

(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2018-517704

(P2018-517704A)

(43) 公表日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.

**A61K 31/711 (2006.01)**  
**A61P 25/00 (2006.01)**  
**A61P 25/28 (2006.01)**  
**A61P 43/00 (2006.01)**  
**A61P 29/00 (2006.01)**

F 1

A 61 K 31/711  
A 61 P 25/00  
A 61 P 25/28  
A 61 P 43/00  
A 61 P 29/00

テーマコード(参考)

4 B 06 3  
4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-562664 (P2017-562664)  
(86) (22) 出願日 平成28年6月3日 (2016.6.3)  
(85) 翻訳文提出日 平成30年1月24日 (2018.1.24)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/035794  
(87) 国際公開番号 WO2016/196978  
(87) 国際公開日 平成28年12月8日 (2016.12.8)  
(31) 優先権主張番号 62/171,743  
(32) 優先日 平成27年6月5日 (2015.6.5)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514084303  
ミラゲン セラピューティクス、 インコ  
ーポレイテッド  
アメリカ合衆国 コロラド 80301,  
ボルダー, ルックアウト ロード 6  
200, スイート 100  
(71) 出願人 503146324  
ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス  
ピタル インコーポレイテッド  
The Brigham and Wom  
en's Hospital, Inc.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O  
2115 ボストン フランシス ストリ  
ート 75

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】筋萎縮性側索硬化症(ALS)を処置するためのm i R - 155阻害剤

## (57) 【要約】

本発明は、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与することによって、被験体においてALSなどの神経学的疾患を処置するための方法を提供する。本発明はまた、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与することによって神經炎症を処置するための方法も提供する。一画面において、11～16ヌクレオチドの配列を含むm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする上記被験体において神経学的疾患を処置するための方法が提供される。

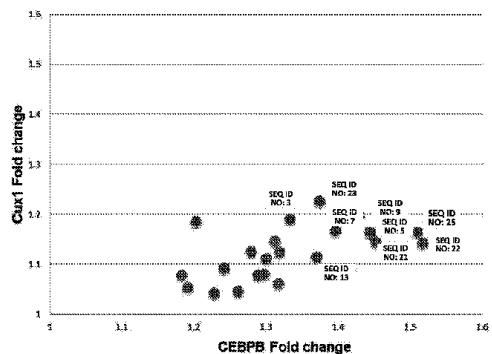


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

11～16ヌクレオチドの配列を含むm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする前記被験体において神経学的疾患を処置するための方法であって、

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、m i R - 155の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドが、ロツクトヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドが、デオキシリボ核酸(DNA)ヌクレオチドである、方法。10

**【請求項 2】**

前記神経学的疾患が筋萎縮性側索硬化症(ALS)である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から6番目のヌクレオチドが、DNAヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から4番目のヌクレオチドが、ロツクトヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、少なくとも9個のロツクトヌクレオチドを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。20

**【請求項 6】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が12ヌクレオチドの長さを有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が配列番号23の配列を有する、請求項1に記載の方法。  
。

**【請求項 8】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞においてm i R - 155の活性または機能を低減する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。30

**【請求項 9】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞においてm i R - 155標的遺伝子の発現または活性を上方調節する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞において恒常性遺伝子の発現または活性を上方調節する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの炎症細胞の活性を低減または阻害する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。40

**【請求項 12】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、脊髄中への炎症細胞の動員における低減を示す、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞において、組織破壊的遺伝子の発現もしくは活性を下方調節する、および/または組織保護的遺伝子の発現もしくは活性を上方調節する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記炎症細胞が、ニューロン細胞、単球およびミクログリアからなる群より選択される、請求項8から13のいずれか一項に記載の方法。50

**【請求項 15】**

11～16ヌクレオチドの配列を含むm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与するステップを含む、神経学的疾患において炎症細胞の活性を低減するための方法であって、

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、m i R - 155の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドが、ロツクトヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドが、デオキシリボ核酸(DNA)ヌクレオチドである、方法。

**【請求項 16】**

11～16ヌクレオチドの配列を含むm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする前記被験体において神経炎症を処置または好転させるための方法であって、

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、m i R - 155の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドが、ロツクトヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドが、デオキシリボ核酸(DNA)ヌクレオチドである、方法。

**【請求項 17】**

それを必要とする前記被験体が、神経学的疾患に罹患しているか、または神経学的疾患を発症するリスクがある、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記神経学的疾患が筋萎縮性側索硬化症(ALS)である、請求項15または16に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から6番目のヌクレオチドが、DNAヌクレオチドである、請求項15から18のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から4番目のヌクレオチドが、ロツクトヌクレオチドである、請求項15から19のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、少なくとも9個のロツクトヌクレオチドを含む、請求項15から20のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が12ヌクレオチドの長さを有する、請求項15から21のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が配列番号23の配列を有する、請求項15から21のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞においてm i R - 155の活性または機能を低減する、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 25】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞においてm i R - 155標的遺伝子の発現または活性を上方調節する、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞において恒常性遺伝子の発現または活性を上方調節する、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 27】**

10

20

30

40

50

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの炎症細胞の活性を低減または阻害する、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項28】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、脊髄中への炎症細胞の動員における低減を示す、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項29】**

前記オリゴヌクレオチド阻害剤が、投与の際に、CNSの細胞において、組織破壊的遺伝子の発現もしくは活性を下方調節する、および／または組織保護的遺伝子の発現もしくは活性を上方調節する、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項30】**

前記炎症細胞が、ニューロン細胞、単球およびミクログリアからなる群より選択される、請求項15から23のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項31】**

神経学的疾患の処置のために被験体を選択するための方法であって、前記被験体のCNS細胞において、IL7r、Tlr6、Mef2a、Inpp5d、Cttnbp2n1、1810011010Rik、Fads1、Cux1、Ap3d1、X99384、Olfm13、Mafb、Csf1r、Tgfbbr2、Bach1、Sal111、Rapgef5、CEBPB、CCnd1、Msrl1、Jarid2、Mr1、GnasおよびMcip2からなる群より選択される1個または複数の遺伝子の発現のレベルを決定するステップ；前記被験体の前記CNS細胞における前記1個または複数の遺伝子の前記レベルを、前記1個または複数の遺伝子の参照レベルと比較するステップ；ならびに前記参照レベルと比較して、前記CNS細胞における前記1または複数の遺伝子の前記レベルにおける増加または減少を有する被験体を前記神経学的疾患の処置のために選択するステップを含む、方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

関連出願への相互参照

この出願は、2015年6月5日に出願された米国仮出願第62/171,743号（この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）への優先権の利益を主張する。

**【0002】**

本発明は、miR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤およびその組成物に関する。本発明は、miR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与することによって、それを必要とする被験体において神経学的疾患および／または神経炎症(neuroinflammation)を処置または予防するための方法もまた提供する。miR-155の活性または機能は、オリゴヌクレオチド阻害剤の投与後に、被験体の中枢神経系(CNS)細胞において低減される。

**【背景技術】**

**【0003】**

臨床試料のmicroRNA(miRNA)プロファイリングにより、miR-155が、散発性および家族性の両方の筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の脊髄および末梢単球において上方調節されることが実証されている(Butovskyら、2012年；Kovalら、2013年)。ALSは、種々の神経障害性細胞機構によって開始され得る複雑な疾患である。開始事象に関わらず、ALSは、単球性炎症細胞の局所的および全身的なM1活性化と関連する。ALS患者および動物モデルでは、ミクログリアを含む非ニューロン細胞の炎症が、ニューロン死に寄与する(Boiléeら、2006年；Nagaiら2007年)。脊髄に入る脊髄ミクログリア細胞および循環単球のM1活性化は、miR-155の増加した発現と関連し、少なくとも部分的にその結果である(Butovskyら、2012年)。ALSの前臨床モデルであるSOD1G93Aマウスでは

