同であり、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相同であり、例えば100%相同（同一）である。

【0063】

本発明のオリゴマーのヌクレオチド配列または連続核酸塩基配列は、配列番号197中に存在するサブ配列に対し、好ましくは少なくとも80%相補的であり、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%相補的であり、例えば100%相補的（完全に相補的）である。 20

【0064】

種々の実施形態において、オリゴマー（またはその連続核酸塩基部分）は、配列番号200～227、1～140および228～233よりなる群から選択される配列の一つ、または少なくとも10個の連続核酸塩基のそのサブ配列から選択されるか、またはこれを含み、上記オリゴマー（またはその連続核酸塩基部分）は、場合によって、上記選択された配列に対して1、2、または3個のミスマッチを含んでいても良い。 30

【0065】

種々の実施形態において、サブ配列は11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29個の連続核酸塩基、例えば12～22個、例えば12～18個の核酸塩基から構成され得る。好適には、種々の実施形態において、サブ配列は本発明のオリゴマーの連続核酸塩基配列と同じ長さのものである。

【0066】

しかしながら、種々の実施形態において、オリゴマーの核酸塩基配列は、標的配列と相補的でない更なる5'または3'の核酸塩基、例えば独立して1、2、3、4または5個の更なる核酸塩基5'および/または3'を含んでいても良いことが認識される。この点において、本発明のオリゴマーは、種々の実施形態において、5'および/または3'に更なる核酸塩基がフランキングした連続核酸塩基配列を含み得る。種々の実施形態において、更なる5'または3'の核酸塩基は天然に生じるヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAである。種々の実施形態において、更なる5'または3'の核酸塩基は、本明細書においてギャップマーオリゴマーの文脈において言及する領域Dを示し得る。 40

【0067】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号200の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0068】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号201の核酸塩基配列、 50

もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0069】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号202の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0070】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号203の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0071】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号204の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

10

【0072】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号205の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0073】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号206の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0074】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号207の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0075】

20

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号208の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0076】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号209の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0077】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号210の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0078】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号211の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

30

【0079】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号212の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0080】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号213の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0081】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号214の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

40

【0082】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号215の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0083】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号216の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0084】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号217の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0085】

50

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号218の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0086】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号219の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0087】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号220の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0088】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号221の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

10

【0089】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号222の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0090】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号223の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0091】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号224の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

20

【0092】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号225の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0093】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号226の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0094】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、配列番号227の核酸塩基配列、もしくはそのサブ配列からなるか、またはこれを含む。

【0095】

30

本発明のオリゴマー（または連続核酸塩基配列）と、哺乳動物HER3（もしくはHer2、もしくはEGFR）をコードする核酸、例えば本明細書において開示したものとの「相同性」または「相補性」を決定する場合、相同性の決定は、本発明の化合物の対応ヌクレオチド配列および哺乳動物HER3（または標的核酸）をコードする核酸の対応領域、もしくはその相補体で単純なアラインメントをして行うことができ、相同性は、並んだ塩基の数を数え、本発明の化合物中の連続核酸塩基の総数で割り、そして100をかけることによって決定する。このような比較において、ギャップが存在する場合、このようなギャップは、ギャップ内のヌクレオチド数が本発明のヌクレオチド配列と標的核酸とで異なる領域とするよりも、むしろ単にミスマッチとすることが好ましい。

【0096】

40

アミノ酸およびポリヌクレオチドの相同性は、ClustalWアルゴリズムを標準設定を用いて使用して決定することができる：<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>を参照のこと。方法：EMBOSS::水(ローカル)：ギャップ・オープン=10.0、ギャップ伸長=0.5、Blosum 62(タンパク質)、またはヌクレオチド/核酸塩基配列についてはDNAfullを使用。このようなアラインメントを用いて、ヒトおよび別の哺乳動物種、例えばサル、マウスおよび/またはラット由来のHER3をコードする核酸の領域を同定することもでき、その場合、核酸相補性の十分なストレッチがあり、ヒトHER3標的核酸、および別の哺乳動物種に存在する対応核酸の双方を標的とするオリゴヌクレオチドの設計、例えばヒト由来のHER3をコードする核酸、および別の哺乳動物種由来のHER3をコードする核酸の双方の等価領域に対して100%相補的である、少なくとも10個、例えば少なくとも12個、例えば少なく

50

とも14個、例えば少なくとも16個、例えば少なくとも18個、例えば11、12、13、14、15、16、17または18個の連続核酸塩基の領域からなるか、またはこれを含むオリゴマーの設計が可能である。

【0097】

種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは、ヒト由来のHER3をコードする核酸、および別の哺乳動物種由来のHER3をコードする核酸、例えばHER3をコードするマウスの核酸の双方の対応領域に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、または100%相同（すなわちヒトおよびマウス配列の双方の等価領域に対して80%～100%相補）である連続核酸塩基配列を含むか、またはこれより構成される。オリゴマーの連続核酸塩基配列は、ヒトHER3 mRNAの等価領域に対して100%相補的であることが好ましい。

10

【0098】

用語「対応（している）」および「対応する」は、オリゴマーの核酸塩基配列または連続核酸塩基配列と、以下の等価なヌクレオチド配列：i)核酸標的、例えば標的タンパク質、例えばHER3タンパク質をコードするmRNA、例えば配列番号197の逆相補体、および/またはii)本明細書において例えば配列番号200～227、1～140および228～233よりなる群で提供されるヌクレオチドの配列、との間の比較をいう。ヌクレオチド類似体は、その等価物または対応ヌクレオチドと直接比較する。

【0099】

用語「対応ヌクレオチド類似体」および「対応ヌクレオチド」は、ヌクレオチド類似体と天然に生じるヌクレオチド中の核酸塩基が同一であることを示すことを意図する。例えば、ヌクレオチドの2-デオキシリボース単位がアデニンに連結している場合、「対応ヌクレオチド類似体」はアデニンに連結した（2-デオキシリボースとは異なる）ペントース単位を含む。

20

【0100】

本発明は更に、HER3遺伝子中の標的配列に対応するオリゴ配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、HER3発現をダウンレギュレートすることができるだけでなく、受容体チロシンキナーゼErbBファミリーの1以上の他のメンバー、特にHER2および/またはEGFRの発現をダウンレギュレートすることもできるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。2種の標的を有効にダウンレギュレートすることができるオリゴヌクレオチドは「二重特異的（bispecific）」と呼ばれ；3種の標的を有効にダウンレギュレートすることができるオリゴヌクレオチドは「三重特異的（trispecific）」と呼ばれる。より一般的には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは多重特異的（polyspecific）であることができ、すなわち、受容体チロシンキナーゼErbBファミリーの複数のメンバーの発現をダウンレギュレートすることができる。従って、用語「二重特異的」および「三重特異的」は単に言及を容易にするために使用するものであり、いかなる意味においても限定的であると理解されない。例えば、二重特異的オリゴヌクレオチドは第三の標的に対して何らかの効果を有していても良く、一方、三重特異的オリゴヌクレオチドはその標的の一つに対して非常に弱く、従って重要でない効果を有するものであっても良い。

30

【0101】

従って、もう一つの態様において、本発明は、二重特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、HER3の発現、および受容体チロシンキナーゼErbBファミリーのもう一つのメンバーの発現をダウンレギュレートすることができるオリゴヌクレオチドを提供する。好ましくは、このような二重特異的オリゴヌクレオチドはHER3およびHER2の双方の発現を有効にダウンレギュレートすることができる。あるいは、また好ましくは、このような二重特異的オリゴヌクレオチドはHER3およびEGFRの双方の発現を有効にダウンレギュレートすることができる。

40

【0102】

もう一つの態様において、本発明は、三重特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、HER3、および受容体チロシンキナーゼerbBファミリーの他の2種のメンバーの発

50

現をダウンレギュレートすることができるオリゴヌクレオチドを提供する。好ましくは、このような三重特異的オリゴヌクレオチドは、HER3、HER2およびEGFRの発現を有効にダウンレギュレートすることができる。

【0103】

HER3を有効にダウンレギュレートするオリゴヌクレオチドの例は、配列番号169～196および234である。HER3およびHER2の双方を有効にダウンレギュレートするオリゴヌクレオチドの例は、配列番号177および178である。HER3およびEGFRの双方を有効にダウンレギュレートするオリゴヌクレオチドの例は、配列番号171および173である。HER3、HER2およびEGFRを有効にダウンレギュレートするオリゴヌクレオチドの例は、配列番号169、170、172、174～176および179である。

10

【0104】

本発明に係る二重特異的または三重特異的オリゴヌクレオチドは、双方、または3種の標的全てにそれぞれ十分な結合をするために1、2、3、4、5個またはそれより多いミスマッチを許容するものであり得る。

【0105】

本発明に係る二重もしくは三重特異的オリゴヌクレオチドの標的は、受容体チロシンキナーゼErbBファミリーから、特にHER3、HER2およびEGFRよりなる群から選択することができる。2種以上の上記標的のダウンレギュレーションは、個々の標的をコードする核酸、例えばメッセンジャーRNAに十分にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することによって達成することができる。

20

【0106】

LNAオリゴヌクレオチドの具体的な設計も開示されており、例えば配列番号169～196および配列番号234～236に示すものである。本発明のオリゴマーはHER3 mRNAおよびタンパク質の発現の強力な阻害剤であると考えられる。

【0107】

種々の実施形態において、オリゴマーは、哺乳動物HER3および/または独立してHER2および/または独立してEGFRをコードする核酸の対応領域に対して少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%相同である連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

【0108】

30

鎖長

オリゴマーは、合計して長さが10～50個の核酸塩基、例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の連続核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

【0109】

種々の実施形態において、オリゴマーは、合計して長さが10～25個、10～24個、12～25個、12～24個、または10～22個、例えば12～18個、例えば13～17個または12～16個、例えば13、14、15、16個の連続核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

【0110】

種々の実施形態において、オリゴマーは、合計して長さが10～22個または10～18個、例えば12～18個、例えば13～17個または12～16個、例えば13、14、15、16個の連続核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。種々の実施形態において、オリゴマーは、合計して10～16個、12～16個または12～14個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。種々の実施形態において、オリゴマーは、合計して14～18個、または14～16個の核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

40

【0111】

種々の実施形態において、オリゴマーは、合計して長さが10、11、12、13、または14個の連続核酸塩基の連続核酸塩基配列を含むか、またはこれよりなる。

【0112】

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、22個以下の核酸塩基、例えば20

50

個以下の核酸塩基、例えば18個以下の核酸塩基、例えば15、16または17個の核酸塩基からなる。種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは20個未満の核酸塩基を含む。

【0113】

ヌクレオチド類似体

本明細書において使用する用語「ヌクレオチド」は、糖部分、塩基部分および共有結合したリン酸基を含むグリコシドをいい、天然に生じるヌクレオチド、例えばDNAもしくはRNAの双方、好ましくはDNAを包含する。修飾された糖および/または塩基部分を含む非天然のヌクレオチドは、本明細書において「ヌクレオチド類似体」という。

【0114】

用語「核酸塩基」は、天然（DNA-またはRNA-型）ヌクレオチド、並びにヌクレオチド類似体の双方を包含するために使用する。

【0115】

非天然のヌクレオチドとして、修飾された糖部分を有するヌクレオチド、例えば二環式ヌクレオチドまたは2'修飾ヌクレオチド、例えば2'置換ヌクレオチドが挙げられる。

【0116】

「ヌクレオチド類似体」は、糖および/または塩基部分の修飾による、天然のヌクレオチド、例えばDNAまたはRNAヌクレオチドの変異体である。類似体は、原理的にはオリゴヌクレオチドの文脈において単に「サイレント」であるか、または天然ヌクレオチドと「等価」であり得、すなわちオリゴヌクレオチドが作用して標的遺伝子の発現を阻害する経路に対して機能的効果を有さない。こうした「等価」類似体は、それにも関わらず、例えば、それらが製造がより容易もしくはより安価であるか、または貯蔵もしくは製造条件に対してより安定であるか、またはタグもしくは標識を示すものであれば、有用であり得る。しかしながら、好ましくは、類似体は、例えば標的への結合親和性の増大、および/または細胞内ヌクレアーゼに対する抵抗性の増大、および/または細胞内への輸送のしやすさの増大をもたらすことによって、オリゴマーが作用して発現を阻害する経路に対して機能的効果を有するであろう。

【0117】

用語「核酸塩基」は、ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体の双方を包含する集合語として使用する。核酸塩基配列は、少なくとも2個のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含む配列である。種々の実施形態において、核酸塩基配列はヌクレオチドのみ、例えばDNA単位のみを含むものであって良く、別の実施形態において、核酸塩基配列はヌクレオチド類似体のみ、例えばLNA単位のみを含むものであって良く、あるいはまた種々の実施形態において、核酸塩基配列はヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体単位の双方を含み得る。

【0118】

用語「核酸」は、2個以上のヌクレオチドの共有結合によって形成された分子として定義する。

【0119】

本明細書において、用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は互換可能に使用する。

【0120】

核酸塩基の「塩基部分」は、天然並びに非天然の核酸塩基の双方の塩基を包含する。従って、塩基部分は、既知のプリンおよびピリミジン複素環だけでなく、複素環式の類似体およびその互変異性体をも包含する。

【0121】

こうした塩基部分の例としては、限定するものではないが、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および2-クロロ-6-アミノプリンが挙げられる。

【0122】

10

20

30

40

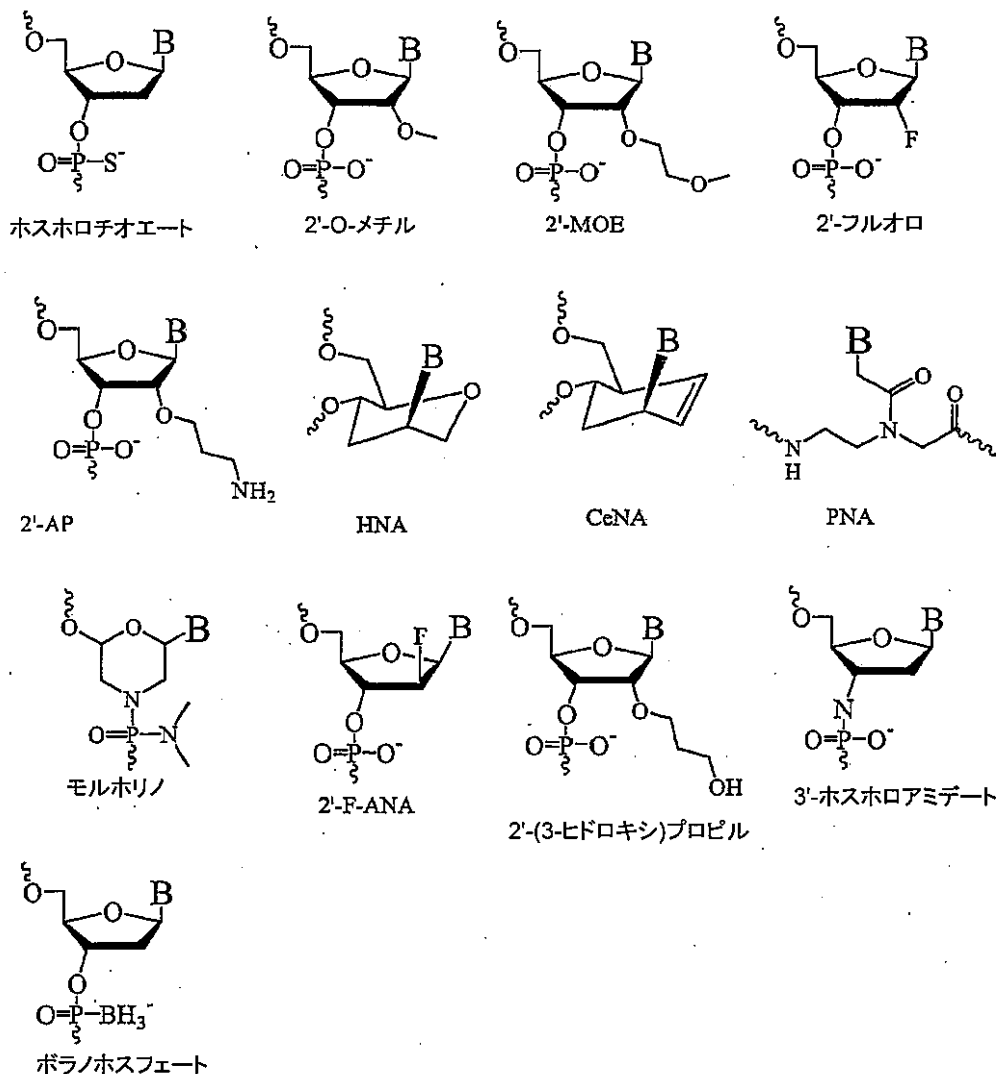
50

種々の実施形態において、オリゴマー中に存在する少なくとも1個の核酸塩基は、例えば5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および2-クロロ-6-アミノプリンよりなる群から選択されるような修飾塩基を含む。

【0123】

ヌクレオシド類似体の具体的な例は、例えばFreier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443およびUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213、およびスキーム1に記載されている：

【化1】



スキーム1

【0124】

オリゴマーは、天然に生じるヌクレオチド - 好ましくは2'-デオキシヌクレオチドの単純な配列（本明細書において一般的に「DNA」という）を含むかまたはこれよりなるものであり得るが、リボヌクレオチド（本明細書において一般的に「RNA」という）、またはこのような天然に生じるヌクレオチドおよび1個以上の非天然ヌクレオチド、すなわちヌクレオチド類似体の組み合わせの配列を含むかこれよりなることも可能である。このようなヌクレオチド類似体は、好適には標的配列に対するオリゴマーの親和性を増大させ得る。

【0125】

好適かつ好ましいヌクレオチド類似体の例は、国際公開第2007/031091号（参照により本明細書に組み入れる）に記載されているか、またはそれに参照されている。

【0126】

ヌクレオチドの好ましい修飾の一つとして、糖部分が修飾されて2'-置換基、または結合親和性が増大し、おそらくヌクレアーゼ抵抗性もある程度増大した架橋された（ロックされた核酸-LNA）構造を与えるヌクレオチド；ヌクレオチド間結合を、その正常なホスホジエステルから、ヌクレアーゼの攻撃に対してより抵抗性を有するもの、例えばホスホチオエートまたはボラノホスフェート（これら2種も、RNase Hによって切断され、HER3発現をモジュレートしてアンチセンス阻害経路を可能とする）に改変すること、が挙げられる。親和性を増大させるヌクレオチド類似体、例えばLNAまたは2'-置換糖をオリゴマーに組み込むことで、特異的に結合するオリゴマーのサイズを小さくすることが可能となり、また非特異的もしくは異常な結合が生じないようにオリゴマーのサイズの上限を下げることでもある。