10

20

30

40

50

、*miR-155* 発現は、常在性ミクログリアおよび末梢単球において上方調節される (Butovskylar, 2012年; Kovalrlar, 2013年)。SOD1G93Aマウスにおける*miR-155* の遺伝的欠失は、有意に延長された生存 (51日間)、脊髄中の末梢単球の低減された動員、およびSOD1G93Aマウスにおける病的状態に特徴的な調節不全のミクログリアシグネチャーの逆転を生じる (Butovskylar, 2014年)。さらに、*miR-155* の遺伝的消失は、SOD1G93Aマウスの脾臓 Ly6CHi 単球および脊髄における*miRNA* / 遺伝子およびタンパク質シグネチャーを、組織破壊的なM1型から組織保護的なM2型へとシフトさせる。さらに、直接的 (脳室内注射) または全身的投与による*miR-155* の薬理学的阻害はまた、SOD1G93Aマウスの生存を改善し (Kovalrlar, 2013年; Butovskylar, 2014年)、疾患関連ミクログリアシグネチャーを逆転させる (Butovskylar, 2014年)。

10

#### 【0004】

抗*miR-155* の薬理学的投与を評価する以前の研究 (Kovalrlar, 2013年; Butovskylar, 2014年) は、マウス*miR-155* を標的化する化合物を利用した。マウス*miR-155* 配列 (UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU) は、ガイド鎖の12位における单一のヌクレオチドが、ヒト*miR-155* 配列 (UUA AUGCUAACGUGAUAGGGGU) とは異なる (*miRBase 21*、www.mirbase.org)。以前の研究は、ALSの処置における抗*miR-155* 化合物の役割を示しているが、本発明は、ヒト*miR-155* の活性または機能を下方調節するさらなるオリゴヌクレオチド阻害剤を提供する。

20

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

本発明は、被験体の細胞において*miR-155* の活性または機能をモジュレートするためのオリゴヌクレオチド阻害剤を提供する。一実施形態では、*miR-155* のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、投与後に、被験体のCNS細胞において*miR-155* の活性または機能を下方調節する。ある特定の実施形態では、CNS細胞は、単球、リンパ球、ミクログリア、マクロファージおよびニューロン細胞である。一部の実施形態では、CNS細胞には、脊髄中に遊走できる末梢血中の細胞；例えば、末梢血単球、末梢血リンパ球などが含まれる。

30

#### 【0006】

一実施形態では、*miR-155* のオリゴヌクレオチド阻害剤は、11～16ヌクレオチドの配列を含み、オリゴヌクレオチド阻害剤は、*miR-155* の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドは、ロツクトヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドは、デオキシリボ核酸 (DNA) ヌクレオチドである。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から4番目のヌクレオチドはロツクトヌクレオチドである、および/またはオリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から6番目のヌクレオチドはDNAヌクレオチドである。

40

#### 【0007】

一実施形態では、*miR-155* のオリゴヌクレオチド阻害剤は、12ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも9個のロツクトヌクレオチドを含有する。一部の他の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、最大で1、2、3、4または5個のDNAヌクレオチドを含有する。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも6番目および/または8番目のヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。なおさらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、5'末端から2番目、6番目および8番目の位置にDNAヌクレオチドを含む。

50

**【0008】**

一実施形態では、本発明に従うm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の炎症細胞の活性を低減または阻害する。炎症細胞には、リンパ球、単球、マクロファージおよびミクログリアが含まれる。一実施形態では、単球、リンパ球、N K 細胞、好中球などの末梢血中の細胞は、脊髄中に遊走し、C N S の炎症細胞として作用し得る。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、脊髄中への炎症細胞の動員または遊走を下方調節する。

**【0009】**

別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S 細胞において、m i R - 155の1個または複数の標的遺伝子を上方調節する。さらに別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の細胞において恒常性遺伝子の発現または活性を上方調節する。さらに別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の細胞において、組織破壊的遺伝子の発現もしくは活性を下方調節する、および／または組織保護的遺伝子の発現もしくは活性を上方調節する。

10

**【0010】**

本発明は、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を含む組成物およびその使用もまた提供する。一実施形態では、本発明は、治療有効量の本発明のm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする被験体において神経学的疾患を処置するための方法を提供する。m i R - 155の活性または機能は、オリゴヌクレオチド阻害剤の投与後に、被験体のC N S 細胞において低減される。一実施形態では、神経学的疾患は、A L S である。

20

**【0011】**

一実施形態では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする被験体において神経炎症を処置または好転(a m e l i o r a t e)させるための方法を提供する。これらの実施形態では、神経炎症のための処置を必要とする被験体は、A L S などの神経学的疾患に罹患している可能性がある、またはそれを発症するリスクがある。

**【図面の簡単な説明】****【0012】**

【図1】図1は、抗m i R - 155化合物をトランスフェクトしたM V 4 - 11ヒト単球性細胞における、m i R - 155の2個の直接的なシードマッチした標的遺伝子の発現を示す。

30

**【0013】**

【図2】図2 Aは、未処理細胞と比較した、抗m i R - 155化合物と共に受動的にインキュベートしたミクログリア細胞における、直接的なシードマッチした標的C S F 1 R の相対的発現を示す。図2 Bは、未処理細胞と比較した、抗m i R - 155化合物と共に受動的にインキュベートしたミクログリア細胞における、第2のシードマッチした標的O L F M L 3 の相対的発現を示す。

**【0014】**

【図3】図3は、抗m i R - 155化合物で処置したS O D 1マウスから単離したミクログリア細胞における、予測されたまたは検証されたm i R - 155のシードマッチした標的における遺伝子発現変化の「ヒートマップ」表示を示す。

40

**【0015】**

【図4】図4は、2の抗m i R - 155化合物によって4のマウスにおいて上方調節されたm i R - 155標的遺伝子のセットの発現における変化倍数(f o l d - c h a n g e)を示す。

**【0016】**

【図5】図5は、抗m i R - 155化合物で処置したマウスにおける、ミクログリア恒常性遺伝子についてのアノテートされた遺伝子発現プロファイルを示す。

**【0017】**

50

【図6】図6は、2の抗m i R - 155化合物によって4のマウスにおいて上方調節されたミクログリア恒常性遺伝子のセットの発現における変化倍数を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、m i R - 155の活性または機能を阻害するオリゴヌクレオチド阻害剤、ならびにその組成物および使用を提供する。ヒトでは、m i R - 155は、M I R 155宿主遺伝子即ちM I R 155 H Gによってコードされ、ヒト第21染色体上に位置する。p r e - m i R - 155の両方のアームが成熟m i R N Aを生じ得るので、p r e - m i R - 155のプロセシング産物は、m i R - 155 - 5 p (5'アームから)およびm i R - 155 - 3 p (3'アームから)と称される。ヒトm i R - 155 - 5 pおよびm i R - 155 - 3 pについての成熟配列を以下に示す：

ヒト成熟m i R - 155 - 5 p (配列番号1)

5' - U U A A U G C U A A U C G U G A U A G G G G U - 3'

ヒト成熟m i R - 155 - 3 p (配列番号2)

5' - C U C C U A C A U A U U A G C A U U A A C A - 3'

【0019】

m i R - 155 - 5 pは、B細胞、T細胞、単球および顆粒球を含む造血細胞において発現される(L andgrafら2007年)。m i R - 155 - 5 pは、骨髄造血および赤血球形成の両方の制御において非常に重要な分子である。このm i R N Aは、初期幹前駆段階にある造血幹前駆細胞において高度に発現され、より成熟した造血細胞(例えば、リンパ球、赤血球)へのそれらの分化をブロックする。m i R - 155 - 5 p発現は、これらの系譜に沿って細胞が成熟するにつれて漸進的に減少し、成熟造血細胞では約200分の1である(Masakiら2007年; Gerloffら2015年)。

【0020】

以前の研究により、m i R - 155がA L S患者の脊髄および末梢単球において上方調節されることが示されている。米国特許出願第14/350,977号(US2014/0235697として公開)は、m i R - 155の阻害剤を投与することによって、A L Sなどの神経変性疾患を診断および処置する方法を開示している。この出願は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0021】

本発明は、ヒトm i R - 155の活性または機能を低減または阻害するオリゴヌクレオチド阻害剤を提供する。本発明に関して、用語「オリゴヌクレオチド阻害剤」、「抗m i R」、「アンタゴニスト」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド即ちA S O」、「オリゴマー」、「抗m i c r o R N Aオリゴヌクレオチド即ちA M O」または「ミックスマー(m i x m e r)」は、広く使用され、m i R N Aに完全にまたは部分的にハイブリダイズし、それによって標的m i R N Aの機能または活性を抑制することによって、標的m i c r o R N A(m i R N A)の活性または機能を阻害する、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、改変型リボヌクレオチド、改変型デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの組合せを含むオリゴマーを包含する。

【0022】

用語「m i R - 155」は、本明細書で使用する場合、p r i - m i R - 155、p r e - m i R - 155、m i R - 155 - 5 pおよびh s a - m i R - 155 - 5 pを含む。

【0023】

一実施形態では、本発明は、11~16ヌクレオチドの長さを有するm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を提供する。種々の実施形態では、m i R - 155を標的化するオリゴヌクレオチド阻害剤は、11、12、13、14、15または16ヌクレオチド長である。一実施形態では、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、12ヌクレオチドの長さを有する。

【0024】

10

20

30

40

50

本発明に従う m i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤の配列は、生理的条件下で m i R - 1 5 5 - 5 p にハイブリダイズし、被験体の細胞において m i R - 1 5 5 - 5 p の活性または機能を阻害するのに十分に、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して相補的である。例えば、一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して少なくとも部分的に相補的な配列、例えば、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して少なくとも約 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 % 相補的な配列を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して実質的に相補的、即ち、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して少なくとも約 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %または 9 9 % 相補的であり得る。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して 1 0 0 % または完全に相補的な配列を含む。オリゴヌクレオチド阻害剤の配列は、オリゴヌクレオチド阻害剤配列が、天然に存在するヌクレオチドの代わりに改变型ヌクレオチドを含む場合であっても、m i R - 1 5 5 に対して相補的であるとみなされると理解される。例えば、m i R - 1 5 5 の成熟配列が、特定の位置においてグアノシンヌクレオチドを含む場合、オリゴヌクレオチド阻害剤は、対応する位置において、改变型シチジンヌクレオチド、例えば、ロックトシチジンヌクレオチドまたは 2' - フルオロ - シチジンを含み得る。

10

## 【 0 0 2 5 】

用語「約」は、本明細書で使用する場合、+ / - 1 0 % の、より好ましくは + / - 5 % の変動を包含することを意図し、かかる変動は、本発明の実施に適切である。

20

## 【 0 0 2 6 】

一部の実施形態では、m i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤の配列全体が、ヒト m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列に対して完全に相補的である。種々の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の配列が部分的に、実質的にまたは完全に相補的であるヒト m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列は、配列番号 1 の 5' 末端からヌクレオチド 1 ~ 1 7、またはヌクレオチド 2 ~ 1 7、またはヌクレオチド 2 ~ 1 6、またはヌクレオチド 2 ~ 1 5、またはヌクレオチド 2 ~ 1 4、またはヌクレオチド 2 ~ 1 3、またはヌクレオチド 2 ~ 1 2 を含む。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の配列が部分的に、実質的にまたは完全に相補的であるヒト m i R - 1 5 5 - 5 p の成熟配列は、配列番号 1 の 5' 末端からヌクレオチド 2 ~ 1 3 を含む。

30

## 【 0 0 2 7 】

一実施形態では、m i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも 1 つの骨格改変、例えば、少なくとも 1 つのホスホロチオエート、モルホリノまたはホスホノカルボキシレート (phosphonocarboxylate) ヌクレオチド間連結を含有する（例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,693,187 号および同第 7,067,641 号を参照のこと）。ある特定の実施形態では、m i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤は、完全にホスホロチオエート連結される。

## 【 0 0 2 8 】

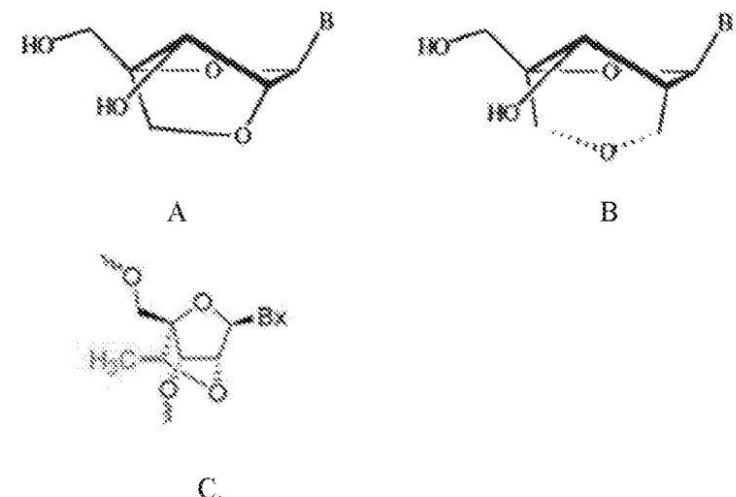
一実施形態では、m i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも 1 個の改変型ヌクレオチド、例えば、ロックトヌクレオチド、または他の糖もしくは塩基改変を含有するヌクレオチドを含有する。用語「ロックトヌクレオチド」、「ロックト核酸単位」、「ロックト核酸残基」または「LNA 单位」は、本開示を通じて相互交換可能に使用され得、二環式ヌクレオシドアナログを指す。例えば、適切なオリゴヌクレオチド阻害剤は、B S N を含有するオリゴヌクレオチドとそれらの相補的標的鎖との間で形成される複合体に増強された熱安定性を付与する 1 つまたは複数の「コンフォメーション的に拘束された」または二環式糖ヌクレオシド改変 (B S N ) から構成され得る。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、2' - O, 4' - C - メチレンリボヌクレオシド (構造 A) を含有するロックトヌクレオチド即ち LNA を含有し、ここで、リボース糖部分は、「ロックト」コンフォメーションである。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、

40

50

少なくとも1つの2'，4' - C架橋2' - デオキシリボヌクレオシド(CDNA構造B)を含有する。例えば、その両方がそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,403,566号およびWangら(1999年)Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters、9巻：1147～1150頁を参照のこと。さらに別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、構造Cで示される構造を有する改変型ヌクレオシドを少なくとも1個含有する。miR-155を標的化するオリゴヌクレオチド阻害剤は、BSN(LNA、CDNAなど)または他の改変型ヌクレオチドと、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドとの組合せを含有し得る。

## 【化1】



10

20

## 【0029】

本発明に関してその対応するロックトヌクレオチドによってDNAまたはRNAヌクレオチドを置換することに言及する場合、用語「対応するロックトヌクレオチド」は、DNA/RNAヌクレオチドが、それが置き換えたDNA/RNAヌクレオチドと同じ天然に存在する窒素性塩基、または化学的に改変された同じ窒素性塩基を含有するロックトヌクレオチドによって置き換えられていることを意味することを意図する。例えば、窒素性塩基Cを含有するDNAヌクレオチドの対応するロックトヌクレオチドは、同じ窒素性塩基C、または5-メチルシトシンなどの、化学的に改変された同じ窒素性塩基Cを含有し得る。