10

【0127】

種々の実施形態において、オリゴマーは、少なくとも2個のヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態において、オリゴマーは、3~8個のヌクレオチド類似体、例えば6または7個のヌクレオチド類似体を含む。これまでのところ最も好ましい実施形態において、上記ヌクレオチド類似体の少なくとも1個はロックされた核酸（LNA）である；例えば少なくとも3個もしくは少なくとも4個、または少なくとも5個、または少なくとも6個、または少なくとも7個、または8個のヌクレオチド類似体がLNAであって良い。いくつかの実施形態において、全てのヌクレオチド類似体がLNAであっても良い。

20

【0128】

ヌクレオチドのみから構成される好ましいヌクレオチド配列モチーフまたはヌクレオチド配列について言及する場合、その配列によって規定される本発明のオリゴマーには、該配列中に存在する1個以上のヌクレオチドの代わりに、対応ヌクレオチド類似体、例えば二本鎖の安定性/オリゴマー/標的二本鎖の T_m を上げるLNA単位または他のヌクレオチド類似体（すなわち親和性を増大させるヌクレオチド類似体）が含まれ得ることが認識されるであろう。

【0129】

種々の実施形態において、オリゴマーの核酸塩基配列および標的配列間のミスマッチは、好ましくは親和性を増大させるヌクレオチド類似体（例えば領域AおよびC）の外側の領域、例えば本明細書で言及する領域B内、および/または本明細書で言及する領域D内、および/またはオリゴヌクレオチド中のDNAヌクレオチド等の修飾されていない部位、および/または連続核酸塩基配列の5'または3'にある領域内で見られる。

30

【0130】

ヌクレオチドのこうした修飾の例としては、糖部分を修飾して2'-置換基とするか、または結合親和性を増大させ、またヌクレアーゼ抵抗性の増大をもたらし得る架橋された（ロックされた核酸）構造とすることが挙げられる。

【0131】

好ましいヌクレオチド類似体はLNA、例えばオキシ-LNA（例えば -D-オキシ-LNA、および -L-オキシ-LNA）、および/またはアミノ-LNA（例えば -D-アミノ-LNAおよび -L-アミノ-LNA）および/またはチオ-LNA（例えば -D-チオ-LNAおよび -L-チオ-LNA）および/またはENA（例えば -D-ENAおよび -L-ENA）である。種々の実施形態において、LNA単位は -D-オキシ-LNAである。

40

【0132】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴマー内に存在するヌクレオチド類似体（本明細書において言及する領域AおよびC中のもの等）は、例えば：2'-O-アルキル-RNA単位、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位、2'-フルオロ-ANA単位、HNA単位、INA（挿入核酸-Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 30: 4918-4925, 参照により本明細書に組み入れる）単位および2'MOE単位から独立して選択される。種々の実施形態において、上記の型の1種のヌクレオチド類似体のみ、またはその連続核酸塩基配列が本発明のオリゴマー中に存在する。

50

【 0 1 3 3 】

種々の実施形態において、ヌクレオチド類似体は2'-O-メトキシエチル-RNA (2'MOE)、2'-フルオロ-DNAモノマーまたはLNAヌクレオチド類似体であり、従って本発明のオリゴヌクレオチドはこれら3種の型の類似体から独立して選択されるヌクレオチド類似体を含み得るか、あるいは3種の型から選択される1種の類似体のみを含み得る。種々の実施形態において、上記ヌクレオチド類似体の少なくとも1個は2'-MOE-RNAであり、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-MOE-RNAヌクレオチド単位である。種々の実施形態において、上記ヌクレオチド類似体の少なくとも1個は2'-フルオロDNAであり、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-フルオロ-DNAヌクレオチド単位である。

【 0 1 3 4 】

10

種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーは、少なくとも1個のロックされた核酸 (LNA) 単位、例えば1、2、3、4、5、6、7、もしくは8個のLNA単位、例えば3~7もしくは4~8個のLNA単位、または3、4、5、6もしくは7個のLNA単位を含む。種々の実施形態において、全てのヌクレオチド類似体がLNAである。いくつかの実施形態において、オリゴマーは、-D-オキシ-LNA、および1個以上の以下のLNA単位：-Dもしくは-L配置またはその組み合わせのいずれかであるチオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、および/またはENA、の双方を含み得る。種々の実施形態において、全てのLNAシトシン単位が5'メチル-シトシンである。本発明の種々の実施形態において、オリゴマーはLNAおよびDNA単位の双方を含み得る。好ましくは、LNAおよびDNA単位を合わせた合計数は10~25個、好ましくは10~20個、更により好ましくは12~16個である。本発明の種々の実施形態において、オリゴマーのヌクレオチド配列、例えば連続核酸塩基配列は少なくとも1個のLNAからなり、残りのヌクレオチド単位はDNA単位である。種々の実施形態において、オリゴマーはLNAヌクレオチド類似体および天然に生じるヌクレオチド (例えばRNAまたはDNA、最も好ましくはDNAヌクレオチド) のみを含み、場合によってホスホロチオエート等の改変されたヌクレオチド間結合を含む。

20

【 0 1 3 5 】

種々の実施形態において、オリゴマー中に存在する少なくとも1個の核酸塩基は、5-メチルシトシン、イソシトシン、シュードイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリン、および2-クロロ-6-アミノプリンよりなる群から選択される修飾塩基を有する。

30

【 0 1 3 6 】

LNA

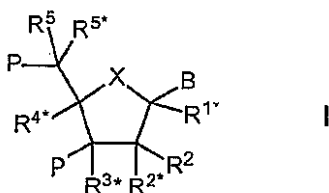
用語「LNA」は「ロックされた核酸」として知られる二環式ヌクレオチド類似体をいう。これはLNAモノマーをいう場合があり、あるいは「LNAオリゴヌクレオチド」またはLNA「オリゴマー」の文脈において使用する場合は1個以上のこうした二環式ヌクレオチド類似体を含むオリゴマーをいう。

【 0 1 3 7 】

本発明のオリゴマーにおいて使用するLNAは、好ましくは一般式Iの構造、およびその塩基性塩および酸付加塩を有する：

【 化 2 】

40



【 0 1 3 8 】

[式中、

Xは-O-、-S-、-N(R^{N*})-、-C(R⁶R^{6*})-から選択され；

Bは水素、置換されていても良いC₁₋₄-アルコキシ、置換されていても良いC₁₋₄-アル

50

キル、置換されていても良い C_{1-4} -アシルオキシ、核酸塩基、DNAインターカレーター (intercalators)、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、レポーター基、およびリガンドから選択され；

Pは次のモノマーにヌクレオチド間結合するためのラジカルの位置または5'-末端基を示し、こうしたヌクレオチド間結合または5'-末端基は場合によって置換基 R^5 または等しく適用できる置換基 R^{5*} を含み；

P^* は前のモノマーへのヌクレオチド間結合または3'-末端基を示し；

R^4 および R^2 は一緒になって $-C(R^a R^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R^a)-$ 、および $>C=Z$ から選択される、1~4個の基/原子から構成されるビラジカルを示し、

ここでZは $-O-$ 、 $-S-$ 、および $-N(R^a)-$ から選択され、そして R^a および R^b はそれぞれ独立して水素、置換されていても良い C_{1-12} -アルキル、置換されていても良い C_{2-12} -アルケニル、置換されていても良い C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルコキシアルキル、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリアル、アリアルオキシ-カルボニル、アリアルオキシ、アリアルカルボニル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルオキシ-カルボニル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルカルボニル、アミノ、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリアルおよびヘテロアリアルは置換されていても良く、2個のジェミナル置換基 R^a および R^b は一緒になって、置換されていても良いメチレン($=CH_2$)を示すものであっても良く、

存在する置換基 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、 R^{5*} 、 R^6 および R^{6*} はそれぞれ独立して水素、置換されていても良い C_{1-12} -アルキル、置換されていても良い C_{2-12} -アルケニル、置換されていても良い C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルコキシアルキル、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリアル、アリアルオキシ-カルボニル、アリアルオキシ、アリアルカルボニル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルオキシ-カルボニル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルカルボニル、アミノ、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリアルおよびヘテロアリアルは置換されていても良く、2個のジェミナル置換基は、一緒になってオキソ、チオキソ、イミノ、または置換されていても良いメチレンを示すか、あるいは、一緒になって、 $-O-$ 、 $-S-$ 、および $-(NR^N)-$ (R^N は水素および C_{1-4} -アルキルから選択される)から選択される1個以上のヘテロ原子/基で場合によって中断されるか、および/または終結される1~5個の炭素原子のアルキレン鎖からなるスピロビラジカルを形成することができ、そして2個の隣接した(ジェミナルでない)置換基は二重結合を生じる更なる結合を示し得る；そして R^N は、存在し、ビラジカルに関与しない場合は、水素および C_{1-4} -アルキルから選択される]。

【0139】

種々の実施形態において、 R^{5*} はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-O-CH_3$ 、および $-CH=CH_2$ から選択される。

【0140】

10

20

30

40

50

種々の実施形態において、 R^4^* および R^{2^*} は一緒になって、 $-C(R^aR^b)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-O-C(R^cR^d)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-C(R^eR^f)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^cR^d)-$ 、 $-C(R^aR^b)-N(R^c)-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-N(R^e)-$ 、 $-C(R^aR^b)-N(R^c)-O-$ 、および $-C(R^aR^b)-S-$ 、 $-C(R^aR^b)-C(R^cR^d)-S-$ から選択されるビラジカルを示し、式中、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 、および R^f はそれぞれ独立して水素、置換されていても良い C_{1-12} -アルキル、置換されていても良い C_{2-12} -アルケニル、置換されていても良い C_{2-12} -アルキニル、ヒドロキシ、 C_{1-12} -アルコキシ、 C_{2-12} -アルコキシアルキル、 C_{2-12} -アルケニルオキシ、カルボキシ、 C_{1-12} -アルコキシカルボニル、 C_{1-12} -アルキルカルボニル、ホルミル、アリアル、アリアルオキシ-カルボニル、アリアルオキシ、アリアルカルボニル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルオキシ-カルボニル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルカルボニル、アミノ、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、モノ-およびジ(C_{1-6} -アルキル)アミノ- C_{1-6} -アルキル-アミノカルボニル、 C_{1-6} -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 C_{1-6} -アルカノイルオキシ、スルホノ、 C_{1-6} -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 C_{1-6} -アルキルチオ、ハロゲン、DNAインターカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、レポーター基、およびリガンドから選択され、ここでアリアルおよびヘテロアリアルは場合によって置換されていても良く、2個のジェミナル置換基 R^a および R^b は一緒になって、置換されていても良いメチレン ($=CH_2$) を示し得る。

10

20

【0141】

更なる実施形態において、 R^4^* および R^{2^*} は一緒になって、 $-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH_2-CH(CH_3)-$ 、 $-CH=CH-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-NH-O-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-O-$ 、 $-CH(CH_2-O-CH_3)-O-$ から選択されるビラジカルを示す。

【0142】

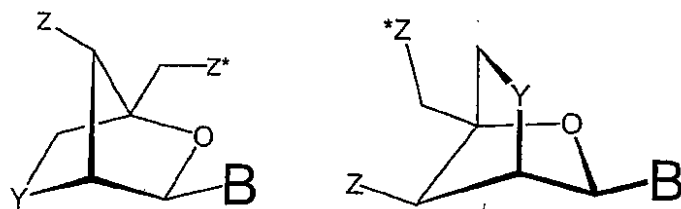
全てのキラル中心について、非対称の基はRまたはS配向性のいずれかで見ることができる。

【0143】

好ましくは、本発明のオリゴマーで使用するLNAは、以下の式のいずれかの少なくとも1個のLNA単位を含む。

30

【化3】



【0144】

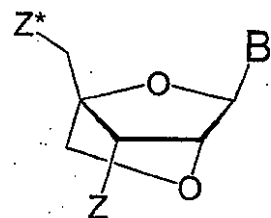
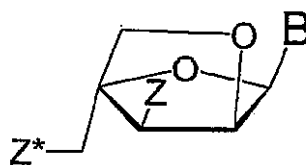
[式中、Yは $-O-$ 、 $-O-CH_2-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ または $N(R^H)$ であり；Zおよび Z^* は独立してヌクレオチド間結合、末端基または保護基から選択され；Bは天然または非天然のヌクレオチドの塩基部分を構成し、そして R^H は水素および C_{1-4} -アルキルから選択される]。

40

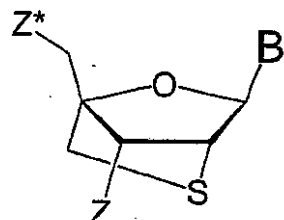
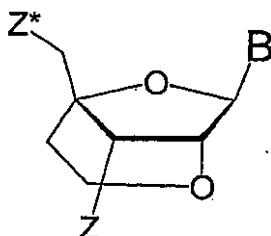
【0145】

特に好ましいLNA単位をスキーム2に示す：

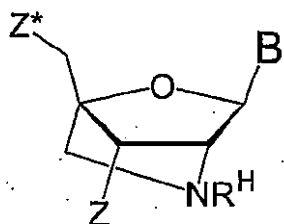
【化 4】

 β -D-オキシ-LNA

A-L-オキシ-LNA

 β -D-チオ-LNA

B-D-ENA

 β -D-アミノ-LNA

スキーム2

10

20

【0146】

用語「チオ-LNA」は、上記一般式中でYがSまたは $-\text{CH}_2-\text{S}-$ から選択されるロックされた核酸塩基(LNA)を含む。チオ-LNAは $-\text{D}$ および $-\text{L}$ -配置の双方であり得る。

【0147】

用語「アミノ-LNA」は、上記一般式中でYが $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $\text{N}(\text{R})-$ 、 $\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-$ 、および $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R})-$ (Rは水素および C_{1-4} -アルキルから選択される)から選択されるロックされた核酸塩基(LNA)を含む。アミノ-LNAは $-\text{D}$ および $-\text{L}$ -配置の双方であり得る。

30

【0148】

用語「オキシ-LNA」は、上記一般式中でYが $-\text{O}-$ または $-\text{CH}_2-\text{O}-$ を示すロックされた核酸塩基(LNA)を含む。オキシ-LNAは $-\text{D}$ および $-\text{L}$ -配置の双方であり得る。

【0149】

用語「ENA」は、上記一般式中でYが $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ($-\text{CH}_2-\text{O}-$ の酸素原子は塩基Bに対して2'-位に結合する)であるロックされた核酸塩基(LNA)を含む。

【0150】

好ましい実施形態において、LNAは $-\text{D}$ -オキシ-LNA、 $-\text{L}$ -オキシ-LNA、 $-\text{D}$ -アミノ-LNAおよび $-\text{D}$ -チオ-LNA、特に $-\text{D}$ -オキシ-LNAから選択される。

40

【0151】

本明細書の文脈において、用語「 C_{1-4} -アルキル」は、鎖が1~4個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素鎖、例えばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 sec -ブチルおよび tert -ブチルを意味することが意図される。

【0152】

RNAse Hのリクルート(recruitment)

オリゴマー化合物はRNAseが介在しない標的mRNAの分解、例えば翻訳の立体障害によるもの、または他の方法を介して機能し得ることが認識されるが、本発明の好ましいオリゴマーは、(エンド)リボヌクレアーゼ(RNase)、例えばRNAse Hをリクルートすることができ

50

る。

【0153】

種々の実施形態において、オリゴマー、または連続核酸塩基配列は、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個の連続したヌクレオチドまたは核酸塩基を含む、少なくとも6個、例えば少なくとも7個の連続したヌクレオチドまたは核酸塩基単位、例えば少なくとも8個または少なくとも9個の連続した核酸塩基単位（残基）の領域を含み、相補的標的RNAとの二本鎖を形成した場合に、RNaseをリクルートすることができる。RNaseをリクルートすることができる連続配列は、本明細書において記載するギャップマーの文脈で言及する領域Bであり得る。種々の実施形態において、RNaseを強化することができる連続配列、例えば領域Bの大きさはより大きく、例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の核酸塩基単位であり得る。

10

【0154】

ヨーロッパ特許第1 222 309号は、RNaseHを強化する能力を決定するために使用することができる、RNaseH活性を決定するためのin vitroの方法を提供する。ヨーロッパ特許第1 222 309号の実施例91～95に提示された方法を使用して、相補的RNA標的が与えられた場合に、pmol/l/分で測定して、2'置換がなく、オリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオチド間にホスホロチオエート連結基を有する等価なDNAのみのオリゴヌクレオチドの少なくとも1%、例えば少なくとも5%、例えば少なくとも10%または20%未満の初速度を有すると、オリゴマーはRNase Hをリクルートできると考えられる。

【0155】

種々の実施形態において、ヨーロッパ特許第1 222 309号の実施例91～95に提示された方法を使用して、相補的RNA標的およびRNaseHが与えられた場合に、RNaseHの初速度が、pmol/l/分で測定して、2'置換がなく、オリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオチド間にホスホロチオエート連結基を有する等価なDNAのみのオリゴヌクレオチドを使用して決定される初速度の1%未満、例えば5%未満、例えば10%未満または20%未満であると、オリゴマーは本質的にRNaseHをリクルートできないと考えられる。

20

【0156】

他の実施形態において、ヨーロッパ特許第1 222 309号の実施例91～95に提示された方法を使用して、相補的RNA標的およびRNaseHが与えられた場合に、RNaseHの初速度が、pmol/l/分で測定して、2'置換がなく、オリゴヌクレオチド中の全てのヌクレオチド間にホスホロチオエート連結基を有する等価なDNAのみのオリゴヌクレオチド（すなわち同じ塩基配列を有するが、DNA単位のみを含む）を使用して決定される初速度の少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%であると、オリゴマーはRNaseHをリクルートできると考えられる。

30

【0157】

典型的には、相補的標的RNAと二本鎖を形成する場合にRNaseをリクルートすることができる連続核酸塩基配列を形成するオリゴマーの領域は、RNA標的とDNA/RNA様の二本鎖を形成するヌクレオチド単位からなり、そしてDNA単位、および-L配置であり、特に好ましくは-L-オキシLNAであるLNA単位の双方を含み得る。

【0158】

本発明のオリゴマーは、ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体の双方を含む核酸塩基配列を含んでいて良く、またギャップマー、ヘッドマー（headmer）またはミックスマー（mixmer）の形態であって良い。

40

【0159】

ヘッドマーは、5'-末端のRNaseをリクルートしないヌクレオチド類似体の連続ストレッチ、続いて3'-末端に向けてRNaseによって認識され、切断され得るDNAまたは修飾ヌクレオチド（類似体）単位の連続ストレッチ（例えば少なくとも7個のこうしたヌクレオチド）によって定義され、そしてテイルマー（tailmer）は、5'末端のRNaseによって認識され、切断され得るDNAまたは修飾ヌクレオチド（類似体）の連続ストレッチ（例えば少なくとも7個のこうしたヌクレオチド）、続いて3'-末端に向けてRNaseをリクルートしない