30

## 【0030】

用語「非ロックトヌクレオチド」は、ロックトヌクレオチドとは異なるヌクレオチドを指す、即ち、用語「非ロックトヌクレオチド」は、DNAヌクレオチド、RNAヌクレオチド、ならびに改変がロックト改変でない点を除いて塩基および/または糖が改変された改変型ヌクレオチドを含む。

40

## 【0031】

一実施形態では、miR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも9個のロックトヌクレオチドを含有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドは、ロックトヌクレオチドである。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の4ヌクレオチドは、ロックトヌクレオチドである。さらに別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から最初のヌクレオチドは、ロックトヌクレオチドである。

## 【0032】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個または少なくとも5個のDNAヌクレオチドを含有する。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目の

50

ヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目および6番目のヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。さらに別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目、6番目および8番目のヌクレオチドは、DNAヌクレオチドである。

【0033】

一実施形態では、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、11~16ヌクレオチドの配列を含み、オリゴヌクレオチド阻害剤は、m i R - 155の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドは、ロツクトヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)ヌクレオチドである。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から4番目のヌクレオチドもまた、ロツクトヌクレオチドである。なおさらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から6番目のヌクレオチドはDNAヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、12ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、少なくとも9個のロツクトヌクレオチドを含有する。

10

【0034】

一実施形態では、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤は、配列番号23の配列を含む。

20

【0035】

種々の実施形態では、m i R - 155 - 5pのオリゴヌクレオチド阻害剤は、表1から選択される配列を有する。

## 【表1】

表1

配列番号	改変 <sup>1</sup> を有する配列(5'-3')
配列番号 3	5'-lAs.dTs.dCs.dAs.lCs.lGs.dAs.lTs.dTs.lAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 4	5'-lAs.dTs.dCs.dAs.lCs.lGs.dAs.dTs.lTs.lAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 5	5'-lAs.lTs.dCs.dAs.dCs.lGs.dAs.lTs.dTs.lAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 6	5'-lAs.lTs.dCs.dAs.dCs.lGs.lAs.dTs.dTs.lAs.lGs.lCs.dAs.lTs.dTs.lA-3'
配列番号 7	5'-lAs.dTs.dCs.dAs.lCs.lGs.dAs.lTs.dTs.lAs.lGs.dCs.lAs.lTs.dTs.lA-3'
配列番号 8	5'-lAs.lTs.dCs.dAs.lCs.dGs.dAs.dTs.lTs.lAs.dGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 9	5'-lAs.dTs.dCs.dAs.lCs.dGs.lAs.dTs.lTs.lAs.dGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 10	5'-lAs.dTs.dCs.lAs.dCs.dGs.lAs.lTs.dTs.lAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 11	5'-lAs.dTs.lCs.dAs.dCs.lGs.dAs.lTs.lTs.dAs.dGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 12	5'-lAs.lTs.dCs.lAs.lCs.dGs.dAs.dTs.lTs.lAs.dGs.lCs.lAs.dTs.dTs.lA-3'
配列番号 13	5'-lAs.dTs.lCs.dAs.dCs.dGs.lAs.dTs.lTs.lAs.dGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 14	5'-lAs.dTs.lCs.dAs.lCs.dGs.lAs.dTs.lTs.dAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 15	5'-lTs.dCs.dAs.lCs.dGs.dAs.lTs.dTs.dAs.lGs.dCs.lAs.lTs.dTs.lA-3'
配列番号 16	5'-lTs.dCs.lAs.dCs.dGs.lAs.lTs.dTs.dAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 17	5'-lTs.dCs.dAs.dCs.lGs.lAs.lTs.dTs.dAs.lGs.dCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 18	5'-lTs.lCs.lAs.dCs.lGs.dAs.dTs.lTs.lAs.dGs.lCs.dAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 19	5'-lTs.dCs.dAs.lCs.dGs.dAs.dTs.lTs.lAs.lGs.lCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'
配列番号 20	5'-lTs.dCs.lAs.dCs.lGs.lAs.lTs.dTs.dAs.lGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 21	5'-lGs.lAs.lTs.lTs.lAs.lGs.dCs.lAs.lTs.dTs.lA-3'
配列番号 22	5'-lCs.dGs.lAs.lTs.lTs.lAs.lGs.dCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'
配列番号 23	5'-lCs.dGs.lAs.lTs.lTs.dAs.lGs.dCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'
配列番号 24	5'-lCs.lAs.dCs.lGs.dAs.lTs.lTs.dAs.lGs.dCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'
配列番号 25	5'-lCs.dAs.lCs.dGs.dAs.lTs.lTs.dAs.lGs.dCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'
配列番号 26	5'-lTs.dCs.lAs.mdCs.lGs.lAs.lTs.dTs.dAs.lGs.lCs.lAs.dTs.lTs.lA-3'
配列番号 27	5'-lTs.lAs.lGs.lCs.lAs.lTs.lTs.lA-3'

<sup>1</sup>1=ロックト核酸改変; d=デオキシリボヌクレオチド; s=ホスホロチオエート連結; md=5-

メチルシトシン。

10

20

30

40

50

## 【0036】

本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、塩基改変または置換を有する改変型ヌクレオチドを含み得る。RNA中の天然または未改変の塩基は、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基シトシン(C)およびウラシル(U)(DNAはチミン(T)を有する)である。複素環式塩基部分とも称される改変型塩基には、他の合成および天然の核酸塩基、例えば、5'-メチルシトシン(5'-methyl-C)、5'-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2'-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6'-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2'-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2'-チオウラシル、2'-チオチミンおよび2'-チオシト

シン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルならびに他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ(5-ブロモ、5-トリフルオロメチルならびに他の5-置換ウラシルおよびシトシンを含む)、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンが含まれる。ある特定の実施形態では、m i R - 155を標的化するオリゴヌクレオチド阻害剤は、塩基改変(例えば、5-メチルシチジン)と組み合わせて、1つまたは複数のBSN改変を含む。

10

## 【0037】

本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、改変型糖部分を有するヌクレオチドを含み得る。代表的な改変型糖には、炭素環式または非環式の糖、それらの2'位、3'位または4'位のうち1つまたは複数において置換基を有する糖、および糖の1個または複数の水素原子の代わりに置換基を有する糖が含まれる。ある特定の実施形態では、糖は、2'位に置換基を有することによって改変される。さらなる実施形態では、糖は、3'位に置換基を有することによって改変される。他の実施形態では、糖は、4'位に置換基を有することによって改変される。糖が、それらの位置のうち1つよりも多くにおいて改変を有し得ること、またはオリゴヌクレオチド阻害剤が、1つの位置において糖改変を有する1個もしくは複数のヌクレオチドを有し得、異なる位置において糖改変を有する1個もしくは複数のヌクレオチドもまた有し得ることもまた企図される。

20

## 【0038】

本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤中の企図される糖改変には、OH; F; O-、S-もしくはN-アルキル; O-、S-もしくはN-アルケニル; O-、S-もしくはN-アルキニル; またはO-アルキル-O-アルキルから選択される置換基が含まれるがこれらに限定されず、ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルまたはC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルケニルおよびアルキニルで置換されていても置換されてもよい。一実施形態では、改変には、2'-メトキシエトキシ(2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知の2'-O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)、即ち、アルコキシアルコキシ基が含まれる。別の改変には、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、2'-DMAOEとしても公知のO(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該分野で2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチルまたは2'-DMAEOEとしても公知)即ち、2'-O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-N(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>が含まれる。

30

## 【0039】

さらなる糖置換基には、アリル(-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、-O-アリル、メトキシ(-O-CH<sub>3</sub>)、アミノプロポキシ(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)およびフルオロ(F)が含まれる。2'位(2'-)上の糖置換基は、アラビノ(上)位置またはリボ(下)位置にあり得る。1つの2'-アラビノ改変は、2'-Fである。他の類似の改変は、糖部分上の他の位置、特に、3'末端ヌクレオシド上または2'-5'連結されたオリゴヌクレオチド中の糖の3'位、および5'末端ヌクレオチドの5'位においてもなされ得る。ある特定の実施形態では、糖改変は、2'-O-アルキル(例えば、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル)、2'-ハロ(例えば、2'-フルオロ、2'-クロロ、2'-ブロモ)および4'チオ改変である。

40

## 【0040】

その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,838,283号に記載されるものなどの、安定性を増強し、効力を改善するためのオリゴヌクレオチド阻害剤の他の改変が当該分野で公知であり、本発明の方法における使用に適切である。例えば、in vivo送達および安定性を促進するために、オリゴヌクレオチド阻害剤は、その3

50

’末端において、コレステロール部分などのステロイド、ビタミン、脂肪酸、炭水化物もしくはグリコシド、ペプチド、または他の小分子リガンドに連結され得る。

#### 【0041】

被験体への本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、被験体の細胞においてm i R - 1 5 5 の活性または機能を低減または阻害する。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、中枢神経系（C N S）の細胞においてm i R - 1 5 5 の活性または機能を低減させる。用語「C N Sの細胞」または「C N Sの炎症細胞」は、本明細書で使用する場合、リンパ球、単球、マクロファージ、グリア細胞、例えば、ミクログリアおよびアストロサイト、ならびにニューロン細胞を含む。一実施形態では、C N Sの細胞は、脊髄中に遊走できる、末梢もしくは循環単球、または末梢血リンパ球である。別の実施形態では、C N Sの細胞は、ミクログリアである。

10

#### 【0042】

一部の実施形態では、本発明のある特定のオリゴヌクレオチド阻害剤は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、末梢単球またはミクログリアなどのC N Sの細胞において、m i R - 1 5 5 の活性または機能のより高い阻害を示し得る。用語「他のm i R - 1 5 5 阻害剤」は、核酸阻害剤、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗m i R、アンタゴm i R、ミックスマー、ギャップマー（g a p m e r）、アブタマー、リボザイム、低分子干渉R N Aもしくは低分子ヘアピンR N A；抗体もしくはその抗原結合性断片；および／またはm i R - 1 5 5 の発現もしくは活性を阻害する薬物を含む。本発明の特定のオリゴヌクレオチド阻害剤は、本発明の他のオリゴヌクレオチド阻害剤と比較して、C N S細胞において、m i R - 1 5 5 のより高い阻害を示し得る可能性がある。用語「より高い」は、本明細書で使用する場合、定量的により多いこと、または統計的に有意により多いことを指す。

20

#### 【0043】

本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、被験体の細胞においてm i R - 1 5 5 標的遺伝子の発現または活性を上方調節する。m i R - 1 5 5 の標的遺伝子には、I L 7 r、T l r 6、M e f 2 a、I n p p 5 d、C t t n b p 2 n 1、1 8 1 0 0 1 1 0 1 0 R i k、F a d s 1、C u x 1、A p 3 d 1、X 9 9 3 8 4、O 1 f m 1 3、M a f b、C s f 1 r、T g f b r 2、B a c h 1、S a l 1 1、R a p g e f 5、C E B P B、C C n d 1、M s r 1、J a r i d 2、M r 1、G n a s およびM e c p 2 が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N Sの細胞において、m i R - 1 5 5 の少なくとも4個の標的遺伝子の発現または活性を上方調節する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドによって上方調節される標的遺伝子には、I L 7 r、T l r 6、M e f 2 a、I n p p 5 d、C t t n b p 2 n 1、S a 1 1 1、J a r i d 2、M r 1、G n a s およびM e c p 2 が含まれる。別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N Sの細胞において恒常性遺伝子の発現または活性を上方調節する。本発明は、m i R - 1 5 5 阻害剤の活性を決定するための手段として、4個またはそれを超える遺伝子の発現における変化（遺伝子発現シグネチャー）、または恒常性遺伝子の発現における変化を使用することを包含する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与の際に、m i R - 1 5 5 標的遺伝子の発現または活性において、それらの間の値を含め、約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍または8倍の変化が存在する。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与の際に、m i R - 1 5 5 標的遺伝子の発現または活性において、それらの間の値を含め、少なくとも約2倍、3倍、4倍または5倍の変化が存在する。

30

#### 【0044】

一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、C N S細胞において、m i R - 1 5 5 標的遺伝子のより高い上方調節を示す。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、C N Sの細胞において、m i R - 1 5 5 の少なくとも4個の標的遺伝子のより高い上方調節を示す。一部の他の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は

40

50

、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、C N S の細胞において、恒常性遺伝子のより高い上方調節を示す。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、C N S 細胞において、I L 7 r 、T l r 6 、M e f 2 a 、I n p p 5 d 、C t t n b p 2 n l 、S a l 1 1 、J a r i d 2 、M r 1 、G n a s およびM e c p 2 からなる群より選択される1個または複数の遺伝子の発現または活性のより高い上方調節を示す。別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較して、C N S 細胞において、恒常性遺伝子の活性または機能のより高い上方調節を示す。種々の実施形態では、「より高い上方調節」は、他のm i R - 1 5 5 阻害剤と比較した、m i R - 1 5 5 標的遺伝子の発現または活性における、それらの間の値を含め、約2倍、3倍、4倍または5倍の増加を含む。

10

#### 【0 0 4 5】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の炎症細胞の活性を低減または阻害する。ミクログリアを含む非ニューロン細胞の炎症が、A L S におけるニューロン死に寄与することが示されている（B o i l l e e ら、2 0 0 6 年；N a g a i ら、2 0 0 7 年）。用語「C N S の炎症細胞の活性」は、C N S の単球およびミクログリアによって媒介される1つまたは複数の炎症応答を指す。炎症応答には、サイトカインおよび／またはケモカインの分泌、走化性、炎症した領域への単球、マクロファージ、好中球などの免疫系の細胞の遊走または浸潤、食作用、反応性酸素種および一酸化窒素の放出などが含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、単球およびミクログリアなどの細胞によって媒介される炎症応答を下方調節することによって、C N S の炎症細胞の活性を下方調節する。例えば、一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、神経炎症に罹患している被験体の脊髄中への循環単球の遊走または動員を下方調節する。別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の単球、マクロファージおよび／またはミクログリア細胞による、T N F 、I L - 1 、I L - 6 などの炎症性サイトカインの産生を下方調節する。

20

#### 【0 0 4 6】

局所的組織環境に依存して、単球、マクロファージおよびミクログリアが、M 1 （炎症促進性／組織破壊的）またはM 2 （抗炎症性／組織保護的）表現型へと分化／極性化し得ることが公知である。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤は、C N S の細胞において、M 2 ／組織保護的表現型に向かう単球、マクロファージおよびミクログリアの極性化を指示する遺伝子の発現または活性を上方調節する。