50

ヌクレオチド類似体の連続ストレッチ、によって定義される。ミックスマーと呼ばれる本発明に係る他のキメラオリゴマーは、i) RNase によって認識され、切断され得るDNAまたは修飾ヌクレオチド、およびii) RNaseをリクルートしないヌクレオチド類似体、の入り混じった組成から構成される。いくつかのヌクレオチド類似体は、RNaseHの結合および切断をメディエートすることもできる。-L-LNAはRNaseH活性をある程度までリクルートするため、ギャップマー構築物のためにRNaseHによって認識され、切断され得るDNAまたは修飾ヌクレオチドのより小さな領域（例えばギャップ-または領域B）が必要である可能性があり、ミックスマー構造により高い柔軟性を組み込むことができる。

【0160】

ギャップマーの設計

好ましくは、本発明のオリゴマーはギャップマーである。ギャップマーオリゴマーは、RNaseH等のRNaseをリクルートすることができるヌクレオチドまたは核酸塩基の連続ストレッチ、例えば本明細書において領域Bとして言及する、少なくとも6または7個のDNAヌクレオチドの領域を含むオリゴマーであり、領域Bの5'および3'にはヌクレオチド類似体、例えば親和性を増大させるヌクレオチド類似体がフランキングしており、例えばRNaseをリクルートすることができるヌクレオチドの連続ストレッチの5'および3'に1~6個のヌクレオチド類似体の領域がフランキングしており、これらの領域をそれぞれ領域AおよびCという。

【0161】

好ましくは、ギャップマーは、式（5'から3'方向へ）A-B-C、または場合によってA-B-C-DまたはD-A-B-Cの（ポリ）ヌクレオチド配列を含み；領域A（5'領域）は、少なくとも1個のヌクレオチド類似体、例えば少なくとも1個のLNA単位、例えば1~6個のヌクレオチド類似体、例えばLNA単位からなるか、またはこれを含み、そして；領域Bは、（相補的RNA分子、例えばmRNA標的と二本鎖を形成した場合に）RNaseをリクルートすることができる少なくとも5個の連続ヌクレオチドもしくは核酸塩基、例えばDNAヌクレオチドからなるか、またはこれを含み、そして；領域C（3'領域）は、少なくとも1個のヌクレオチド類似体、例えば少なくとも1個のLNA単位、例えば1~6個のヌクレオチド類似体、例えばLNA単位からなるか、またはこれを含み、そして；領域Dは、存在する場合には、1、2または3個のヌクレオチド単位、例えばDNAヌクレオチドからなるか、またはこれを含む。

【0162】

種々の実施形態において、領域Aは1、2、3、4、5または6個のヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えば2~5個のヌクレオチド類似体、例えば2~5個のLNA単位、例えば3または4個のヌクレオチド類似体、例えば3または4個のLNA単位からなり；および/または領域Cは1、2、3、4、5または6個のヌクレオチド類似体、例えばLNA単位、例えば2~5個のヌクレオチド類似体、例えば2~5個のLNA単位、例えば3または4個のヌクレオチド類似体、例えば3または4個のLNA単位からなる。

【0163】

種々の実施形態において、Bは、RNaseをリクルートすることができる5、6、7、8、9、10、11もしくは12個の連続ヌクレオチドまたは核酸塩基、あるいはRNaseをリクルートすることができる6~10個、もしくは7~9個、例えば8個の連続ヌクレオチドまたは核酸塩基からなるか、またはこれを含む。種々の実施形態において、領域Bは、少なくとも1個のDNAヌクレオチド単位、例えば1~12個のDNA単位、好ましくは4~12個のDNA単位、より好ましくは6~10個のDNA単位、例えば7~10個のDNA単位、最も好ましくは8、9もしくは10個のDNA単位からなるか、またはこれを含む。

【0164】

種々の実施形態において、領域Aは、3または4個のヌクレオチド類似体、例えばLNAからなり、領域Bは7、8、9または10個のDNA単位からなり、そして領域Cは3または4個のヌクレオチド類似体、例えばLNAからなる。このような設計として(A-B-C) 3-10-3、3-10-4、4-10-3、3-9-3、3-9-4、4-9-3、3-8-3、3-8-4、4-8-3、3-7-3、3-7-4、4-7-3が挙げられ、更に、1または2個のヌクレオチド単位、例えばDNA単位を有し得る領域Dを含んでいても良い

10

20

30

40

50

。

【0165】

更なるギャップマーの設計は国際公開第2004/046160号に開示されており、参照により本明細書に組み入れる。

【0166】

米国特許仮出願第60/977409号および国際特許出願PCT/EP2008/053314号（いずれも参照により本明細書に組み入れる）は、種々の実施形態において本発明に係るギャップマーオリゴマーであり得る「ショートマー（shortmer）」ギャップマーオリゴマーに言及している。

【0167】

種々の実施形態において、オリゴマーは合計して10、11、12、13または14個の核酸塩基単位の連続核酸塩基配列からなり、この連続核酸塩基配列は式(5'-3')A-B-C、または場合によってA-B-C-DもしくはD-A-B-Cのものであり、ここでAは1、2または3個のヌクレオチド類似体単位、例えばLNA単位からなり；Bは、相補的RNA分子（例えばmRNA標的）と二本鎖を形成する場合にRNaseをリクルートすることができる7、8または9個の連続ヌクレオチドまたは核酸塩基単位からなり；そしてCは1、2または3個のヌクレオチド類似体単位、例えばLNA単位からなる。Dは、存在する場合は1個のDNA単位からなる。

【0168】

種々の実施形態において、Aは1個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Aは2個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Aは3個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Cは1個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Cは2個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Cは3個のLNA単位からなる。種々の実施形態において、Bは7個のヌクレオチド単位からなる。種々の実施形態において、Bは8個のヌクレオチド単位からなる。種々の実施形態において、Bは9個のヌクレオチド単位からなる。種々の実施形態において、Bは1～9個のDNA単位、例えば2、3、4、5、6、7または8個のDNA単位を含む。種々の実施形態において、BはDNA単位からなる。種々の実施形態において、Bは -L 配置にある少なくとも1個のLNA単位、例えば -L- 配置にある2、3、4、5、6、7、8または9個のLNA単位を含む。種々の実施形態において、Bは少なくとも1個の -L- オキシLNA単位を含むか、または -L- 配置にある全てのLNA単位が -L- オキシLNA単位である。種々の実施形態において、A-B-C中に存在するヌクレオチドの数は、（ヌクレオチド類似体単位 - 領域B - ヌクレオチド類似体単位）が1-8-1、1-8-2、2-8-1、2-8-2、3-8-3、2-8-3、3-8-2、4-8-1、4-8-2、1-8-4、2-8-4、または；1-9-1、1-9-2、2-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、1-9-3、3-9-1、4-9-1、1-9-4、または；1-10-1、1-10-2、2-10-1、2-10-2、1-10-3、3-10-1よりなる群から選択される。種々の実施形態において、A-B-C中のヌクレオチドの数は、2-7-1、1-7-2、2-7-2、3-7-3、2-7-3、3-7-2、3-7-4、および4-7-3よりなる群から選択される。種々の実施形態において、AおよびCの双方はそれぞれ2個のLNA単位からなり、Bは8または9個のヌクレオチド単位、好ましくはDNA単位からなる。

【0169】

他のギャップマーの設計としては、領域Aおよび/またはCが3、4、5または6個のヌクレオチド類似体、例えば2'-O-メトキシエチル-RNA（2'MOE）および2'-フルオロ-DNAモノマーよりなる群から選択されるヌクレオチド類似体からなり、そして領域Bが8、9、10、11または12個のヌクレオチド、例えばDNA単位（または核酸塩基）からなるもの、例えば5-10-5および4-12-4のギャップマー設計が挙げられる。更なるギャップマーの設計は国際公開第2007/146511A2号に開示されており、参照により本明細書に組み入れる。

【0170】

連結基

用語「連結基」または「ヌクレオチド間結合」は、2個のヌクレオチドもしくは核酸塩基、2個のヌクレオチド類似体、およびヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体等を共に共有結合することができる基を意味することが意図される。特定かつ好ましい例として、リン酸基およびホスホロチオエート基が挙げられる。

【0171】

本発明のオリゴマーの核酸塩基またはその連続核酸塩基配列は、連結基を介して共に結合している。好適には、各々の核酸塩基は3'側の隣接する核酸塩基に連結基を介して結合する。

【0172】

好適な連結基としては、国際公開第2007/031091号に挙げられたもの、例えば国際公開第2007/031091号の第34頁、第1段落に挙げられた連結基が挙げられる（参照により本明細書に組み入れる）。

【0173】

種々の実施形態において、連結基を、その正常なホスホジエステルから、ヌクレアーゼの攻撃に対してより抵抗性のあるもの、例えばホスホロチオエートまたはボラノホスフェート - これら2つも、RNase Hによって切断され、標的遺伝子の発現を低減させる際にアンチセンス阻害の経路を可能とする - に改変することが好ましい。

【0174】

本明細書で提示する好適な硫黄(S)含有連結基が好ましい場合がある。ホスホロチオエート連結基はまた、特にギャップマーのギャップ領域(B)のために好ましい。ホスホロチオエート結合は、フランキング領域(AおよびC、またAまたはCのDへの連結、および適切な場合には領域D内)のために使用することもできる。

【0175】

しかしながら、特に、例えばヌクレオチド類似体の使用によって領域AおよびC内の連結基がエンドヌクレアーゼによる分解から保護される場合 - 例えば領域AおよびCがLNAヌクレオチドを含む場合には、領域A、BおよびCは、ホスホロチオエート以外の連結基、例えばホスホジエステル結合を含み得る。

【0176】

オリゴマー中の連結基は、標的となるRNAのRNase Hによる切断を可能とするように、ホスホジエステル、ホスホロチオエートまたはボラノホスフェートであり得る。ヌクレアーゼ抵抗性の改善および他の理由、例えば製造の容易性のために、ホスホロチオエートが好ましい。

【0177】

本発明のオリゴマーの一態様において、ヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似体はホスホロチオエート基によって互いに結合している。

【0178】

ホスホジエステル結合、例えば1個または2個の結合を、それでなければホスホロチオエートオリゴマーである中に、特に（典型的には領域Aおよび/またはC内）のヌクレオチド類似体単位間もしくはこれに隣接して含めることで、オリゴマーのバイオアベイラビリティおよび/または生体内分布(bio-distribution)を改変し得ることが認識される - 国際公開第2008/053314号（参照により本明細書に組み入れる）を参照のこと。

【0179】

いくつかの実施形態、例えば上記した実施形態において、好適であり、かつ特に示さない場合は、残りの全ての連結基はホスホジエステルもしくはホスホロチオエート、またはその混合である。

【0180】

いくつかの実施形態において、全てのヌクレオチド間結合基がホスホロチオエートである。

【0181】

特定のギャップマーオリゴヌクレオチド配列、例えば本明細書において提示するものについて言及する場合、種々の実施形態において、特にヌクレオチド類似体、例えばLNA単位間の結合については、結合がホスホロチオエート結合である場合には、別の結合、例えば本明細書において開示するものを使用することができ、例えばリン酸（ホスホジエステル）結合を使用することができることは理解されるであろう。同様に、特定のギャップマ

10

20

30

40

50

ーオリゴヌクレオチド配列、例えば本明細書において提示するものについて言及する場合、C残基が5'メチル修飾したシトシンとして注釈をつけている場合には、種々の実施形態において、オリゴマー中に存在する1個以上のCは修飾されていないC残基であり得る。

【0182】

オリゴマー化合物

本発明のオリゴマーは、実施例8の表4に示すように、配列番号169～196および234よりなる群から選択することができる。

【0183】

コンジュゲート

本明細書の文脈において、用語「コンジュゲート」は、本明細書に記載するオリゴマーの1個以上の非ヌクレオチド/非ヌクレオチド類似体（すなわち非核酸塩基）または非ポリヌクレオチド部分への共有結合（「コンジュゲーション」）によって形成するヘテロ分子を示すことが意図される。非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分の例としては、高分子物質、例えばタンパク質、脂肪酸鎖、糖残基、糖タンパク質、ポリマー、またはその組み合わせが挙げられる。典型的には、タンパク質は標的タンパク質の抗体であり得る。典型的なポリマーはポリエチレングリコールであり得る。

【0184】

従って、種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは、典型的には核酸塩基の連続配列からなるポリヌクレオチド領域、すなわちヌクレオチド/核酸塩基領域、および更なる非ヌクレオチド領域の双方を含み得る。連続核酸塩基配列からなる本発明のオリゴマーについて言及する場合、化合物は、非ヌクレオチド/非核酸塩基成分、例えばコンジュゲート成分を含み得る。

【0185】

本発明の種々の実施形態において、オリゴマー化合物は、リガンド/コンジュゲートに連結し、例えばオリゴマー化合物の細胞への取り込みを増大させるために使用することができる。国際公開第2007/031091号は好適なリガンドおよびコンジュゲートを提示しており、これらを参照により本明細書に組み入れる。

【0186】

本発明はまた、本明細書に記載した本発明に係る化合物と、該化合物に共有結合した少なくとも1個の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分とを含むコンジュゲートを提供する。従って、本発明の化合物が本明細書において開示したような特定の核酸または核酸塩基配列からなる種々の実施形態において、化合物は、該化合物に共有結合した（例えば1個以上のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含まない）少なくとも1個の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分を含み得る。

【0187】

コンジュゲートは本発明のオリゴマーの活性、細胞内分布または細胞への取り込みを増大させ得る。このような部分としては、限定するものではないが、抗体、ポリペプチド、コレステロール部分等の脂質部分、コール酸、チオエーテル、例えばヘキシル-s-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールもしくはウンデシル残基、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールもしくはトリエチルアンモニウム 1,2-ジ-o-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-h-ホスホネート、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、オクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が挙げられる。

【0188】

本発明のオリゴマーは、活性薬剤物質、例えばアスピリン、イブプロフェン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗細菌剤または抗生物質にコンジュゲートさせることもできる。

【0189】

種々の実施形態において、コンジュゲートする部分は、例えばコレステロール等のステロールである。

【0190】

10

20

30

40

50

種々の実施形態において、コンジュゲートする部分は、正に荷電したポリマー、例えば長さが1~50、例えば2~20、例えば3~10個のアミノ酸残基の正に荷電したペプチド、および/またはポリエチレングリコール(PEG)もしくはポリプロピレングリコール等のポリアルキレンオキシドを含むか、またはこれよりなる - 参照により本明細書に組み入れる国際公開第2008/034123号を参照のこと。好適には、正に荷電したポリマー、例えばポリアルキレンオキシドは、国際公開第2008/034123号に記載されている放出可能リンカー等のリンカーを介して本発明のオリゴマーに結合させることができる。

【0191】

活性化オリゴマー

本明細書において使用する用語「活性化オリゴマー」は、オリゴマーを1個以上のコンジュゲート部分、すなわちそれ自体は核酸もしくはモノマーではない部分に共有結合させて本明細書に記載のコンジュゲートを形成することを可能とする、少なくとも1個の官能性部分に共有結合している(すなわち官能化された)本発明のオリゴマーをいう。典型的には、官能性部分は、例えばアデニン塩基の3'-水酸基または環外NH₂基を介してオリゴマーに共有結合させることができる化学基、好ましくは親水性であるスパーサー、およびコンジュゲート部分(例えばアミノ、スルフヒドリルまたは水酸基)に結合することができる末端基を含むであろう。いくつかの実施形態において、この末端基は保護されず、例えばNH₂基である。別の実施形態において、末端基は、例えば「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」Theodora W GreeneおよびPeter G M Wuts, 第3版(John Wiley & Sons, 1999)に記載されたような任意の好適な保護基によって保護される。好適な水酸基保護基の例として、エステル、例えば酢酸エステル、アラアルキル基、例えばベンジル、ジフェニルメチル、またはトリフェニルメチル、およびテトラヒドロピラニルが挙げられる。好適なアミノ保護基の例としては、ベンジル、 α -メチルベンジル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、およびトリクロロアセチルもしくはトリフルオロアセチル等のアシル基が挙げられる。いくつかの実施形態において、官能性部分は自己切断(self-cleaving)するものである。別の実施形態において、官能性部分は生分解性である。例えば、参照により全体として本明細書に組み入れる、米国特許第7,087,229号を参照のこと。

【0192】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴマーは、オリゴマーの5'末端へのコンジュゲート部分の共有結合を可能とするために5'末端が官能化されている。別の実施形態において、本発明のオリゴマーは、3'末端が官能化されていても良い。更に別の実施形態において、本発明のオリゴマーは、骨格に沿って、または複素環の塩基部分上で官能化されていても良い。更に別の実施形態において、本発明のオリゴマーは、5'末端、3'末端、骨格および塩基から独立して選択される2つ以上の位置で官能化されていても良い。

【0193】

いくつかの実施形態において、本発明の活性化オリゴマーは、官能性部分に共有結合する1個以上のモノマーを合成時に組み込むことによって合成する。別の実施形態において、本発明の活性化オリゴマーは、官能化されていないモノマーを用いて合成され、合成終了後にオリゴマーを官能化する。いくつかの実施形態において、オリゴマーはアミノアルキルリンカーを含むヒンダード(hindered)エステルで官能化され、ここでアルキル部分は式(CH₂)_wを有し、wは1~10の整数、好ましくは約6であり、アルキルアミノ基のアルキル部分は直鎖であっても分岐鎖であっても良く、そして官能基はエステル基を介してオリゴマーに結合する(-O-C(O)-(CH₂)_wNH)。

【0194】

別の実施形態において、オリゴマーは(CH₂)_w-スルフヒドリル(SH)リンカーを含むヒンダードエステルで官能化され、ここでwは1~10の整数、好ましくは約6であり、アルキルアミノ基のアルキル部分は直鎖であっても分岐鎖であっても良く、官能基はエステル基を介してオリゴマーに結合する(-O-C(O)-(CH₂)_wSH)。

【0195】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、スルフヒドリル-活性化オリゴヌクレオチドを、ポリエチレングリコールまたはペプチド等のポリマー部分と（ジスルフィド結合の形成を介して）コンジュゲートさせる。

【0196】

上記のヒンダードエステルを含む活性化オリゴマーは、当分野において公知の任意の方法によって、特に国際公開第2008/034122号およびその実施例（参照によりその全体を本明細書に組み入れる）に開示された方法によって合成することができる。

【0197】

更に別の実施形態において、本発明のオリゴマーは、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に実質的に記載されたような官能化試薬、すなわち一方の末端にホスホロアミダイトを有し、保護されているか、もしくは保護されていないスルフヒドリル、アミノまたは水酸基を含む他方の末端に親水性スペーサー鎖を介して結合している実質的に直鎖状の試薬を使用して、オリゴマーにスルフヒドリル、アミノまたは水酸基を導入することによって官能化される。こうした試薬は主としてオリゴマーの水酸基と反応する。いくつかの実施形態において、こうした活性化オリゴマーは、オリゴマーの5'-水酸基に結合した官能化試薬を有する。別の実施形態において、活性化オリゴマーは、3'-水酸基に結合した官能化試薬を有する。更に別の実施形態において、本発明の活性化オリゴマーは、オリゴマーの骨格上の水酸基に結合した官能化試薬を有する。更なる実施形態において、本発明のオリゴマーは、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号（参照によりその全体を本明細書に組み入れる）に記載されたような2種以上の官能化試薬で官能化される。このような官能化試薬の合成およびこれらをモノマーもしくはオリゴマー中に組み入れる方法は、米国特許第4,962,029号および第4,914,210号に開示されている。