30

#### 【0 0 4 7】

本発明は、本発明に従うm i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤を被験体に投与するステップを含む、それを必要とする被験体において神経学的疾患を処置するための方法を提供する。m i R - 1 5 5 の活性または機能は、オリゴヌクレオチド阻害剤の投与後に、被験体のC N S の細胞において低減される。一実施形態では、神経学的疾患を処置するための方法は、1 1 ~ 1 6 ヌクレオチドの配列を有するm i R - 1 5 5 のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与するステップを含み、オリゴヌクレオチド阻害剤は、m i R - 1 5 5 の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；前記オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドは、ロックトヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドは、デオキシリボ核酸（D N A ）ヌクレオチドである。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から6番目のヌクレオチドもまた、D N A ヌクレオチドである。本発明に従って処置され得る神経学的疾患には、筋萎縮性側索硬化症（A L S ）、多発性硬化症（M S ）、アルツハイマー病（A D ）、日本脳炎ウイルス（J E V ）誘導性神経炎症、アルコール誘導性神経炎症、外傷性脳傷害を含む急性および慢性の中枢神経系（C N S ）傷害、自己免疫性脳脊髄炎、パーキンソン病（P D ）、ハンチントン病（H D ）、脳卒中、脳腫瘍、心虚血、加齢性黄斑変性（A M D ）、網膜色素変性症（R P ）ならびに神経障害性疼痛が含まれる。ある特定の実施形態では、神経学的疾患を処置するための方法は、配列番号2 3 の配列を有するオリゴヌクレオチド阻害剤を投与するステッ

40

50

プを含む。

【0048】

本発明は、本発明に従うm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与することによって、それを必要とする被験体において神経炎症を処置または好転させるための方法もまた包含する。m i R - 155の活性または機能は、オリゴヌクレオチド阻害剤の投与後に、被験体のC N Sの細胞において低減される。神経炎症のための処置を必要とする被験体は、神経学的疾患、例えば、A L S、多発性硬化症、アルツハイマー病、日本脳炎ウイルス誘導性神経炎症、アルコール誘導性神経炎症、外傷性脳傷害を含む急性および慢性の中枢神経系傷害、自己免疫性脳脊髄炎、パーキンソン病、ハンチントン病、脳卒中、脳腫瘍、心虚血、加齢性黄斑変性、網膜色素変性症ならびに神経障害性疼痛に罹患している可能性がある、またはかかる神経学的疾患を発症するリスクがある。  
10

【0049】

一実施形態では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤を投与するステップを含む、神経学的疾患において炎症細胞の活性を低減または阻害するための方法を提供する。m i R - 155の活性または機能は、オリゴヌクレオチド阻害剤の投与後に、中枢神経系(C N S)の炎症細胞において低減される。本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、炎症細胞の種々の活性、例えば、サイトカインおよび/またはケモカインの分泌、走化性、炎症した領域への単球、マクロファージ、好中球などの免疫系の細胞の遊走または浸潤、食作用、反応性酸素種および一酸化窒素の放出などを下方調節し得る。一実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、脊髄中への炎症細胞の動員または遊走を下方調節することによって、炎症細胞の活性を低減または阻害する。別の実施形態では、オリゴヌクレオチド阻害剤は、M 1 / 炎症促進性 / 組織破壊的表現型に関与する遺伝子の発現を下方調節すること、および/またはM 2 / 抗炎症性 / 組織保護的表現型に関与する遺伝子を上方調節することによって、炎症細胞の活性を低減または阻害する。  
20

【0050】

好ましくは、被験体への本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、神経学的疾患と関連する1つまたは複数の症状または病態の改善を生じる。例えば、一実施形態では、A L Sに罹患している患者への本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、脚、手、肩、腕および他の身体部分における筋力低下を低減する；筋痙攣を低減する；発話を改善する；歩行能力を改善する、など。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤の投与は、C N S中に存在するニューロンの炎症を低減する。  
30

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「被験体」または「患者」は、ヒトおよび他の靈長類(例えば、チンパンジーならびに他の類人猿およびサル種)、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ)、飼育哺乳動物(例えば、イヌおよびネコ)、実験動物(例えば、げっ歯類、例えば、マウス、ラットおよびモルモット)、ならびに鳥(例えば、家禽、野鳥および獣鳥、例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよび他のキジ類の鳥、アヒル、ガチョウなど)が含まれるがこれらに限定されない任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態では、被験体は哺乳動物である。他の実施形態では、被験体はヒトである。

【0052】

本明細書に記載されるm i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤のいずれかは、m i R - 155オリゴヌクレオチド阻害剤をコードする発現ベクターを細胞に送達することによって、標的細胞(例えば、単球)に送達され得る。「ベクター」は、細胞の内側に目的の核酸を送達するために使用され得る物質の組成物である。直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に会合したポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスが含まれるがこれらに限定されない多数のベクターが、当該分野で公知である。したがって、用語「ベクター」は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが含まれるがこれらに限定されない。特定の一実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである。発現構築物  
40

は、生細胞中で複製され得、または合成により作製され得る。本出願の目的のために、用語「発現構築物」、「発現ベクター」および「ベクター」は、一般的な説明的意味において本発明の適用を実証するために相互交換可能に使用され、本発明を限定することは意図しない。

#### 【0053】

一実施形態では、m i R - 155のオリゴヌクレオチド阻害剤を発現させるための発現ベクターは、オリゴヌクレオチド阻害剤をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーターを含む。語句「作動可能に連結した」または「転写制御下にある」は、本明細書で使用する場合、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するために、プロモーターがポリヌクレオチドに対して正確な位置および配向にあることを意味する。10

#### 【0054】

本明細書で使用する場合、「プロモーター」は、遺伝子の特異的転写を開始するために必要な、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列を指す。適切なプロモーターには、RNA pol I、pol II、pol IIIおよびウイルスプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）最初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーターおよびラウス肉腫ウイルスの長い末端反復）が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、プロモーターは、単球特異的プロモーター、例えば、CD14プロモーター、CD68プロモーターなどである。別の実施形態では、プロモーターは、ミクログリア特異的プロモーター、例えば、CX3CR1プロモーター、F4/80プロモーターなどである。20

#### 【0055】

ある特定の実施形態では、m i R - 155オリゴヌクレオチド阻害剤をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結したプロモーターは、誘導性プロモーターであり得る。誘導性プロモーターは、当該分野で公知であり、これには、テトラサイクリンプロモーター、メタロチオネインIIAプロモーター、ヒートショックプロモーター、ステロイド/甲状腺ホルモン/レチノイン酸応答エレメント、アデノウイルス後期プロモーター、および誘導性マウス乳癌ウイルスLTRが含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0056】

発現構築物および核酸を細胞に送達する方法は、当該分野で公知であり、これには、例えば、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、DEAE-デキストラン、リポフェクション、ポリアミントランスクフェクション試薬を用いるトランスフェクション、細胞超音波処理、高速微小発射体（high velocity microprojectile）を使用する遺伝子銃（gene bombardment）、および受容体媒介性トランスフェクションが含まれ得る。30

#### 【0057】

本発明は、ALSなどの神経学的疾患を診断するための方法、および神経学的疾患のための処置を受けている患者の臨床状態をモニタリングするための方法もまた提供する。例えば、本発明は、本発明の抗m i R - 155化合物の投与が、対照処理細胞と比較して、SOD1マウス（ALSのマウスモデル）から単離されたミクログリア細胞において独自のセットの遺伝子を上方調節または下方調節することを示している。本発明は、ALSを診断するため、およびm i R - 155阻害剤によるALS処置の進行をモニタリングするために、この独自のセットの遺伝子に基づく遺伝子発現シグネチャーを使用することを企図する。40

#### 【0058】

例えば、一実施形態では、本発明は、ALSまたは神経炎症の処置のために被験体を選択するための方法であって、被験体のCNS細胞において、IL7r、Tlr6、Mef2a、Inpp5d、Ctnbp2nl、1810011010Rik、Fads1、Cux1、Ap3d1、X99384、Olfm13、Mafb、Csfr、Tgfb2r2、Bach1、Sal111、Rapgef5、CEBPB、CCnd1、Msrl、50

Jarid2、Mr1、GnasおよびMecp2からなる群より選択される1個または複数の遺伝子の発現のレベルを決定するステップ；被験体のCNS細胞における1個または複数の遺伝子のレベルを、同じ1個または複数の遺伝子の参照レベルと比較するステップ；ならびに参照レベルと比較して、CNS細胞における1個または複数の遺伝子のレベルにおける減少を有する被験体をALSまたは神経炎症の処置のために選択するステップを含む、方法を提供する。一実施形態では、ALSまたは神経炎症の処置のために被験体を選択するための方法は、同じ遺伝子の参照レベルと比較して、被験体のCNS細胞におけるIL7r、T1r6、Mef2a、Inpp5d、Cttnbp2n1、Sal111、Jarid2、Mr1、GnasおよびMecp2からなる群より選択される少なくとも4個の遺伝子のレベルを決定するステップを含む。ある特定の実施形態では、ALSまたは神経炎症の処置のために被験体を選択するための方法は、同じ遺伝子の参照レベルと比較して、被験体のCNS細胞におけるIL7r、T1r6、Mef2a、Inpp5d、Cttnbp2n1、Sal111、Jarid2、Mr1、GnasおよびMecp2からなる群より選択される少なくとも4個の遺伝子のレベルを決定するステップ；ならびに参照レベルと比較して、CNS細胞における選択された遺伝子のレベルにおける多くとも2分の1の減少を有する被験体をALSまたは神経炎症の処置のために選択するステップを含む。一実施形態では、CNSの細胞は、被験体の脳脊髄液(CSF)を得ることによって得られ得る。一実施形態では、参照レベルは、対照オリゴヌクレオチド処理細胞における同じ遺伝子の発現のレベルである。別の実施形態では、参照レベルは、健康な被験体（例えば、神経変性障害の2つもしくはそれを超える症状を示さない被験体、神経変性障害と診断されていない被験体、および/または神経変性疾患の家族歴を有さない被験体）における同じ遺伝子の発現のレベルである。

10

20

30

40

## 【0059】

本発明はまた、抗miR-155化合物による処置の効力を評価するための方法であって、抗miR-155化合物による処置の前に、被験体の細胞において、1個または複数の遺伝子の発現のレベルを決定するステップであって、1個または複数の遺伝子が、CNS細胞においてモジュレートされた遺伝子のセット、例えば、IL7r、T1r6、Mef2a、Inpp5d、Cttnbp2n1、Sal111、Jarid2、Mr1、GnasおよびMecp2から選択される、ステップ；抗miR-155化合物による処置の後に、被験体の細胞において、同じ1個または複数の遺伝子の発現のレベルを決定するステップ；ならびに処置の前および後の発現レベルに基づいて、処置が有効である、あまり有効でない、または有効でないことを決定するステップを含む、方法を提供する。即ち、一実施形態では、抗miR-155化合物に応答して上方調節または下方調節されたと本明細書に開示される標的遺伝子は、抗miR-155処置の臨床的効力についてのバイオマーカーとして機能する。

## 【0060】

本発明は、本明細書に開示されるmiR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物もまた提供する。一実施形態では、医薬組成物は、有効用量の、11～16ヌクレオチドの配列を有するmiR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤を含み、オリゴヌクレオチド阻害剤は、miR-155の成熟配列に対して完全に相補的であり、かつ完全ホスホロチオエート骨格を有し；オリゴヌクレオチド阻害剤の3'末端から少なくとも最初の3ヌクレオチドは、ロックトヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチド阻害剤の5'末端から少なくとも2番目のヌクレオチドは、デオキシリボ核酸(DNA)ヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、有効用量の、配列番号23の配列を有するオリゴヌクレオチド阻害剤を含む。さらに他の実施形態では、医薬組成物は、表1に列挙された配列から選択される配列を有するオリゴヌクレオチド阻害剤を含む。

## 【0061】

「有効用量」は、有益なまたは所望の臨床結果をもたらすのに十分な量である。本発明のmiR-155のオリゴヌクレオチド阻害剤の有効用量は、約1mg/kg～約100

50

$\text{mg} / \text{kg}$ 、約 $2.5\text{ mg} / \text{kg}$ ～約 $50\text{ mg} / \text{kg}$ または約 $5\text{ mg} / \text{kg}$ ～約 $25\text{ mg} / \text{kg}$ であり得る。有効用量とみなされるものの正確な決定は、患者の大きさ、年齢、障害の型、および阻害剤の形態（例えば、ネイキッドオリゴヌクレオチドまたは発現構築物など）を含む、各患者にとって個別の要因に基づき得る。したがって、投薬量は、本開示および当該分野の知識から、当業者によって容易に確認され得る。臨床適用が企図される場合、医薬組成物は、意図した適用に適切な形態で調製される。一般に、これは、発熱物質、およびヒトまたは動物にとって有害であり得る他の不純物を本質的に含まない組成物の調製を必然的に伴う。

#### 【0062】

本発明の医薬組成物は、オリゴヌクレオチド阻害剤を、全身的または中枢神経系に局所的に（直接的送達）送達するために製剤化され得る。中枢神経系（CNS）中への医薬品薬剤／医薬組成物の送達は、血液脳関門の存在に起因して困難である。種々の薬物送達戦略が、血液脳関門（BBB）を横切った CNS 中への活性薬剤の送達を改善するために使用されてきた。例えば、全身投与される活性薬剤を CNS に送達するために、ナノ担体の内側へのそれらのカプセル封入を介してそれらの固有の物理化学的特徴を遮蔽することによって、輸送不能な薬物が BBB を横切るのを可能にするコロイド性薬物ナノ担体（即ち、ミセル、リポソームおよびナノ粒子）が、使用され得る。近年、内因性トランスポーター、例えば、脳毛細血管内皮由来の受容体トランスポーター、担体トランスポーターおよび能動排出トランスポーターが、リガンドとして使用されており、送達効力を改善するためにナノ担体系中に取り込まれる。本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤を CNS に送達するために、これらおよび他の当該分野で認識された技術によって調製された医薬組成物を包含する。

#### 【0063】

一実施形態では、コロイド分散系、例えば、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベースの系が、本発明のオリゴヌクレオチド阻害剤のための送達ビヒクル、またはそれらを発現する構築物として、使用され得る。本発明の核酸を送達するのに適切であり得る市販の脂肪エマルジョンには、Intralipid（登録商標）、Liposyn（登録商標）、Liposyn II、Liposyn III、Nutriliqid および他の類似の脂質エマルジョンが含まれる。送達ビヒクルとしての in vivo での使用に好ましいコロイド系は、リポソーム（即ち、人工膜小胞）である。かかる系の調製および使用は、当該分野で周知である。例示的な製剤は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、US 5,981,505；US 6,217,900；US 6,383,512；US 5,783,565；US 7,202,227；US 6,379,965；US 6,127,170；US 5,837,533；US 6,747,014；およびWO 03/093449にも開示されている。

#### 【0064】

ある特定の実施形態では、送達に使用されるリポソームは、米国付与前公開第 20110076322 号に詳細に記載される SMARTICLES（登録商標）（Marina Biotech, Inc.）などの両性リポソームである。SMARTICLES（登録商標）上の表面電荷は、完全に可逆性であり、それを核酸の送達に特に適切なものにしている。SMARTICLES（登録商標）は、注射を介して送達され、安定なままであり、凝集体を含まず、細胞膜を横切って核酸を送達できる。

#### 【0065】

他の実施形態では、本発明の医薬組成物は、脳脊髄液（CSF）中への脳室内（ICV）注射／注入、髄腔内注射、硬膜外注射、対流強化（convection-enhanced）送達（CED）によるカテーテルを使用した脳実質中への薬物溶液の実質内注入、および脳実質中への生分解性薬物送達ビヒクルの直接移植を介して、中枢神経系に直接投与され得る。CNS に活性薬剤を送達する種々の経路は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Journal of Controlled Release T