【0198】

いくつかの実施形態において、固相結合オリゴマーの5'-末端をジエニルホスホロアミダイト誘導体で官能化し、続いて脱保護されたオリゴマーを、ディールス・アルダー環化付加反応によって、例えばアミノ酸またはペプチドとコンジュゲートさせる。

【0199】

種々の実施形態において、2'-糖修飾を含むモノマー、例えば2'-カルバメート置換された糖または2'-(O-ペンチル-N-フタルイミド)-デオキシリボース糖をオリゴマー中に組み込むことによって、コンジュゲート部分のオリゴマーの糖への共有結合が容易になる。別の実施形態において、1個以上のモノマーの2'位にアミノ含有リンカーを有するオリゴマーを、例えば5'-ジメトキシトリチル-2'-O-(e-フタルイミジルアミノペンチル)-2'-デオキシアデノシン-3'-N,N-ジイソプロピル-シアノエトキシホスホロアミダイト等の試薬を用いて調製する。例えばManoharan等, Tetrahedron Letters, 1991, 34, 7171を参照のこと。

【0200】

更に別の実施形態において、本発明のオリゴマーは、アミン含有官能性部分を核酸塩基上、例えばプリンアミノ基のN6上、グアニンの環外N2上、またはシトシンのN4もしくは5位に有し得る。種々の実施形態において、このような官能化は、オリゴマー合成において既に官能化されている市販の試薬を使用して達成することができる。

【0201】

いくつかの官能性部分は市販されており、例えばヘテロ二官能性およびホモ二官能性の連結部分はPierce Co. (Rockford, Ill.)から入手可能である。他の市販の連結基は5'-アミノ-修飾剤C6および3'-アミノ-修飾剤試薬である（いずれもGlen Research Corporation (Sterling, Va.)から入手可能）。5'-アミノ-修飾剤C6はABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.)からもアミノリンク-2として入手可能であり、3'-アミノ-修飾剤はClontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Calif.)からも入手可能である。

【0202】

組成物

本発明のオリゴマーは、医薬製剤および組成物において使用することができる。好適に

10

20

30

40

50

は、こうした組成物は、製薬上許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含有する。国際公開第2007/031091号には、好適かつ好ましい製薬上許容される希釈剤、担体およびアジュバントが提示されており、これらを参照により本明細書に組み入れる。好適な投与量、製剤、投与経路、組成物、投与形態、他の治療剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤も、国際公開第2007/031091号に提示されており、これらも参照により本明細書に組み入れる。

【0203】

本明細書において使用する用語「製薬上許容される塩」は、本明細書において同定する化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性を最小限に示す塩をいう。このような塩の非限定的な例は有機アミノ酸とで形成することができ、また亜鉛、カルシウム、ピスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム、ナトリウム、カリウム等の金属カチオン、またはアンモニア、N,N'-ジベンジルエチレン-ジアミン、D-グルコサミン、テトラエチルアンモニウム、もしくはエチレンジアミンから形成されるカチオンと共に形成される塩基付加塩；または(c) (a)および(b)の組み合わせ；例えば亜鉛タンニン酸塩等である。

【0204】

応用

本発明のオリゴマーは、例えば診断学、治療学および予防法のための研究試薬として利用することができる。

【0205】

研究において、このようなオリゴマーを使用し、細胞および実験動物におけるHER3タンパク質の発現または合成を（典型的にはmRNAを分解もしくは阻害し、それによってタンパク質形成を抑制することによって）特異的に阻害し、それによって標的の機能解析または治療的介入のための標的としてのその有用性評価を容易にすることができる。

【0206】

診断学においては、オリゴマーを使用して、ノーザンブロッティング、in-situハイブリダイゼーションまたは類似の技術によって細胞および組織におけるHER3発現を検出および定量することができる。

【0207】

治療学においては、HER3（および場合によってHER2および／もしくはEGFR）の発現をモジュレートすることによって治療できる疾患または障害を有するおそれのある動物またはヒトを、オリゴマー化合物、例えば有効量のオリゴマー（またはそのコンジュゲート）を本発明に従って投与することによって治療する。更に、治療的もしくは予防的有効量の1種以上の本発明のオリゴマーまたは組成物を投与することによって、HER3の発現に関連した疾患または状態を有するおそれがあるか、またはその傾向がある哺乳動物を治療する、例えばヒトを治療する方法が提供される。

【0208】

本発明はまた、本明細書で言及する障害の治療のための医薬の製造のための、または本明細書で言及する障害の治療方法のための、記載の本発明の化合物またはコンジュゲートの使用を提供する。

【0209】

本発明はまた、医薬として使用するための、本明細書に記載のオリゴマー、組成物またはコンジュゲートに関する。好適には、本発明の方法に言及する場合、本発明のオリゴマーまたはコンジュゲートの投与は、有効量のオリゴマーまたはコンジュゲート、例えば治療を提供するために有効な量、または1個もしくは複数の細胞におけるHER3発現を阻害またはダウンレギュレートするために有効な量を投与することによって実施される。

【0210】

本発明はまた、本明細書で言及する障害を治療するための方法であって、本明細書に記載の本発明に係る化合物、および／または本発明に係るコンジュゲート、および／または本発明に係る医薬組成物を、その必要のある患者に投与することを含む、該方法を提供す

10

20

30

40

50

る。

【0211】

種々の実施形態において、オリゴマー、またはそのコンジュゲートは、例えば標的核酸への水素結合による結合を通じて、ヒトにおいて所望の治療効果を誘導する。オリゴマー、またはそのコンジュゲートは、標的mRNAへの水素結合（ハイブリダイゼーション）を介して標的の発現の低下（阻害）を引き起こし、それによって遺伝子発現の低下を生じさせる。本明細書に開示したオリゴマー化合物およびコンジュゲートが非治療的応用、例えば診断的応用を有し得ることも認識される。

【0212】

種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは、それが導入される細胞、例えば癌細胞、例えば本明細書において言及する（例えば本明細書において開示するカスパーゼアッセイにおける）細胞系においてアポトーシスを誘導することができる。しかしながら、種々の実施形態において、本発明のオリゴマーは、例えばカスパーゼアッセイで測定して、アポトーシスを誘導しない場合がある。この点において、アポトーシスは細胞、例えば癌細胞を効果的に殺すために望ましい場合があるが、種々の実施形態において、非標的細胞および組織に対するより毒性の高い効果とマイナスに関連し得る。従って、治療される医学的適応に応じて、アポトーシスを誘発するのに非常に有効なオリゴヌクレオチドを選択することが有益である場合があり、一方、おそらくは医学的適応が直ちに生命を脅かすものでない場合には、アポトーシスを誘発する上でそれ程強力でないオリゴマーが適切である場合がある。

【0213】

医学的適応 (indications)

本明細書において言及する過剰増殖性障害は、種々の実施形態において、癌である。より具体的な実施形態において、癌は、以下よりなる群から選択される：リンパ腫および白血病（例えば非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、急性白血病、例えば急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫）、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、子宮頸癌、睾丸癌、肺癌、膀胱癌、黒色腫、頭部および頸部の癌、脳腫瘍、原発巣不明癌、新生物、末梢神経系の癌、中枢神経系の癌、種々の型の腫瘍（例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、小細胞肺癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、および網膜芽腫）、重鎖病、転移、または制御されていないか、もしくは異常な細胞増殖を特徴とする任意の疾患または障害。

【0214】

特定の実施形態において、癌は、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、および脳腫瘍よりなる群から選択される。

【0215】

本発明に従い、このような疾患または状態の治療は、1種以上の他の抗癌治療、例えば放射線療法、化学療法または免疫療法と組み合わせることができる。

【0216】

種々の実施形態において、本明細書で用いる用語「治療」は、既に存在する疾患（例えば本明細書で言及する疾患または障害）の治療、または疾患の防止、すなわち予防の双方をいう。従って、本明細書において言及する治療が、種々の実施形態において、予防的なものであり得ることは認識されるであろう。

【0217】

一般的に言って、本発明の一態様は、異常なレベルのHER3と関連する状態に罹患しているか、または罹患しやすい哺乳動物を治療する方法であって、HER3を標的とする治療的有

10

20

30

40

50

効量のオリゴマー、例えば1種以上のLNA単位を含むオリゴマーを哺乳動物に投与することを含む、該方法に関する。

【0218】

本明細書で言及する疾患または障害は、種々の実施形態において、HER3遺伝子、またはそのタンパク質産物がHER3に関連するか、もしくは相互作用する遺伝子における突然変異と関連し得る。従って、種々の実施形態において、標的mRNAはHER3配列の変異した形態である。

【0219】

本発明の興味ある態様は、本明細書において言及する疾患、障害または状態の治療のための医薬の調製のための、本明細書で規定するオリゴマー（化合物）または本明細書で規定するコンジュゲートの使用に関する。

10

【0220】

本発明の方法は、異常なレベルのHER3によって引き起こされる疾患に対する治療または予防のために使用することができる。

【0221】

あるいはまた、種々の実施形態において、本発明は更に、本発明のオリゴマー、または本発明のコンジュゲートまたは本発明の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、異常なレベルのHER3を治療するための方法に関する。

【0222】

好適な投与量、製剤、投与経路、組成物、投与形態、他の治療剤との併用、プロドラッグ製剤は、国際公開第2007/031091号にも提示されており、参照により本明細書に組み入れられる。本発明はまた、本明細書に記載した化合物もしくはコンジュゲートまたはコンジュゲート、および製薬上許容される希釈剤、担体もしくはアジュバントを含有する医薬組成物を提供する。国際公開第2007/031091号は、好適かつ好ましい製薬上許容される希釈剤、担体およびアジュバントを提示しており、これらを参照により本明細書に組み入れる。

20

【0223】

本発明は更に、異常なレベルのHER3または変異型HER3（例えば対立遺伝子変異体、例えば本明細書で言及する疾患の一つと関連するもの）の発現の治療のための医薬の製造のための、本明細書で規定するオリゴマー（化合物）、組成物またはコンジュゲートの使用に関する。

30

【0224】

本発明はまた、医薬としての使用のための、本明細書において規定するオリゴマー、組成物またはコンジュゲートに関する。

【0225】

更に、本発明は、疾患または状態、例えば本明細書で言及するものに罹患した被験体を治療する方法に関する。

【0226】

治療を必要とする患者は、該疾患または障害に罹患しているか、または罹患するおそれのある患者である。

【0227】

本明細書において言及する疾患または障害は、種々の実施形態において、HER3遺伝子、またはそのタンパク質産物がHER3に関連するか、もしくは相互作用する遺伝子内の突然変異と関連し得る。従って、種々の実施形態において、標的mRNAはHER3配列の変異した形態であり、例えば1以上の点突然変異、例えば癌と関連するSNPを含み得る。

40

【0228】

本発明に係るオリゴマーおよび他の組成物は、HER3の過剰発現、またはその変異型の発現と関連した状態の治療のために使用することができる。HER3を用いた薬学的介入が、癌等の過剰増殖性障害、例えば本明細書において言及するものに対する治療の選択肢となるであろうことは、この分野における第一線の科学者によって示唆されている。

【0229】

50

本発明の一態様は、HER3を標的とし、1個以上のLNA単位を含む治療的有効量のオリゴマーを哺乳動物に投与することを含む、HER3、変異したHER3もしくは異常なレベルのHER3と関連する状態に罹患しているか、または罹患しやすい哺乳動物を治療する方法に関する。

【0230】

しかしながら、種々の実施形態において、例えば癌等の過剰増殖性障害等の本明細書で言及する状態は、必ずしもHER3またはHER3と関連する遺伝子産物の過剰発現と関連しない場合があることが認識される。

【0231】

本発明の一態様は、HER3（および場合によってHER2および／もしくはEGFR）を標的とし、1個以上のLNA単位を含む治療的有効量のオリゴマーを哺乳動物に投与することを含む、HER2、変異したHER2もしくは異常なレベルのHER2と関連する状態に罹患しているか、または罹患しやすい哺乳動物を治療する方法に関する。

10

【0232】

本発明の一態様は、HER3（および場合によってHER2および／もしくはEGFR）を標的とし、1個以上のLNA単位を含む治療的有効量のオリゴマーを哺乳動物に投与することを含む、EGFR、変異したEGFRもしくは異常なレベルのEGFRと関連する状態に罹患しているか、または罹患しやすい哺乳動物を治療する方法に関する。

【0233】

HER3における突然変異が異常なレベルのHER3活性につながる疾患の例は哺乳動物の悪性腫瘍である。従って、特定の一実施形態において、本発明に従って治療される癌は哺乳動物の癌である。

20

【0234】

本発明に従って言及する癌は、上記の形態の癌の1種から選択され得る。

【0235】

更に、本明細書に記載した本発明は、治療的有効量のHER3をモジュレートするオリゴマーを、こうした治療を必要とするヒトに投与することを含む、疾患の予防または治療方法を包含する。本発明は更に、HER3をモジュレートするオリゴヌクレオチド化合物の短期間投与の使用を包含する。

【0236】

あるいはまた、種々の実施形態において、本発明は更に、異常なレベルのHER3を治療するための方法であって、本発明のオリゴマー、または本発明のコンジュゲートまたは本発明の医薬組成物をそれを必要とする患者に投与することを含み、更に、更なる薬剤または更なる活性成分の投与を含む、該方法に関する。上記の更なる投与は、更なる薬剤または更なる活性成分が本発明の化合物にコンジュゲートされたものであっても、医薬組成物中に存在するものであっても、あるいは別個の製剤で投与するものであっても良い。

30

【0237】

本発明は更に、異常なレベルのHER3、またはHER3の変異形態（例えば対立遺伝子変異体、例えば本明細書において言及する疾患の一つと関連するもの）の発現の治療のための医薬の製造のための、本明細書で規定する化合物、組成物、またはコンジュゲートの使用に関する。

40

【0238】

治療を必要とする患者は、上記疾患または障害に罹患しているか、または罹患する可能性のある患者である。

【0239】

他のアンチセンスオリゴマーとの組み合わせ

本発明のオリゴマーがHER3、Her2および／またはEGFR標的を標的とし得ることは本明細書において認識される。従って、種々の実施形態において、本発明が、2種または3種の標的を標的とすることを可能とするか、または最適化する2種以上のオリゴマー、例えばHER3を標的とするオリゴマーおよびEGFRまたはHer2を標的とする第2のオリゴマー、あるいは更にHER3、Her2およびEGFR標的を、場合によって独立して標的とする3種のオリゴマーの

50

使用にすることが認識される。

【0240】

種々の実施形態において、本発明に係る医薬組成物は、Her2を標的とする更なる治療剤、例えばHer2 mRNAを標的とするアンチセンスオリゴマーを含んでも良い。

【0241】

同じかまたは異なる種々の実施形態において、本発明に係る医薬組成物は、EGFRを標的とする更なる治療剤、例えばEGFR mRNAを標的とするアンチセンスオリゴマーを含んでも良い。

【0242】

Her2またはEGFR mRNAを標的とする、ギャップマーおよびショートマー等のオリゴマー、およびそのコンジュゲートの構造に関しては、このようなオリゴマーがHer2またはEGFR mRNAの対応領域と相補的（または少なくとも80%相補）であるか、または場合によって該標的の対応領域に対して1、2、3、または4個のミスマッチを含むであろうという点を除き、種々の実施形態において、本発明に係るオリゴマーと同じ構造を有し得る（すなわち核酸塩基の特異的配列以外）。

10

【0243】

パーツのキット

本発明はまた、第1のパーツが本発明に係るオリゴマー、コンジュゲートおよび/または医薬組成物を含み、そして更なるパーツが更なる活性成分（すなわち本明細書で言及する更なる治療剤またはオリゴマー）、例えば本明細書において言及するものを含む、パーツのキットを提供する。従って、パーツのキットは、第1のパーツおよび更なるパーツの双方を、同時に、または順番に投与することを含む、本明細書において言及する治療方法において使用することができることが認識される。

20

【0244】

本発明はまた、第1のパーツが本発明に係るオリゴマー、コンジュゲートおよび/または医薬組成物を含み、そして更なるパーツがHer2および/またはEGFRの発現を低下させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、パーツのキットを提供する。従って、パーツのキットは、第1のパーツおよび更なるパーツの双方を、同時に、または順番に投与することを含む、本明細書において言及する治療方法において使用することができることが認識される。

30

【0245】

更なる実施形態

以下の実施形態も本発明の詳細な説明および概要に関し、請求の範囲で言及する実施形態を含む、それらで言及された本発明の実施形態と組み合わせることができる：

1. 配列番号197のHER3遺伝子またはその対立遺伝子の標的配列に結合し、HER3の発現をダウンレギュレートすることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、標的配列に対応する10～50個の核酸塩基の配列を含む、該オリゴヌクレオチド。

【0246】

2. 標的配列が配列番号1～140で示されるHER3遺伝子またはその対立遺伝子変異体の領域から選択される、実施形態1記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

【0247】

3. 配列番号1、16、17、18、19、34、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、74、75、76、91、92、107、122、137、138、139および140またはその対立遺伝子変異体に示される10～16個の核酸塩基の配列を含む、実施形態1または実施形態2記載のオリゴヌクレオチド。

【0248】

4. 配列番号1～140で示される配列のいずれか1つを含む、実施形態1～3のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。

【0249】

5. 配列番号141～196で示される、実施形態1～4のいずれか記載のオリゴヌクレオチ

50

ド。

【0250】

6. 上記オリゴヌクレオチドが更に、配列番号199のHER2遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体、および/または配列番号198のEGFR遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体の発現をダウンレギュレートできるものである、実施形態1記載のオリゴヌクレオチド。

【0251】

7. 上記オリゴヌクレオチドが、配列番号199のHER2遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体の発現をダウンレギュレートできるものであり、オリゴヌクレオチドが配列番号177または178で示される、実施形態6記載のオリゴヌクレオチド。

【0252】

8. 上記オリゴヌクレオチドが、配列番号198のEGFR遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体の発現をダウンレギュレートできるものであり、オリゴヌクレオチドが配列番号171または173で示される、実施形態6記載のオリゴヌクレオチド。

【0253】

9. 上記オリゴヌクレオチドが、配列番号199のHER2遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体、および配列番号198のEGFR遺伝子もしくはその対立遺伝子変異体の発現をダウンレギュレートすることができるものである、実施形態6記載のオリゴヌクレオチド。

【0254】

10. 上記オリゴヌクレオチドが配列番号169、170、172、174、175、176および179のいずれかによって示される、実施形態9記載のオリゴヌクレオチド。

【0255】

11. 上記核酸塩基配列が、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、およびボラノホスフェートから独立して選択される核酸塩基間結合を含む、実施形態1～10のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。

【0256】

12. 上記核酸塩基の少なくとも2個がヌクレオチド類似体である、実施形態1～11のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。

【0257】

13. 上記核酸塩基の配列が、5'から3'方向へ(i) 領域A: 2～4個のヌクレオチド類似体のストレッチ、続いて(ii) 領域B: 領域Aのものとは異なる6～11個のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体のストレッチ、続いて(iii) 領域C: 2～4個のヌクレオチド類似体のストレッチ、および場合によって続いて(iv) 領域D: 1個もしくは2個のヌクレオチド、を含む、実施形態5記載のオリゴヌクレオチド。

【0258】

14. 領域Aが、2個のヌクレオチド類似体単位の間、および/またはヌクレオチド類似体単位および領域Bの核酸塩基単位の間、少なくとも1個のホスホジエステル結合を含む、実施形態13記載のオリゴヌクレオチド。

【0259】

15. 領域Cが、2個のヌクレオチド類似体単位の間、および/またはヌクレオチド類似体単位および領域Bの核酸塩基単位の間、少なくとも1個のホスホジエステル結合を含む、実施形態13または実施形態14記載のオリゴヌクレオチド。

【0260】

16. 全ての核酸塩基間結合がホスホロチオエートである、実施形態1～11のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。

【0261】

17. 上記ヌクレオチド類似体単位が、2'-O-アルキル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、ロックされた核酸(LNA)、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、HNA、挿入核酸(INA)および2'-MOEから独立して選択される、実施形態12～16のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。

【0262】

10

20

30

40

50

18. ヌクレオチド類似体が2'-MOE-RNA、2'-フルオロ-DNA、およびLNAから独立して選択される、実施形態17記載のオリゴヌクレオチド。

【0263】

19. 上記ヌクレオチド類似体の少なくとも1個がロックされた核酸(LNA)である、実施形態18記載のオリゴヌクレオチド。

【0264】

20. 全てのヌクレオチド類似体がLNAである、実施形態19記載のオリゴヌクレオチド。

【0265】

21. LNAが -D-オキシ-LNA、 -L-オキシ-LNA、 -D-アミノ-LNAおよび -D-チオ-LNAから選択される、実施形態17~20のいずれか記載のオリゴヌクレオチド。 10

【0266】

22. 実施形態1~21のいずれか記載のオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドに共有結合した少なくとも1個の非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分を含むコンジュゲート。

【0267】

23. 上記非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分がステロール基、例えばコレステロールからなるか、またはこれを含む、実施形態22記載のコンジュゲート。

【0268】

24. 実施形態1~21のいずれか記載のオリゴヌクレオチド、または実施形態22もしくは実施形態23記載のコンジュゲート、および製薬上許容される希釈剤、担体もしくはアジュバントを含有する医薬組成物。 20

【0269】

25. 医薬として使用するための、実施形態1~23のいずれか記載のオリゴヌクレオチドまたはコンジュゲート。

【0270】

26. 異常なレベルのHER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFR、またはHER3および/もしくはHER2および/もしくはEGFR発現のダウンレギュレーションが指示される疾患もしくは状態の治療のための医薬の製造のための、実施形態1~23のいずれか記載のオリゴヌクレオチドまたはコンジュゲートの使用。 30

【0271】

27. 上記疾患または状態が癌である、実施形態26記載の使用。

【0272】

28. 実施形態1~24のいずれか記載の医薬組成物、オリゴヌクレオチドまたはコンジュゲートを、それを必要とする被験体に投与する段階を含む、癌に罹患した被験体の治療方法。

【0273】

29. 癌が乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌および脳腫瘍から選択される、実施形態27または28の使用または方法。

【0274】

30. 標的配列に対応するアンチセンスオリゴヌクレオチドがHER3の発現をダウンレギュレートすることができる、HER3遺伝子内の該標的配列。 40

【0275】

31. 標的配列が配列番号1~140に対して相補的なHER3遺伝子またはその対立遺伝子変異体の領域から選択される、実施形態30記載の標的配列。

【0276】

32. 細胞を実施形態1~21のいずれか記載のオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、細胞におけるHER3の発現をダウンレギュレートする方法。

【実施例】

【0277】

実施例1：モノマーの合成

LNAモノマービルディングブロックおよび誘導体は、公表された方法およびその引用文献に従って調製した - 国際公開第07/031081号およびその引用文献を参照のこと。

【0278】

実施例2：オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドは、国際公開第07/031081号に記載された方法に従って合成した。

表1は本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドモチーフの例を示す。

【0279】

実施例3：オリゴヌクレオチドの設計

本発明に従い、ヒトHER3（Genbank登録番号 NM_001982、本明細書において配列番号197 10
として示す）に加え、ヒトEGFR（Genbank登録番号 NM_005228、本明細書において配列番号198として示す）およびヒトHER2（Genbank登録番号 NM_004448、本明細書において配列番号199として示す）の種々の領域を標的とするために、一連の種々のオリゴヌクレオチドを設計した。

【0280】

表1：本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列

配列番号1～50、53、139および140は、ヒトHER3に加えてヒトEGFRおよびヒトHER2を標的とするために設計されたオリゴ配列である。HER3、EGFRおよびHER2との配列相同性（％）を示す。オリゴはEGFRに対して0～2個のミスマッチ、HER2に対して1～2個のミスマッチを有する。 20

【表 1】

表 1 - アンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (モチーフ)					
配列番号	配列 (5'-3')	鎖長 (塩基)	標的部位 HER3	EGFR との 相補性	HER2 との 相補性
配列番号 1	GCTCCAGACATCACTC	16	2866 - 2881	100%	87.5%
配列番号 2	GCTCCAGACATCACT	15			
配列番号 3	CTCCAGACATCACTC	15			
配列番号 4	GCTCCAGACATCAC	14			
配列番号 5	CTCCAGACATCACT	14			
配列番号 6	TCCAGACATCACTC	14			
配列番号 7	GCTCCAGACATCA	13			
配列番号 8	CTCCAGACATCAC	13			
配列番号 9	TCCAGACATCACT	13			
配列番号 10	CCAGACATCACTC	13			
配列番号 11	GCTCCAGACATC	12			
配列番号 12	CTCCAGACATCA	12			
配列番号 13	TCCAGACATCAC	12			
配列番号 14	CCAGACATCACT	12			
配列番号 15	CAGACATCACTC	12			
配列番号 16	CTCCAGACATCACTCT	16	2865 - 2880	100%	93.8%
配列番号 17	CAGACATCACTCTGGT	16	2862 - 2877	100%	93.8%
配列番号 18	AGACATCACTCTGGTG	16	2861 - 2876	100%	93.8%
配列番号 19	ATAGCTCCAGACATCA	16	2869 - 2884	93.8%	87.5%
配列番号 20	ATAGCTCCAGACATC	15			
配列番号 21	TAGCTCCAGACATCA	15			
配列番号 22	ATAGCTCCAGACAT	14			
配列番号 23	TAGCTCCAGACATC	14			
配列番号 24	AGCTCCAGACATCA	14			
配列番号 25	ATAGCTCCAGACA	13			
配列番号 26	TAGCTCCAGACAT	13			
配列番号 27	AGCTCCAGACATC	13			
配列番号 28	GCTCCAGACATCA	13			
配列番号 29	ATAGCTCCAGAC	12			

表 1 - アンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (モチーフ)

配列番号	配列 (5'-3')	鎖長 (塩基)	標的部位 HER3	EGFR との 相補性	HER2 との 相補性
配列番号 30	TAGCTCCAGACA	12			
配列番号 31	AGCTCCAGACAT	12			
配列番号 32	GCTCCAGACATC	12			
配列番号 33	CTCCAGACATCA	12			
配列番号 34	TCACACCATAGCTCCA	16	2876 - 2891	87.5%	93.8%
配列番号 35	TCACACCATAGCTCC	15			
配列番号 36	CACACCATAGCTCCA	15			
配列番号 37	TCACACCATAGCTC	14			
配列番号 38	CACACCATAGCTCC	14			
配列番号 39	ACACCATAGCTCCA	14			
配列番号 40	TCACACCATAGCT	13			
配列番号 41	CACACCATAGCTC	13			
配列番号 42	ACACCATAGCTCC	13			
配列番号 43	CACCATAGCTCCA	13			
配列番号 44	TCACACCATAGC	12			
配列番号 45	CACACCATAGCT	12			
配列番号 46	ACACCATAGCTC	12			
配列番号 47	CACCATAGCTCC	12			
配列番号 48	ACCATAGCTCCA	12			
配列番号 49	CATCCAACACTTGACC	16	3025 - 3040	93.8%	93.8%
配列番号 50	ATCCAACACTTGACCA	16	3024 - 3039	93.8%	93.8%
配列番号 51	CAATCATCCAACACTT	16	3029 - 3044	87.5%	93.8%
配列番号 52	TCAATCATCCAACACT	16	3030 - 3045	87.5%	93.8%
配列番号 53	CATGTAGACATCAATT	16	3004 - 3019	87.5%	93.8%
配列番号 54	TAGCCTGTCACTTCTC	16	435 - 450	68.8%	75%
配列番号 228	TAGCCTGTCACTTCT	15			
配列番号 229	AGCCTGTCACTTCTC	15			
配列番号 230	TAGCCTGTCACTTC	14			
配列番号 231	AGCCTGTCACTTCT	14			
配列番号 232	TAGCCTGTCACTT	13			

10

20

30

40

表 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (モチーフ)

配列番号	配列 (5'-3')	鎖長 (塩基)	標的部位 HER3	EGFR との 相補性	HER2 との 相補性
配列番号 233	TAGCCTGTCACT	12			
配列番号 55	AGATGGCAAACCTCCC	16	530 - 545	68.8%	68.8%
配列番号 56	CAAGGCTCACACATCT	16	1146 - 1161	75%	68.8%
配列番号 57	AAGTCCAGGTGCCCA	16	1266 - 1281	75%	75%
配列番号 58	CATTCAAGTTCTTCAT	16	1490 - 1505	75%	68.8%
配列番号 59	CACTAATTCCTTCAG	16	1529 - 1544	81.3%	68.8%
配列番号 60	CACTAATTCCTTCA	15			
配列番号 61	ACTAATTCCTTCAG	15			
配列番号 62	CACTAATTCCTTC	14			
配列番号 63	ACTAATTCCTTCA	14			
配列番号 64	CTAATTCCTTCAG	14			
配列番号 65	CACTAATTCCTT	13			
配列番号 66	ACTAATTCCTTC	13			
配列番号 67	CTAATTCCTTCA	13			
配列番号 68	TAATTCCTTCAG	13			
配列番号 69	CACTAATTCCT	12			
配列番号 70	ACTAATTCCTT	12			
配列番号 71	CTAATTCCTTC	12			
配列番号 72	TAATTCCTTCA	12			
配列番号 73	AATTCCTTCAG	12			
配列番号 74	GCCCAGCACTAATTC	16	1535 - 1550	75%	68.8%
配列番号 75	CTTGCCCTCTGCCAC	16	1673 - 1688	75%	75%
配列番号 76	CACACACTTTGCCCTC	16	1679 - 1694	68.8%	75%
配列番号 77	CACACACTTTGCCCT	15			
配列番号 78	ACACACTTTGCCCTC	15			
配列番号 79	CACACACTTTGCCC	14			
配列番号 80	ACACACTTTGCCCT	14			
配列番号 81	CACACTTTGCCCTC	14			
配列番号 82	CACACACTTTGCC	13			
配列番号 83	ACACACTTTGCCC	13			

10

20

30

40

表 1 - アンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (モチーフ)

配列番号	配列 (5'-3')	鎖長 (塩基)	標的部位 HER3	EGFR との 相補性	HER2 との 相補性
配列番号 84	CACACTTTGCCCT	13			
配列番号 85	ACACTTTGCCCTC	13			
配列番号 86	CACACACTTTGC	12			
配列番号 87	ACACACTTTGCC	12			
配列番号 88	CACACTTTGCCC	12			
配列番号 89	ACACTTTGCCCT	12			
配列番号 90	CACACTTTGCCCTC	12			
配列番号 91	CAGTTCCAAAGACACC	16	2345 - 2360	75%	68.8%
配列番号 92	TGGCAATTTGTACTCC	16	2636 - 2651	75%	68.8%
配列番号 93	TGGCAATTTGTACTC	15			
配列番号 94	GGCAATTTGTACTCC	15			
配列番号 95	TGGCAATTTGTACT	14			
配列番号 96	GGCAATTTGTACTC	14			
配列番号 97	GCAATTTGTACTCC	14			
配列番号 98	TGGCAATTTGTAC	13			
配列番号 99	GGCAATTTGTACT	13			
配列番号 100	GCAATTTGTACTC	13			
配列番号 101	CAATTTGTACTCC	13			
配列番号 102	TGGCAATTTGTA	12			
配列番号 103	GGCAATTTGTAC	12			
配列番号 104	GCAATTTGTACT	12			
配列番号 105	CAATTTGTACTC	12			
配列番号 106	AATTTGTACTCC	12			
配列番号 107	GTGTGTGTATTCCCA	16	2848 - 2863	75%	68.8%
配列番号 108	GTGTGTGTATTCCC	15			
配列番号 109	TGTGTGTATTCCCA	15			
配列番号 110	GTGTGTGTATTCC	14			
配列番号 111	TGTGTGTATTCCC	14			
配列番号 112	GTGTGTATTCCCA	14			
配列番号 113	GTGTGTGTATTTC	13			

10

20

30

40

表 1 - アンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (モチーフ)					
配列番号	配列 (5'-3')	鎖長 (塩基)	標的部位 HER3	EGFR との 相補性	HER2 との 相補性
配列番号 114	TGTGTGATTTCC	13			
配列番号 115	GTGTGTATTTCCC	13			
配列番号 116	TGTGTATTTCCCA	13			
配列番号 117	GTGTGTGTATTT	12			
配列番号 118	TGTGTGTATTTTC	12			
配列番号 119	GTGTGTATTTCC	12			
配列番号 120	TGTGTATTTCCC	12			
配列番号 121	GTGTATTTCCCA	12			
配列番号 122	CCCTCTGATGACTCTG	16	3474 - 3489	68.8%	68.8%
配列番号 123	CCCTCTGATGACTCT	15			
配列番号 124	CCTCTGATGACTCTG	15			
配列番号 125	CCCTCTGATGACTC	14			
配列番号 126	CCTCTGATGACTCT	14			
配列番号 127	CTCTGATGACTCTG	14			
配列番号 128	CCCTCTGATGACT	13			
配列番号 129	CCTCTGATGACTC	13			
配列番号 130	CTCTGATGACTCT	13			
配列番号 131	TCTGATGACTCTG	13			
配列番号 132	CCCTCTGATGAC	12			
配列番号 133	CCTCTGATGACT	12			
配列番号 134	CTCTGATGACTC	12			
配列番号 135	TCTGATGACTCT	12			
配列番号 136	CTGATGACTCTG	12			
配列番号 137	CATACTCCTCATCTTC	16	3770 - 3785	81.3%	81.3%
配列番号 138	CCACCACAAAGTTATG	16	1067 - 1082	81.3%	68.8%
配列番号 139	CATCACTCTGGTGTGT	16	2858 - 2873	93.8%	93.8%
配列番号 140	GACATCACTCTGGTGT	16	2860 - 2875	93.8%	87.5%

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

表2は、本発明のオリゴマーを設計することができる24量体の配列モチーフを示す - 太字は表1に示す16量体の配列モチーフを示す。

【表 2】

表 2 - HER3 24 量体配列モチーフ		
16 量体の配列番号	16 量体を含む対応 24 量体の配列	24 量体の配列番号
配列番号 1	catagctccagacatcactctggt	配列番号 200
配列番号 16	atagctccagacatcactctggtg	配列番号 201
配列番号 17	gctccagacatcactctggtgtgt	配列番号 202
配列番号 18	ctccagacatcactctggtgtgtg	配列番号 203
配列番号 19	caccatagctccagacatcactct	配列番号 204
配列番号 34	actgtcacaccatagctccagaca	配列番号 205
配列番号 49	caatcatccaacacttgaccatca	配列番号 206
配列番号 50	aatcatccaacacttgaccatcac	配列番号 207
配列番号 51	tcatcaatcatccaacacttgacc	配列番号 208
配列番号 52	ctcatcaatcatccaacacttgac	配列番号 209
配列番号 53	tcaccatgtagacatcaattgtgc	配列番号 210
配列番号 54	gacatagcctgtcactctctegaat	配列番号 211
配列番号 55	acgaagatggcaaacctcccatcg	配列番号 212
配列番号 56	cccacaaggctcacacatcttgag	配列番号 213
配列番号 57	cagaaagtccagggtgccaggat	配列番号 214
配列番号 58	gtgacattcaagttcttcatgatc	配列番号 215
配列番号 59	ccagcactaatttccttcaggat	配列番号 216
配列番号 74	atacgcccagcactaatttccttc	配列番号 217
配列番号 75	cacactttgccctctgccacgcag	配列番号 218
配列番号 76	gggtcacacactttgccctctgcc	配列番号 219
配列番号 91	tgcacagttccaaagacacccgag	配列番号 220
配列番号 92	cccttggcaatttgtactccccag	配列番号 221
配列番号 107	tctggtgtgtgtatttccaaagt	配列番号 222
配列番号 122	atgccctctgatgactctgatgc	配列番号 223
配列番号 137	tattcatactcctcatcttcatct	配列番号 224
配列番号 138	tgatccaccacaaagtatatgggga	配列番号 225
配列番号 139	cagacatcactctggtgtgtgtat	配列番号 226
配列番号 140	tccagacatcactctggtgtgtgt	配列番号 227

【 0 2 8 6 】

表3：本発明のオリゴヌクレオチドの設計

配列番号141-168において、大文字はヌクレオチド類似体単位を示し、下付きの「s」はホスホロチオエート結合を示す。小文字はヌクレオチド（DNA）単位を示す。「s」がないことは（もしあれば）ホスホジエステル結合を示す。

10

20

30

40

【表 3】

表 3 - オリゴマーの設計	
配列番号	配 列 (5'-3')
配列番号 141	G _S C _S T _S C _S C _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S C _S T _S C
配列番号 142	C _S T _S C _S C _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S C _S T _S C _S T
配列番号 143	C _S A _S G _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S G _S G _S T
配列番号 144	A _S G _S A _S c _S a _S t _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S g _S G _S T _S G
配列番号 145	A _S T _S A _S g _S c _S t _S c _S C _S a _S g _S a _S c _S a _S T _S C _S A
配列番号 146	T _S C _S A _S c _S a _S c _S C _S a _S t _S a _S g _S c _S t _S C _S C _S A
配列番号 147	C _S A _S T _S C _S C _S a _S a _S c _S a _S c _S t _S t _S g _S A _S C _S C
配列番号 148	A _S T _S C _S C _S a _S a _S c _S a _S c _S t _S t _S g _S a _S C _S C _S A
配列番号 149	C _S A _S A _S t _S c _S a _S t _S c _S C _S a _S a _S c _S a _S C _S T _S T
配列番号 150	T _S C _S A _S a _S t _S c _S a _S t _S c _S C _S a _S a _S c _S A _S C _S T
配列番号 151	C _S A _S T _S g _S t _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S A _S T _S T
配列番号 152	T _S A _S G _S c _S C _S t _S g _S t _S c _S a _S c _S t _S t _S C _S T _S C
配列番号 153	A _S G _S A _S t _S g _S g _S c _S a _S a _S c _S t _S t _S C _S C _S C
配列番号 154	C _S A _S A _S g _S g _S c _S t _S c _S a _S c _S a _S c _S a _S T _S C _S T
配列番号 155	A _S A _S G _S t _S c _S C _S a _S g _S g _S t _S t _S g _S c _S C _S C _S A

10

20

30

40

表 3 - オリゴマーの設計	
配列番号	配 列 (5'-3')
配列番号 156	C _s A _s T _s t _s c _s a _s a _s g _s t _s t _s c _s t _s t _s C _s A _s T
配列番号 157	C _s A _s C _s t _s a _s a _s t _s t _s t _s c _s c _s t _s t _s C _s A _s G
配列番号 158	G _s C _s C _s c _s a _s g _s c _s a _s c _s t _s a _s a _s t _s T _s T _s C
配列番号 159	C _s T _s T _s t _s g _s c _s c _s c _s t _s c _s t _s g _s c _s C _s A _s C
配列番号 160	C _s A _s C _s a _s c _s a _s c _s t _s t _s t _s g _s c _s c _s C _s T _s C
配列番号 161	C _s A _s G _s t _s t _s c _s c _s a _s a _s g _s a _s c _s A _s C _s C
配列番号 162	T _s G _s G _s c _s a _s a _s t _s t _s t _s g _s t _s a _s c _s T _s C _s C
配列番号 163	G _s T _s G _s t _s g _s t _s g _s t _s a _s t _s t _s c _s C _s C _s A
配列番号 164	C _s C _s C _s t _s c _s t _s g _s a _s t _s g _s a _s c _s t _s C _s T _s G
配列番号 165	C _s A _s T _s a _s c _s t _s c _s c _s t _s c _s a _s t _s c _s T _s T _s C
配列番号 166	C _s C _s A _s c _s c _s a _s c _s a _s a _s g _s t _s t _s A _s T _s G
配列番号 167	C _s A _s T _s c _s a _s c _s t _s c _s t _s g _s g _s t _s g _s T _s G _s T
配列番号 168	G _s A _s C _s a _s t _s c _s a _s c _s t _s c _s t _s g _s g _s T _s G _s T

10

20

30

40

50

【 0 2 8 8 】

実施例4：In vitroモデル：細胞培養

標的核酸の発現に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果は、標的核酸が測定可能なレベルで存在することを条件として、任意の種々の細胞型で試験することができる。標的は、内在的に、または該標的をコードする核酸の一過性もしくは安定なトランスフェクションによって発現させることができる。標的核酸の発現レベルは、例えばノーザンブロット解析、リアルタイムPCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して慣例的に決定

することができる。以下の細胞型を説明目的で提供するが、選択した細胞型において標的が発現することを条件として、他の細胞型を慣例的に使用することができる。

【0289】

細胞は、下記の適切な培地中で培養し、37℃、95～98%湿度および5%CO₂で維持した。細胞は通常通り週に2～3回継代した。

【0290】

15PC3：ヒト前立腺癌細胞系15PC3はDMEM (Sigma) + 10% ウシ胎児血清 (FBS) + 2mM Glutamax 1 + ゲンタマイシン (25 µg/ml) 中で培養した。

【0291】

HUH7：ヒト肝癌細胞系はDMEM (Sigma) + 10% ウシ胎児血清 (FBS) + 2mM Glutamax 1 + ゲンタマイシン (25 µg/ml) + 1× 非必須アミノ酸中で培養した。

【0292】

実施例5：In vitroモデル：アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理

細胞を、トランスフェクションベヒクルとしてカチオン性リポソーム製剤LipofectAMINE 2000 (Gibco) を使用してオリゴヌクレオチドで処理した。細胞を6ウェルの細胞培養用プレート (NUNC) にまき、80～90%コンフルエントの時点で処理した。使用したオリゴ濃度は最終濃度1nM～25nMの範囲であった。オリゴ-脂質複合体の製剤化は、無血清OptiMEM (Gibco) および最終脂質濃度5 µg/mLのLipofectAMINE 2000を使用し、本質的に使用説明書に記載の通りに実施した。細胞を37℃で4時間インキュベートし、オリゴ含有培地の除去によって処理を停止した。細胞を洗浄し、血清含有培地を添加した。オリゴ処理の後、RNA解析のために回収する前に、20時間かけて細胞を回復させた。

【0293】

実施例6：in vitroモデル：RNAの抽出およびcDNAの合成

上記のようにトランスフェクトした細胞から、Qiagen RNeasyキット (Qiagen cat. no. 74104) を使用説明書に従って使用して全RNAを抽出した。第1ストランドの合成はAmbion社のReverse Transcriptase試薬を使用説明書に従って使用して実施した。

【0294】

各サンプルについて、0.5 µgの全RNAをRNaseを含まないH₂Oで (10.8 µl) に調整し、2 µlのランダムデカマー (50 µM) および4 µlのdNTPミックス (それぞれ2.5mMのdNTP) と混合し、70℃で3分間加熱し、その後、氷上でサンプルを急冷した。サンプルを氷上で冷却した後、各サンプルに2 µlの10× Buffer RT、1 µlのMMLV Reverse Transcriptase (100 U/ µl) および0.25 µlのRNaseインヒビター (10U/ µl) を添加し、続いて42℃で60分間インキュベーションし、95℃、10分間で酵素を熱的に不活化し、次いでサンプルを4℃まで冷却した。

【0295】

実施例7：in vitroモデル：HER3、EGFRおよびHER2発現のオリゴヌクレオチド阻害のリアルタイムPCRによる解析

HER3、EGFRおよびHER2発現のアンチセンスモジュレーションは、当分野において公知の種々の方法でアッセイすることができる。例えば、HER3、EGFRおよびHER2 mRNAレベルは、例えばノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、またはリアルタイムPCRによって定量することができる。現在のところ、リアルタイム定量的PCRが好ましい。RNA解析は、全細胞RNAまたはmRNAで実施することができる。

【0296】

RNAの単離およびRNA解析の方法、例えばノーザンブロット解析は、当分野において慣用されており、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sonsに教示されている。

【0297】

リアルタイム定量的 (PCR) は、Applied Biosystem社から入手できる市販のマルチカラーリアルタイムPCR検出システムを使用して好都合に行うことができる。

【0298】

10

20

30

40

50

HER3、EGFRおよびHER2 mRNAレベルのリアルタイム定量的PCR解析

ヒトHER3、EGFRおよびHER2 mRNAのサンプル含量を、ヒトHER3、EGFRおよびHER2用のABI Prism Pre-Developed TaqMan アッセイ試薬 (Applied Biosystems cat. no. Hs00951444_m1 (HER3)、Hs00193306_m1 (EGFR)およびHs00170433_m1 (HER2)) を使用説明書に従って使用して定量した。

【0299】

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA量を、サンプル調製における変動を標準化するための内部対照として使用した。ヒトGAPDH mRNAのサンプル含量は、ヒトGAPDH用のABI Prism Pre-Developed TaqManアッセイ試薬 (Applied Biosystems cat. no. 4310884E) を使用説明書に従って使用して定量した。

10

【0300】

リアルタイム定量的PCRは当分野において周知の技術であり、例えばHeid等、リアルタイム定量的PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994に教示されている。

【0301】

リアルタイムPCR

実施例5に記載したように実施した第1ストランドの合成から得られたcDNAを、2~20倍に希釈し、Applied Biosystems社のTaqman 7500 FASTまたは7900 FASTを使用してリアルタイム定量的PCRによって解析した。プライマーおよびプローブを2x Taqman Fast Universal PCRマスターミックス(2x) (Applied Biosystems Cat.# 4364103) と混合し、4μlのcDNAに添加して最終体積を10μlとした。各サンプルを二重に (in duplicate) 解析した。当該RNAを発現する細胞系から精製した物質で調製したcDNAの2倍希釈をアッセイして、アッセイのための標準曲線を作成した。鋳型なしの対照のために、滅菌したH₂OをcDNAの代わりに使用した。PCRプログラム: 95℃で30秒間、続いて95℃で3秒間、60℃で20~30秒間を40サイクル。標的mRNA配列の相対量を、Applied Biosystems Fast System SDS Software Version 1.3.1.21.またはSDS Software Version 2.3を使用して、計算した閾値サイクル (Threshold cycle) から決定した。

20

【0302】

実施例8: in vitro解析: オリゴヌクレオチド化合物によるヒトHER3、EGFRおよびHER2発現のアンチセンス阻害

表3に示すオリゴヌクレオチドを、HER3、EGFRおよびHER2 mRNAを1、5および25nMの濃度でノックダウンする能力について、15PC3細胞 (または*で示すHUH-7) で評価した (図2、3、4および5を参照のこと)。配列番号235および236はスクランブルした対照である。

30

【0303】

表4: オリゴヌクレオチドによるヒトHER3、EGFRおよびHER2発現のアンチセンス阻害

表4中のデータは、モックトランスフェクト細胞に対する25nMでのmRNAのダウンレギュレーションのパーセンテージで示す。小文字はDNA単位を示し、太字の大文字は -D- オキシ-LNA単位を示す。全てのLNA Cは5'メチルCである。下付きの「s」はホスホロチオエート結合を示す。

【表 4】

表 4				
試験物質	配列 (5' 3')	HER3 阻害 (%)	EGFR 阻害 (%)	HER2 阻害 (%)
配列番号 169	G _S C _S T _S C _S C _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S C _S T _S C	93.4%	95.2%	75.8%
配列番号 170	C _S T _S C _S C _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S c _S T _S C _S T	85.8%	91.5%	65.8%
配列番号 171	C _S A _S G _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S G _S G _S T	70.6%	84.2%	2.8%
配列番号 172	A _S G _S A _S c _S a _S t _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S g _S G _S T _S G	84.2%	86.2%	61%
配列番号 173	A _S T _S A _S g _S c _S t _S c _S c _S a _S g _S a _S c _S a _S T _S C _S A	94.5%	96.4%	39.2%
配列番号 174	T _S C _S A _S c _S a _S c _S c _S a _S t _S a _S g _S c _S t _S C _S C _S A	88.8%	86.4%	94.8%
配列番号 175	C _S A _S T _S c _S c _S a _S a _S c _S a _S c _S t _S t _S g _S A _S C _S C	65.5%	86.1%	76.9%
配列番号 176	A _S T _S C _S c _S a _S a _S c _S a _S c _S t _S t _S g _S a _S C _S C _S A	61.6%	79.4%	74.8%
配列番号 177	C _S A _S A _S t _S c _S a _S t _S c _S c _S a _S a _S c _S a _S C _S T _S T	51.1%	0%	63.4%
配列番号 178	T _S C _S A _S a _S t _S c _S a _S t _S c _S c _S a _S a _S c _S A _S C _S T	76.7%	0%	88.6%
配列番号 179	C _S A _S T _S g _S t _S a _S g _S a _S c _S a _S t _S c _S a _S A _S T _S T	70.5%	52.6%	75.6%
配列番号 180	T _S A _S G _S c _S c _S t _S g _S t _S c _S a _S c _S t _S t _S C _S T _S C	92.8%	N. D.	N. D.
配列番号 181	A _S G _S A _S t _S g _S g _S c _S a _S a _S a _S c _S t _S t _S C _S C _S C	90.6%	N. D.	N. D.
配列番号 182	C _S A _S A _S g _S g _S c _S t _S c _S a _S c _S a _S c _S a _S T _S C _S T	74.6%	N. D.	N. D.
配列番号 183	A _S A _S G _S t _S c _S c _S a _S g _S g _S t _S t _S g _S c _S C _S C _S A	85.9%	N. D.	N. D.

表 4				
試験物質	配列 (5'-3')	HER3 阻害 (%)	EGFR 阻害 (%)	HER2 阻害 (%)
配列番号 184	C _S A _S T _S t _S c _S a _S a _S g _S t _S t _S c _S t _S t _S C _S A _S T	81.1%	N. D.	N. D.
配列番号 185	C _S A _S C _S t _S a _S a _S t _S t _S t _S c _S c _S t _S t _S C _S A _S G	89.1%	N. D.	N. D.
配列番号 186	G _S C _S C _S c _S a _S g _S c _S a _S c _S t _S a _S a _S t _S T _S T _S C	79.9%	N. D.	N. D.
配列番号 187	C _S T _S T _S t _S g _S c _S c _S c _S t _S c _S t _S g _S c _S C _S A _S C	90.4%	N. D.	N. D.
配列番号 188	C _S A _S C _S a _S c _S a _S c _S t _S t _S t _S g _S c _S c _S C _S T _S C	96.1%	N. D.	N. D.
配列番号 189	C _S A _S G _S t _S t _S c _S c _S a _S a _S g _S a _S c _S A _S C _S C	88.9%	N. D.	N. D.
配列番号 190	T _S G _S G _S c _S a _S a _S t _S t _S t _S g _S t _S a _S c _S T _S C _S C	95.7%	N. D.	N. D.
配列番号 191	G _S T _S G _S t _S g _S t _S g _S t _S a _S t _S t _S c _S C _S C _S A	97.7%	N. D.	N. D.
配列番号 192	C _S C _S C _S t _S c _S t _S g _S a _S t _S g _S a _S c _S t _S C _S T _S G	92.3%	N. D.	N. D.
配列番号 193	C _S A _S T _S a _S c _S t _S c _S c _S t _S c _S a _S t _S c _S T _S T _S C	64%	N. D.	N. D.
配列番号 194	C _S C _S A _S c _S c _S a _S c _S a _S a _S g _S t _S A _S T _S G	87.5%	N. D.	N. D.
配列番号 195	C _S A _S T _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S g _S g _S t _S g _S T _S G _S T	64.4%*	N. D.	N. D.
配列番号 196	G _S A _S C _S a _S t _S c _S a _S c _S t _S c _S t _S g _S g _S T _S G _S T	77.0%*	N. D.	N. D.
配列番号 234	T _S A _S g _S c _S c _S t _S g _S t _S c _S a _S C _S T _S T			
配列番号 235	C _S G _S T _S c _S a _S g _S t _S a _S t _S g _S c _S g _S A _S A _S T _S c			

10

20

30

40

50

表 4				
試験物質	配列 (5'-3')	HER3 阻害 (%)	EGFR 阻害 (%)	HER2 阻害 (%)
配列番号 236	C _S G _S C _S A _S G _S A _S T _S T _S A _S G _S A _S A _S C _S C _S T			
配列番号 249	T _S A _S G _S C _S C _S T _S T _S T _S G _S A _S C _S C _S T _S C _S T _S C			

10

【 0 3 0 6 】

表4に示すように、これらの実験において、配列番号169、170、173、174、180、181、183、185、187、188、189、190、191、192および194のオリゴヌクレオチドは、15PC3細胞において25nMでHER3 mRNA発現の約85%以上の阻害を示し、従って好ましい。

【 0 3 0 7 】

また、示したアンチセンスオリゴ配列に基づく、例えば種々の鎖長（より短いまたはより長い）および／または核酸塩基含量（例えば類似体単位の型および／または比率）のオリゴヌクレオチドも、HER3発現の高い阻害を提供するものであり、好ましい。

【 0 3 0 8 】

20

実施例9：LNAオリゴヌクレオチドによるアポトーシスの誘導

HUH7細胞を、トランスフェクションの前日に6ウェルの培養プレート（NUNC）に 2.5×10^5 個／ウェルの密度でまいた。75～90%のコンフルエントの時点で、カチオン性リポソーム製剤LipofectAMINE 2000（Gibco）をトランスフェクションベヒクルとして使用し、オリゴヌクレオチドで細胞を処理した。使用したオリゴ濃度は5nMおよび25nM（ウェル中の最終濃度）とした。オリゴ-脂質複合体の製剤化は、無血清OptiMEM（Gibco）および最終脂質濃度5μg/mLのLipofectAMINE 2000を使用し、本質的に使用説明書に記載されたように実施した。細胞を37℃で4時間インキュベーションし、オリゴ含有培地を除去して処理を停止した。Optimemで洗浄した後、各ウェルに300μlのトリプシンを添加して細胞をウェルから剥がした。ウェルに3mlのHUH7培地を添加することによってトリプシンを不活化し、細胞懸濁液を優しく上下にピペティングして単一細胞懸濁液を作製した。スクランブルオリゴの配列番号235を対照として使用した。

30

【 0 3 0 9 】

この後、Nunc社の白色96ウェルプレート（cat #136101）の各ウェルに100μlの細胞懸濁液を添加した（異なる時点で測定するために4枚のプレートを準備した）。次いで、アッセイを実施するまでプレートを37℃、95%湿度および5%CO₂でインキュベートした。

【 0 3 1 0 】

カスパーゼアッセイ：アポトーシス特異的カスパーゼ3および7の活性を、ルミノジェニック（luminogenic）Caspase-Glo 3/7-基質アッセイ（Cat#G8091、Promega社）を用いて測定した。分析するプレートを室温で15分間かけて均衡化した。Caspase-Glo（登録商標）3/7緩衝液を、Caspase-Glo（登録商標）3/7基質と共に、室温に均衡化したCaspase-Glo（登録商標）作業溶液に混合した。次いで、96ウェルプレートの各ウェル中の培地に100μlのCaspase-Glo（登録商標）作業溶液を慎重に添加した（これは気泡の発生およびウェル間のコンタミネーションを避けるために重要である）。プレートを注意しながら1分間振とうし、その後、室温で1時間、遮光してインキュベートした。カスパーゼ活性は、Luminoscan Ascent装置（Thermo Labsystems）で1秒あたりの相対発光量（Relative Light Units）（RLU/s）として測定した。データを、1に設定したモックサンプルの平均値と相関させ、これと比較してプロットした。図6を参照のこと。

40

【 0 3 1 1 】

実施例 10：LNAオリゴヌクレオチドを使用したin vitroにおける増殖阻害

50

HUH7細胞をトランスフェクトし、実施例9に記載したように単一細胞懸濁液で回収した。配列番号235はスクランブル対照として使用した。

【0312】

この後、100 μ lの細胞懸濁液をMTSアッセイのために96ウェルプレート（「Orange Scientific」）の各ウェルに添加した（異なる時点で測定するために4枚のプレートを準備した）。次いで、アッセイを実施するまでプレートを37℃、95%湿度および5%CO₂でインキュベートした。

【0313】

増殖生存細胞の測定（MTSアッセイ）

増殖アッセイのために、96ウェルプレートの各ウェルの培地に10 μ lのCellTiter 96（登録商標）Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（Promega, G3582）を添加し、プレートを注意しながら振とうし、測定前に37℃、95%湿度および5%CO₂で1時間インキュベートした。分光光度計で490nmの吸光度を測定し、培地のみを含むウェルからアッセイのバックグラウンドを差し引いた。490nmにおける吸光度は生存細胞数に比例しており、これをモックトランスフェクトした細胞、およびオリゴをトランスフェクトした細胞について、経時的にプロットした。図7を参照のこと。

【0314】

実施例11：in vivoにおける標的mRNAのノックダウンの評価

in vivoにおけるHER3オリゴマー化合物のノックダウン効率を評価するために、15PC3異種移植片を有する雌のヌードマウスを、 5×10^6 個/マウスの細胞を右の脇腹に皮下注射することで作製し、これに種々の投与量および注射スケジュール（すなわち単回投与、qd、q3d、q4d）でオリゴを静脈注射した。スクランブルオリゴの配列番号236は陰性対照として使用した。最後の注射の24時間後、マウスを安楽死させ、肝臓および腫瘍組織をRNAlater溶液（Ambion）中に回収した。組織から全RNAを精製し、QuantiTect Probe RT-PCRキット（Cat#: 204443; Qiagen）を使用した定量的逆転写-リアルタイムPCR（qRT-PCR）によってHER3 mRNAのレベルを決定した。GAPDH mRNAは内部対照として使用した。

【0315】

マウスErbB3：プローブ：cca cac ctg gtc ata gcg gtg a（配列番号237）、プライマー1：ctg ttt agg cca agc aga gg（配列番号238）、プライマー2：att ctg aat cct gcg tcc ac（配列番号239）

ヒトErbB3：プローブ：cat tgc cca acc tcc gcg tg（配列番号240）、プライマー1：tgc agt gga ttc gag aag tg（配列番号241）、プライマー2：ggc aaa ctt ccc atc gta ga（配列番号242）

ヒトGAPDH：プローブ：act ggc gct gcc aag gct gt（配列番号243）、プライマー1：cca ccc aga aga ctg tgg at（配列番号244）、プライマー2：ttc agc tca ggg atg acc tt（配列番号245）

マウスGAPDH：プローブ：agc tgt ggc gtg atg gcc gt（配列番号246）、プライマー1：aac ttt ggc att gtg gaa gg（配列番号247）、プライマー2：gga tgc agg gat gat gtt ct（配列番号248）

【0316】

200ngの全RNAをPCR反応で使用した。データ解析はABI-7500 PCR Fast Systemに含まれているソフトウェアを使用して実施した。表5を参照のこと。

【0317】

表5：マウス肝臓および腫瘍におけるHER3 mRNAの阻害

表5中のデータは、オリゴヌクレオチドを指示された投与量で連続5日間動物にi.v.投与した後の肝臓および腫瘍サンプルにおけるHER3 mRNAレベルを生理食塩水処理対照に対するパーセンテージとして示す。

【表 5】

表 5			
LNA ID	投与量 (mg/kg, i. v., qdx5)	HER3 mRNA	
		肝臓(生理食塩 水対照%)	腫瘍 (%)
配列番号 236	76.3	78 ± 17	100 ± 10.5
	60	86.5 ± 9.9	95.5 ± 12.7
	30	87.6 ± 19	101.2 ± 21.1
	22.9	81.4 ± 6.5	119.3 ± 24.9
配列番号 180	85.3	1 ± 0.3	25.8 ± 4.1
	66	6 ± 5.3	32.3 ± 9.7
	31.3	1.6 ± 0.3	37 ± 5.8
	25.6	3 ± 0.3	65 ± 20.2
	19.8	1.7 ± 0.6	83.1 ± 19.5
配列番号 169	37.7	20.7 ± 9.8	77 ± 10
	11.3	10.2 ± 5.5	ND
配列番号 172	32.4	7.4 ± 5.2	78.1 ± 15.3
	9.7	12.2 ± 5.9	ND

10

20

【0318】

実施例12：腫瘍増殖阻害の評価

ErbB3特異的LNAが*in vivo*において腫瘍の増殖を阻害する能力を、15PC3異種移植片を有する雌のヌードマウスで評価した。15PC3ヒト前立腺腫瘍モデルは、右の脇腹に 5×10^6 個/マウスの細胞を皮下注射して作製した。腫瘍体積はキャリパーで二次元を測定して決定し、式：腫瘍体積 = (長さ × 幅²)/2を用いて計算されるであろう。腫瘍の平均体積が70 ~ 100mm³に達した時点で、腫瘍のあるマウスを処置群と対照群とに分けた。マウスに25および50mg/kgの配列番号180をq3d × 10のスケジュールでそれぞれ静脈注射した。生理食塩水またはスクランブル対照の配列番号236を対照として使用した。マウスの体重および腫瘍の大きさを週に2回測定した。毒性を臨床観察、臨床化学および組織病理学検査によって評価した。腫瘍のHER3 mRNAは、実施例11に記載したようにQPCRによって測定した。図8Aおよび8Bを参照のこと。

30

40

【0319】

実施例13：マウス肝臓におけるHER3 mRNAの阻害

NMRIマウスに、1または5mg/kgのオリゴヌクレオチドを連続して3日間*i. v.*投与した(1グループ5匹)。アンチセンスオリゴヌクレオチド(配列番号180および配列番号234)を0.9%生理食塩水(NaCl)に溶解した。最後の投与の24時間後に動物を犠牲にし、肝臓組織をサンプリングして、RNA抽出およびQPCR解析までRNA later (Ambion)中で保存した。全RNAを抽出し、肝臓サンプルにおけるHER3 mRNAの発現を、マウスHER3 QPCRアッセイ(cat. no. Mm01159999_m1, Applied Biosystems)を使用し、実施例7に記載したようにQPCRによって測定した。結果をマウスGAPDH(cat. no. 4352339E, Applied Biosystems)に対して標準化し、生理食塩水で処理した対照と比較してプロットした(図9を参照のこと)。

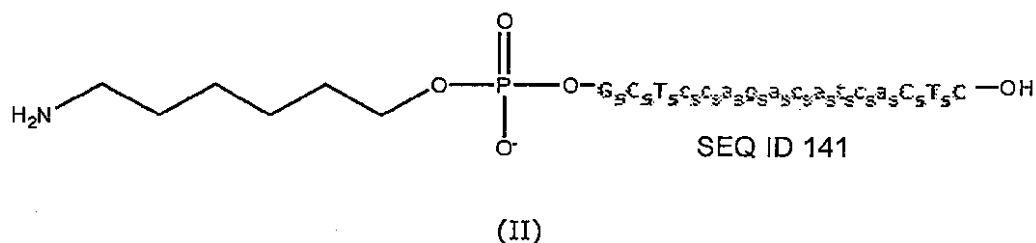
50

【 0 3 2 0 】

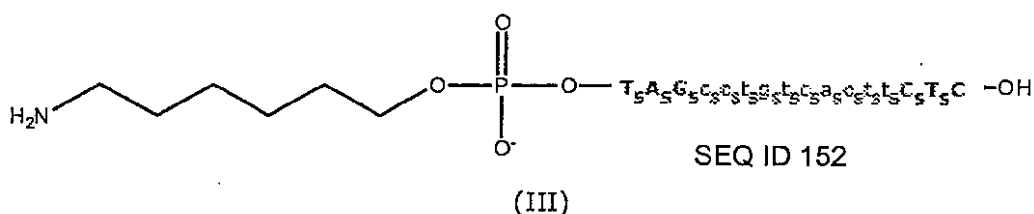
実施例14：配列番号141または配列番号152およびポリエチレングリコールのコンジュゲートの調製

配列番号141または配列番号152を有するオリゴマーは、慣例のホスホロアミダイト化学を使用して、アミノアルキル基、例えばFmoc等の封鎖基で封鎖されたヘキサン-1-アミンをオリゴマーの5'リン酸基に結合し、得られた化合物を酸化し、脱保護し、精製することによって5'末端が官能化され、式(II)または(III)を有する官能化したオリゴマーが得られる：

【化5】



10



20

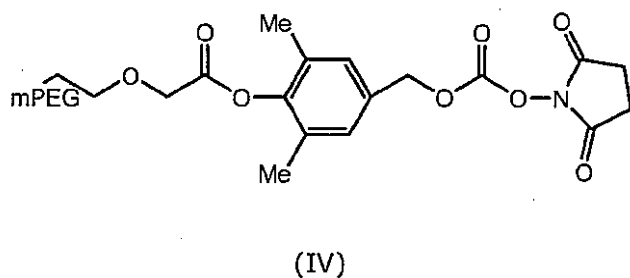
【 0 3 2 1 】

[式中、配列番号141または配列番号152における太字の大文字および下付きの「s」は上記と同じ意味を有する]。

【 0 3 2 2 】

活性化PEG、例えば式(IV)に示すもの：

【化6】



30

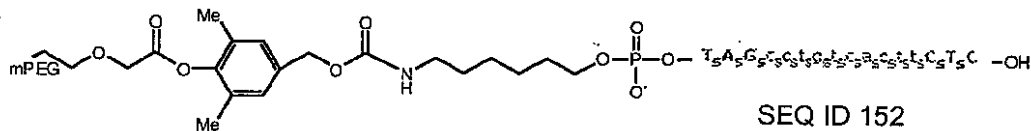
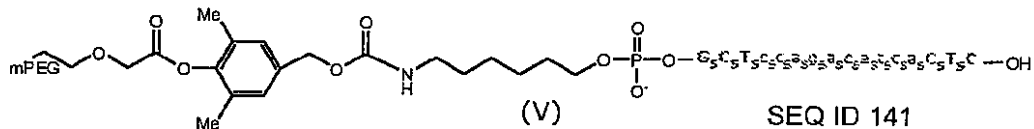
【 0 3 2 3 】

[式中、PEG部分は平均分子量12,000 Daを有する]

40

および式(II)または(III)の化合物のPBS緩衝液中の溶液を室温で12時間攪拌する。反応溶液から塩化メチレンで3回抽出し、有機相を合わせて硫酸マグネシウム上で乾燥し、濾過し、減圧下で溶媒を蒸発させる。残渣を倍量の蒸留水に溶解し、アニオン交換カラムにのせた。未反応のPEGリンカーは水で溶出し、生成物は NH_4HCO_3 溶液で溶出する。純粋な生成物を含む画分をため、凍結乾燥して式(V)または(VI)のコンジュゲートを得る：

【化7】



10

【0324】

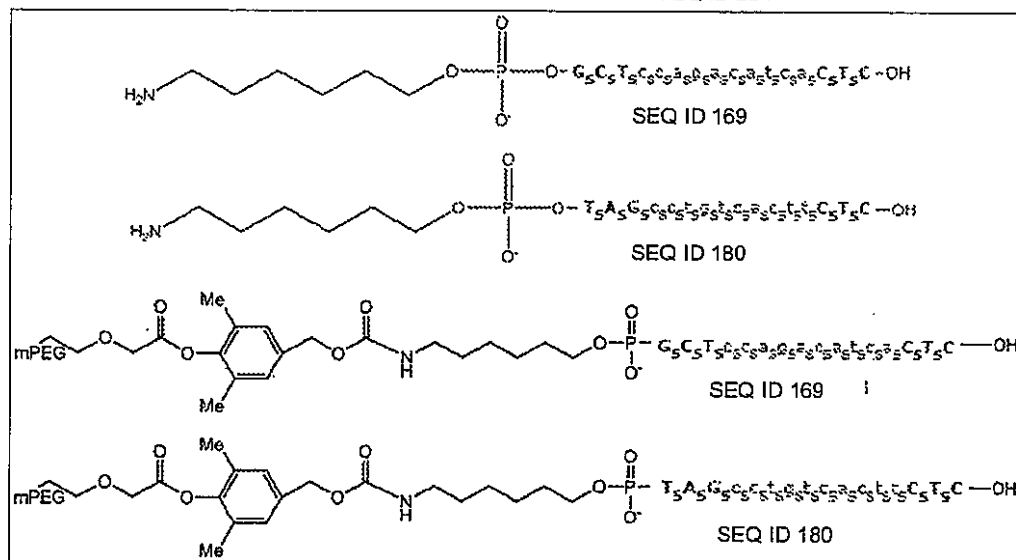
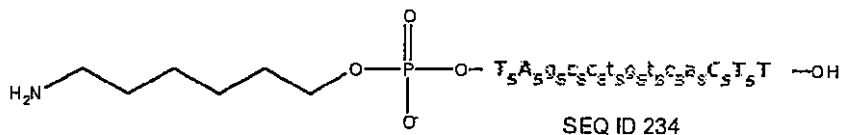
[式中、配列番号141または配列番号152のオリゴマーは、平均分子量12,000を有するPEGポリマーに放出可能なリンカーを介して結合している]。

【0325】

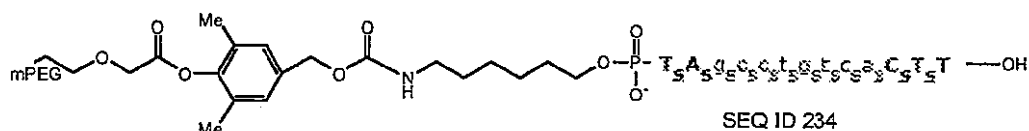
以下は配列番号180、配列番号234および配列番号169のコンジュゲートの例である：

【化8】

20



30



40

【0326】

実施例 15: 種々の投与サイクルを用いたin vivoにおける標的mRNAノックダウンの評価

オリゴマーのノックダウン効率を、実施例11で記載したプロトコルを用い、15PC3細胞またはA549細胞 (NSCLC) またはN87細胞 (胃癌) 由来の異種移植片腫瘍のあるヌードマウスでin vivoで評価した。オリゴマーは、3日毎に2~4回の投与で注射によって投与した。組織を最後の注射の3または4日後に回収した。

【0327】

50

表6および7中のデータは、指示されたオリゴマーを動物にi.v.投与した後の肝臓および腫瘍サンプルにおいて、HER3 mRNAまたはHIF-1 mRNAを生理食塩水で処理した対照と比較してパーセンテージとして示す。

【表 6】

表 6 - マウスの肝臓および 15PC3 細胞由来の異種移植片腫瘍における ErbB3 mRNA の阻害 (3-5 匹/群)				
処 理	投与量 (mg/kg)	腫瘍		肝臓
		HER3 (%)	Hif1A (%)	HER3 (%)
生理食塩水	0 x 4	100 ± 10	100 ± 8	100 ± 18
配列番号 236	76.3 x 4	106 ± 6.6	101 ± 13.8	115.9 ± 26.3
配列番号 169	37.7 x 4	81.6 ± 12.7	94.6 ± 19.6	39 ± 4.6
配列番号 172	32.4 x 4	107.3 ± 17	100.3 ± 7.5	44.3 ± 10.6
配列番号 180	60.2 x 2 又は 3	47.1 ± 2.2	101 ± 7.3	6.9 ± 3.6
	60.2 x 4	54.2 ± 9.1	ND	31.8 ± 5

10

【 0 3 2 8 】

同様の効果がA549 (NSCLC) およびN87 (胃癌) 細胞由来の腫瘍において観察されたため、配列番号169および配列番号180の配列を有するオリゴマーの観察されたノックダウン効果は15PC3腫瘍細胞に特有のものではない。以下の表7を参照のこと。

20

【表 7】

表 7 - マウスの肝臓および N87 細胞由来の異種移植片腫瘍における ErbB3 mRNA の阻害 (3 匹/群)				
異種移植片 モデル	処 理	投与量 mg/kg	HER3 (生理食塩水対照%)	
			腫瘍	肝臓
A549	生理食塩水	0 x 3	100 ± 20.9	100 ± 4.8
	配列番号 236	35, q4d x 3	87.6 ± 11.9	97.5 ± 21.2
	配列番号 180	35, q4d x 3	54.6 ± 15.2	31.8 ± 5.7
N87	生理食塩水	0 x 5	100 ± 8.2	100 ± 9.4
	配列番号 249	25, q3d x 5	99.0 ± 8.9	123 ± 4.5
	配列番号 180	25, q3d x 5	46.6 ± 13.4	24.7 ± 3.1

30

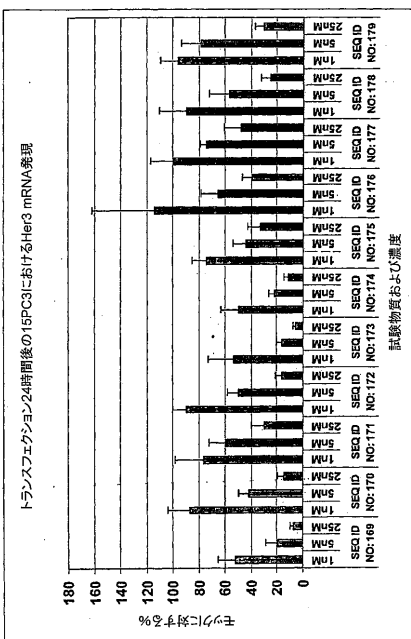
【図 1 - 1】

1 aacacacac accctccccc tgcacccct ccccggaact cggctccgga tccgattgca
 61 atttgcaac tccctcgccg tccgctgagc agccacacat tcccgagcgt ttcagtgagg
 121 tcttgctcgt atgtctagac ctggggggcc cggggcgaga ctgttgctgg ctcccttccc
 181 cctctcgagg gtactagagg ggaacagcc ctctgagctg ctggcttgcc ttttcagcct
 241 ggcgcggggc tccgagtggt gcaactctca ggcagtggtg ctggggactc tgaatggcct
 301 ggtgtgacc ggcagtgctg agaaccaata ccaagacatg tacaagctct acgagaggtg
 361 tgggtgtgtg atgggggaaa tggagatgt gtcctcgagg cacaatggcc accctctcctt
 SEQ ID NO:54
 421 cctcgagtggt attcgagag **tacacagctc** tgcctctgtg gcaatgagt aattctctac
 SEQ ID NO:55
 481 tctacattg cccaacccctc gctgtggggc agggaccacg gctacagc **gaaagctctc**
 541 **caatctgtc** atgttgaact ataacaccaa ctccagccac gctctgcgcc agtctcgctt
 601 gactcagctc accagatctc tgcagggggc tgtttatatt gagaagaac ataaagcttg
 661 tcaactggcc acaattgact ggaaggacat cgtgagggac agagatgctg agatagtggt
 721 gaagacacat ggcagagcgt gtcctccctg ctatgagctg tgcaggggac gatgtcgagg
 781 tcttgatcca gaagcagcgc agcaattgac caagaccatc tgtctctc agtgaatgg
 841 tcaactgctt gggcccccac caaacaggtg ctgccatgat gagtgtccg gggctgctc
 901 agggcctcag cacacagact gcttgctgct cgggaacttc aatgacagtg gaggctgtg
 961 accctgctgt ccacagcctc tgtgtacca caagttaact ttcagctgg aaaccaatcc
 SEQ ID NO:56
 1021 ccaacacaa tcatgattg gaggagtttg tgtagccagc tgtccacata **actttgtggt**
 1081 **ggtacacaa** tctctgtcca gggctgtccc tccctgcaag atggaatgag ataaaaatgg
 SEQ ID NO:57
 1141 gctcagagtg **tctacacatt** gtggggagct atgtccacaa gctgtgagg gaacagctgc
 1201 tggagagcgc ttcagagctg tgaactgtg caacattgtg gattttgtga actgaaccaa
 SEQ ID NO:58
 1261 gatctcgagc **aaactgaact** tctctgacac cggctcaact ggaagacccat ggcacaagat
 1321 cctctgctgt gaccacagaa agctaatgt ctctcgagaa tgaagagaa tcaagattga
 1381 cgtgaacatc cagtctcggc cggccacact gcaacacttc agtgttttt ccaatttgac
 SEQ ID NO:59
 1441 aaccattgga ggcagagacc tctacaacgc gggctctctca tttgtgatca **tcaagaactt**
 SEQ ID NO:60
 1501 **gaatgtcaca** tctctggggt tgcactgtc **gaadgaact** **agtctgggc** gtatctatat
 1561 aagtgcacat aggcagctct gctacacaca ctctttgaa tggacaaggg tcttctgggg
 SEQ ID NO:74
 1621 gctcagcga ggcagactg acatcaagca taatcgccgc cgcagagact **gattgaccaa**
 1681 **ggcgaagtg** tctgacccac tgtctccttc tgggggatgc tggggccacg gcccttggtca
 1741 gtgtctgtcc tgtcgaact atagccaggg aggtgtctgt gtcacacact gcaactttct
 1801 gattggggcg cctcagagat tgcctcaga ggcgaatgc tctctcgc acccggaatg
 1861 caaacacatg ggggcagctg ccaactgcaa tggctcgggc tctgactct gtgcctcag
 1921 tgcacatttt cgaatgggc ccaactgtgt gagaagctgc cccactggag tcaatagtg
 1981 caagggccca atctcaagt accagatgt tcaagatgaa tgcggccct gccatgagaa
 2041 ctgacacac ggggtgaaag gacagagct tcaagctgt tgaacacaa caatgtgct
 2101 gatggcga cccactgaa caatgcttt gacagtga gaggatgtg tatgtatct
 2161 catgagctg ggggcagct tctctcagc gctgtgggcg cggatcaga ataaagggc
 2221 tatgagcga tacttgaaac ggggtgagag catagagct ctgagacca gtgaagggc
 2281 taacaaagt tgggcgaga tcttcaaga gacagagcta aggaagctta aagtgtctg
 SEQ ID NO:91
 2341 ctggagtgat **tttgaactc** tgcacaagg agtgtgact cctgaggtg aatcaatcaa
 2401 gatccagct tgcattaaag tcaatgaga caagagtga cgcagagtt tcaagctgt
 2461 gacagatcat atgtggcca tggcagcct gacacatgca gctgtcctgg
 2521 actatgcca gggctacttc tgcagctgt cactcaatat tgcctctgg gttctctgt
 SEQ ID NO:92
 2581 gcatcatgtg agacaacac gggggcact ggggcacac cgtctgtgta actggggagt

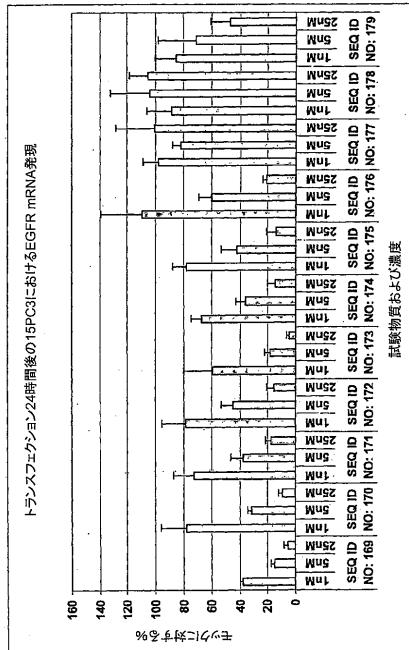
【図 1 - 2】

2641 **aaanaattgc** aggggaatgt actacttga ggaacatggt atgttgata gaacactgac
 2701 tgcacgaac gctgactca agtaacacac tccagttcag gtgcagatt tgggttggc
 2761 tgaactgtgt cctctgtagt taagcagct gctatacagt ggggcaaga ctccaattaa
 SEQ ID NO:140
 2821 gtggatggcc cttgagata tcaacttgg **gaaatacaga** **caacagagtg** **atgtctggag**
 SEQ ID NO:141
 2881 **ctatgtctga** **acagtttgg** agttgatgc cttcgggcga gacccatgt agggctacg
 2941 attgctgaa gtacacagac tgcagagaa gggggaggg ttggcacagc cccagctgt
 SEQ ID NO:50
 3001 **caaatgtat** **gtctacatg** **tgaagtgga** **gtattgatg** **attatgaga** **acattcgccc**
 SEQ ID NO:51
 3061 aactctttaa gaactagcca atgagttcac cagatggccc cgaagaccac caaggtatct
 3121 gttcctaaag agagagtggt ggcctggagt agccctgggt ccaagagccc atgtctgac
 3181 aacacagag ctgagagag tagagctgga gccagacata gacccatgt tagacttga
 3241 agcagagag gacaactgg caacacacac actgggctcc gccctagcc taccagtgg
 3301 aacactaat cggccacgtg ggaacagag cttttaagt catcatctg gatcatgac
 3361 catgaacag ggtaatcttg gggagtcttg ccaggagctc ggaattctg ggaagtgga
 SEQ ID NO:122
 3421 acgttgccc cgtcagctc ctctacaccc aatgcacag gagtctggt **catcagagtg**
 3481 **ataagaggg** catgtaacag gctctgaggc tgaagctcag gagaagtg caatgtgtg
 3541 gacccggagc agagagcga gccacagccc acgctggagt agcgcctacc atctccagc
 3601 ccaagtgct cgtgctctg ttaacacact ctccacaccc gggtagag agagagtg
 3661 caacggttat gctatgcaa abacacact caaagtact cctctctcc ggaagagca
 SEQ ID NO:137
 3721 cctttcttca tgggtctca gttctgtct ggttactga gagaagtg **aaagtgaaga**
 3781 **gtatgatac** atgacagga ggaagagca cagtcacct catccctca ggcacagtc
 3841 ccttgaggag cgtgttatg agtactgga gttgggtcca gacccatgt cctctctgg
 3901 cagcacacag agttgccac tcaacctgt accactgat cccactgca gccacaccc
 3961 agatgaagac tatgatata tgaactgcca acagatgga ggtgtctgt ggggtgatta
 4021 tgcagcatt ggggctgccc cagactctga gcaagggat gaagagatga gactcttca
 4081 ggggctgga catcagccc ccaactgcca tatggcccga cttaaaactc taagtatgt
 4141 agaggtgaca gactctgct tctgaacccc cctgttgga catcagagc ttttcccaa
 4201 gctaatgac cagagaacgt aactctgct cctgtggca ctcaagagc attaatgt
 4261 agctatgccc tttagaggg accgtctct cctctctccc tctctctccc aggtccagc
 4321 cctttctccc cgtccacga caattcact caactcttg aggtcttaa acatttgac
 4381 acaaaattct tatgttatg agcagctgt gcaacttct ccttttcca acccagaa
 4441 aggttttctc tatgttgtt gctttccag tccactctct cagctcttc acaggactc
 4501 ctgagagatc gaagattac tctcaatc cctctctcc agctcttga caattgtga
 4561 ctgagctct atgtgtgct tcaagctgt gagaagatga caagagagaa
 4621 actagcaga gaaagtgta attttggtt atgctctta acccttga aagagagag
 4681 cttaaatct gtgaagaa aggttagag tgaatgta ttaactcat aatagcac
 4741 ttaactatga gccagagcat atactaac tcaactcat tatctact agtcttat
 4801 catccttaa acaattctg gatacacta ttactcaat ttaacaaag ggaagtggg
 4861 catggtgtg catgctgta atctacac ttggagagc tggagcaga ggaattactg
 4921 aggcagagc tttagacca gcttagcca catagatga cccactctc tttaaaaa
 4981 aaaaaaaaa aaaaaaaa acttagaac tgggtcagt ggtcatgcc tgaatccca
 5041 gccagcact tgggggctg agatggagc atacttagc ccaagatga gagataagg
 5101 tatggaaca tgcagagca ctgtctctc agggaaaa aaaaaaga actgagctt
 5161 aagagatga aataaatta cagtagatc cagatgca atctctca atctctgac
 5221 atgtgctct atgttaagt gccacagaa actgattaa gtacagccc tttttaag
 5281 ggcactgtt ctgtttttg cactgaatca agtctaac caacagccc atctctcat
 5341 accctgacat ctactctag gaagtgttg tggggagt cagagagaa ataatcag
 5401 catctctgt taaactgc tcaactgtg cgttaaga tctctctc atctagag
 5461 gcaattcac aagatcccc aagatcccc tttagagcc atctctctc

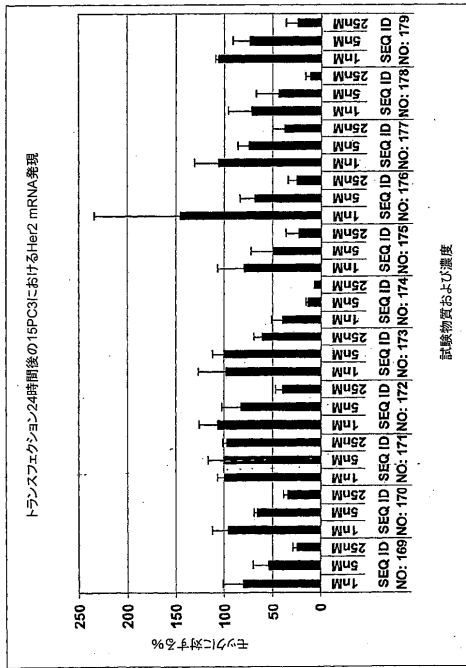
【図 2】



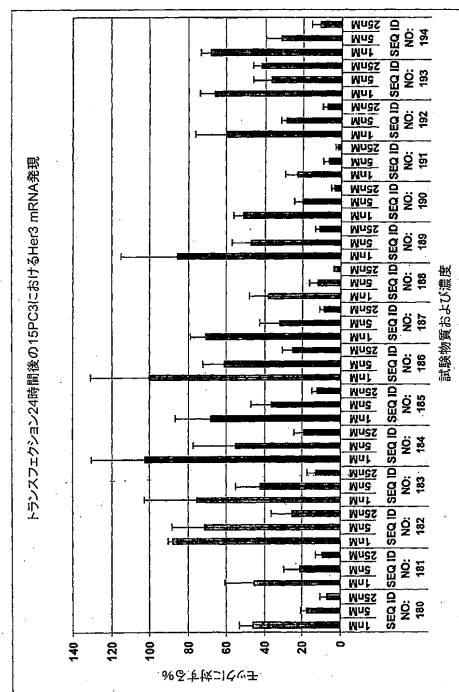
【図 3】



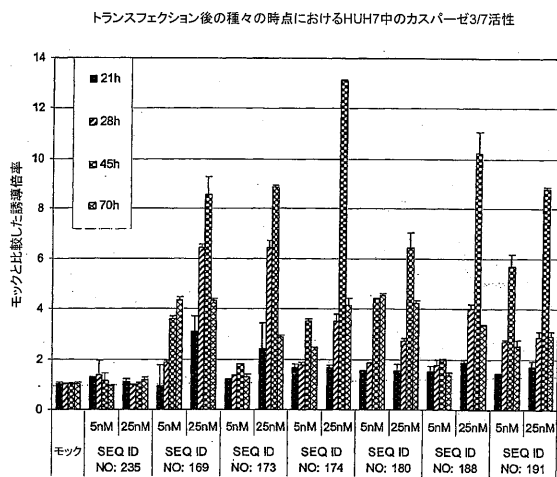
【図 4】



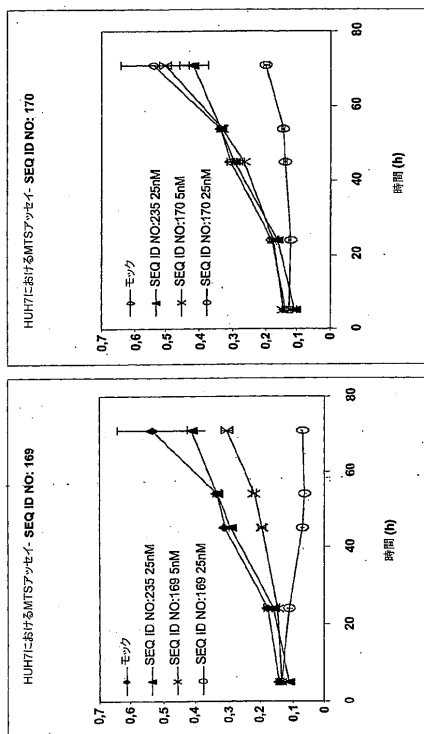
【図 5】



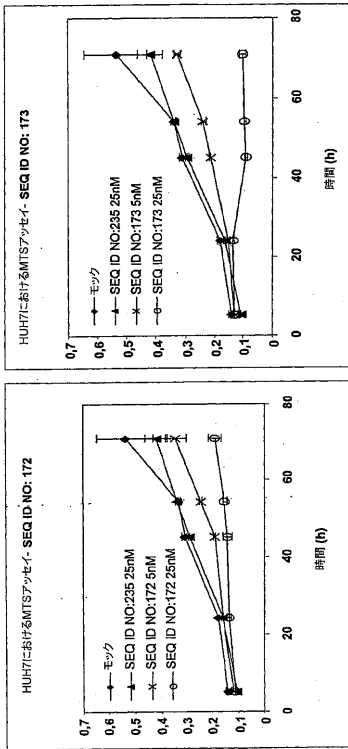
【図 6】



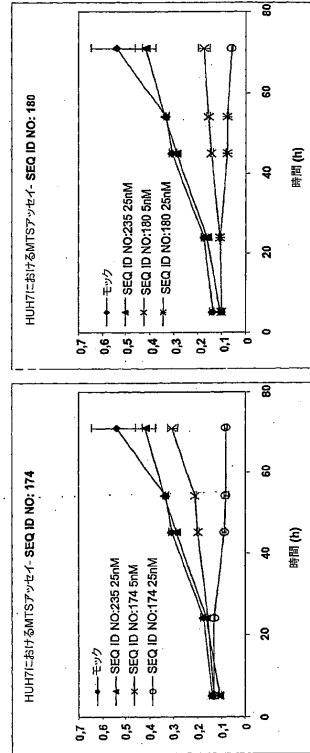
【図 7 - 1】



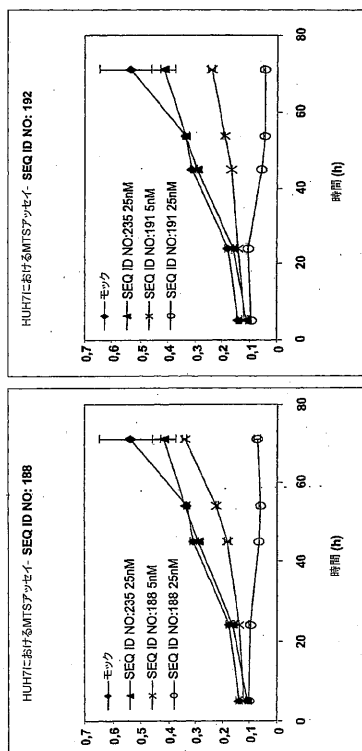
【図 7 - 2】



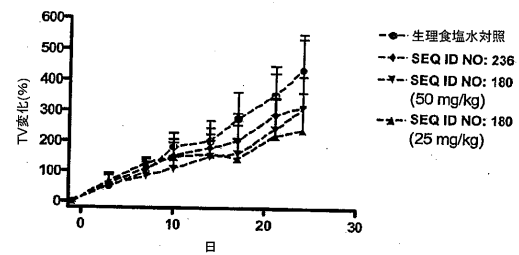
【図 7 - 3】



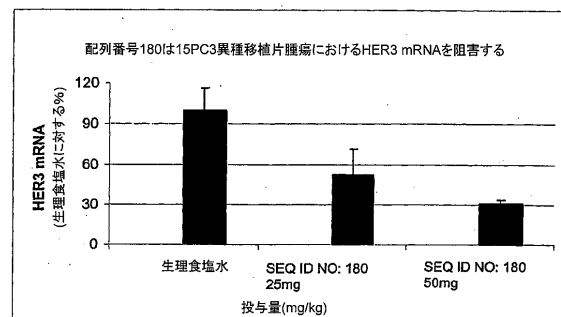
【図 7 - 4】



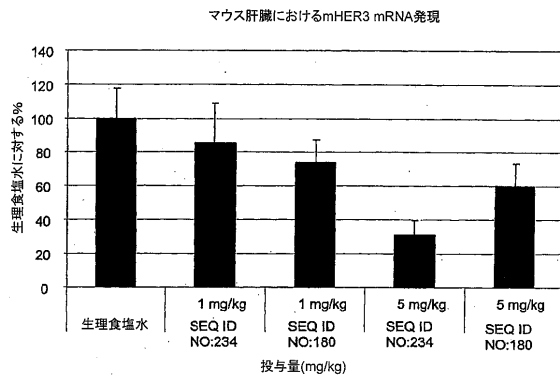
【図 8 A】



【図 8 B】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

2010526797000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2008/055779

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/11 A61K31/7088
 ADD. A61P35/00

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)

C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/10409 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC. [US]; BENNETT C. FRANK; COWSERT LEX M.) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document	2-8, 10-20
X	SITHANANDAM G. ET AL.: "Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway" CARCINOGENESIS, vol. 10, 2003, pages 1581-1592, XP002513267 the whole document	2,4-6,11

-/--



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 E earlier document but published on or after the international filing date
 L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 February 2009

Date of mailing of the international search report

13/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, Giovanni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/055779

2(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAE Y.-K. ET AL.: "Patterning of proneuronal and inter-proneuronal domains by hairy- and enhancer of split-related genes in zebrafish neuroectoderm" DEVELOPMENT, vol. 132, 2005, pages 1375-1385, XP002513268 plus one page of corrigendum the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/055779

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0210409	A	07-02-2002	AU	7700301 A	13-02-2002
			US	6277640 B1	21-08-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 ヘッドジェルン, マイ
デンマーク国 ディーケー - 1 6 6 3 コペンハーゲン ヴィ, 5 . ティーエイチ . , オーレンシ
ュレガースゲード 4 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 DA02 EA10 GA11 HA17
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44
4C057 MM02 MM04 MM06
4C076 CC27 EE23
4C086 AA01 AA02 AA03 EA17 EA18 NA14 ZB26 ZC42