10

20

30

40

50

opic Collection: Central Nervous System Drug Delivery 2巻、2号中のC. LeiおよびC. Wangによる論文、表題「Central Nervous System Drug Delivery」中に開示されている。

## 【0066】

一般に、送達ビヒクルを安定にし、標的細胞による取込みを可能にするために、適切な塩および緩衝液を用いることが望ましい。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体中に溶解または分散された阻害剤ポリヌクレオチドを含む有効量の送達ビヒクル（例えば、リポソームまたは他の複合体もしくは発現ベクター）を含む。語句「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」は、動物またはヒトに投与された場合に、有害な、アレルギー性のまたは他の都合の悪い反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、ヒトへの投与に適切な医薬品などの医薬品を製剤化する際の使用に許容される、溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のかかる媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤が本発明の活性成分と不適合性である場合を除き、治療組成物におけるその使用が企図される。補足的な活性成分もまた、組成物のベクターまたはポリヌクレオチドを不活性化しない限り、組成物中に取り込まれ得る。

10

## 【0067】

注射可能な使用に適切な薬学的形態には、例えば、無菌の水性溶液または分散物、および無菌の注射可能な溶液または分散物の即座の調製のための無菌粉末が含まれる。一般に、これらの調製物は、無菌であり、容易な注射可能性 (injectability) が存在する程度まで流動的である。調製物は、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。適切な溶媒または分散媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および植物油を含有し得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合には必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の延長された吸収は、組成物における、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。

20

## 【0068】

無菌の注射可能な溶液は、望ましい場合には任意の他の成分（例えば、上に列挙した通り）と共に、溶媒中に適切な量で活性化合物を取り込み、その後、濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、基本分散媒および例えば上に列挙した通りの所望の他の成分を含有する無菌ビヒクル中に、種々の無菌化された活性成分を取り込むことによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法には、以前に無菌濾過されたその溶液から活性成分（複数可）プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ技術が含まれる。

30

## 【0069】

本発明の組成物は一般に、中性または塩形態で製剤化され得る。薬学的に許容される塩には、例えば、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）から誘導される酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される）が含まれる。タンパク質の遊離カルボキシル基と形成される塩は、無機塩基（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄）からまたは有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど）からも誘導され得る。

40

50

## 【0070】

製剤化の際に、組成物は、好ましくは、投薬製剤と適合性の様式で、治療的に有効な量で投与される。製剤は、種々の剤形、例えば、注射可能な液剤、経口延長放出剤形などで容易に投与され得る。水性溶液中での非経口投与のために、例えば、溶液は一般に、適切に緩衝化され、液体希釈剤は、例えば十分な食塩水またはグルコースで最初に等張性にされる。かかる水性溶液は、例えば、静脈内、皮下および皮内投与に使用され得る。好ましくは、無菌水性媒体は、特に本開示に照らして、当業者に公知のように用いられる。投薬量における幾分かの変動が、処置されている被験体の状態に依存して必然的に生じる。投与を担う人は、いずれの事象においても、個々の被験体に適切な用量を決定する。さらに、ヒト投与のために、調製物は、規制機関によって要求される無菌性、発熱性、全般的安全性および純度の標準を満たすべきである。

10

## 【0071】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、投与のためのデバイスで包装され、または投与のためのデバイス内に貯蔵される。注射可能な製剤のためのデバイスには、注射ポート、オートインジェクター、注射ポンプおよび注射ペンが含まれるがこれらに限定されない。エアロゾル化製剤または粉末製剤のためのデバイスには、吸入器、注入器、吸引器などが含まれるがこれらに限定されない。したがって、本発明は、本明細書に記載される障害のうち1つまたは複数を処置または予防するための本発明の医薬組成物を含む投与デバイスを含む。

20

## 【0072】

本発明は、限定として解釈すべきではない以下のさらなる実施例によってさらに例示される。当業者は、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなしに、開示された具体的実施形態に対して多くの変化がなされ得るが、同様または類似の結果がなおも得られ得ることを理解すべきである。

## 【0073】

本開示を通じて言及される全ての特許および非特許文献は、全ての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【実施例】

## 【0074】

(実施例1：ヒト単球性細胞における2つの直接的なシードマッチした標的(Cu<sub>x</sub>1およびCEBPB)の発現に対する抗m i R - 155化合物の効果)

30

抗m i R - 155化合物を、ヌクレオフェクション(nucleofection)によってMV4-11ヒト単球性細胞に送達した。2つの直接的なシードマッチした標的(Cu<sub>x</sub>1およびCEBPB)の調節を、未処理細胞と比較してリアルタイムPCRによって測定した。標識された化合物は、分析した2つの標的の最も高い調節を実証した(図1)。

40

## 【0075】

(実施例2：ミクログリア細胞による抗m i R - 155化合物の受動的取込みは、m i R - 155標的遺伝子の発現を上方調節する)

成体SOD1マウスから単離したミクログリアを、1 μMの最終濃度の抗m i R - 155化合物(配列番号21、23、25、26および3)を含有する培養培地中で受動的にインキュベートした。2つの直接的なシードマッチした標的(8、7および6ヌクレオチドの結合部位)であるCSF1RおよびOLFML3の発現を、抗m i R - 155化合物で受動的に処理した細胞および未処理細胞において、リアルタイムPCRによって測定した(図2)。

40

## 【0076】

(実施例3：SOD1マウスへの抗m i R - 155化合物の投与は、ミクログリアにおいてm i R - 155標的遺伝子の発現を上方調節する)

6つの抗m i R - 155化合物(配列番号27、21、22、23、25、26および3)を、SOD1マウス(処置1つ当たりn = 6 ~ 8匹のマウス)中に、単回の脳室内(

50

i . c . v . ) 注射を介して 2 mg / kg の用量で投与した。注射の 5 日後、ミクログリアを細胞選別によって単離し、mRNA を、 Nanostring コードセットによる遺伝子発現のために回収した。予測または検証された miR - 155 のシードマッチした標的の遺伝子発現プロファイルのヒートマップを図 3 に示す。ヒートマップは、各抗 miR - 155 化合物に応答した各遺伝子についての食塩水に対する log 10 倍の変化を示している（所与の処置群中の全ての動物についての平均）。この遺伝子シグネチャーの選択のために統計的カット (statistical cut) は使用しなかった。配列番号 23 を有する抗 miR - 155 化合物および配列番号 3 を有する抗 miR - 155 化合物は、最大数の直接的 miR - 155 標的の抑制解除を示した。

#### 【 0077 】

Nanostring 遺伝子発現コードセットをさらに分析し、2 の抗 miR - 155 化合物によって 4 のマウスにおいて上方調節された直接的標的遺伝子のセットを、抗 miR 活性についての遺伝子発現シグネチャーを示すために選択した。図 4 は、各抗 miR - 155 化合物についての、この遺伝子発現シグネチャーについての変化倍数結果を示す。マン - ホイットニーノンパラメトリック検定によって、配列番号 23 を有する抗 miR 化合物および配列番号 3 を有する抗 miR 化合物は、このセットの標的の有意な上方調節を示した。

#### 【 0078 】

Nanostring 遺伝子発現コードセットを、 SOD1 マウスでは下方調節されるが miR - 155 ノックアウトマウスではその発現がある程度まで回復されるミクログリア恒常性遺伝子についてアノテートした。食塩水に対する、このセット中の各遺伝子についての平均変化倍数を、各抗 miR - 155 化合物について計算し、 log 10 変化倍数を使用してヒートマップを生成した（図 5）。配列番号 23 を有する抗 miR - 155 化合物および配列番号 3 を有する抗 miR - 155 化合物は、この遺伝子セットにおいて、最大数の遺伝子の発現を回復した。配列番号 25 を有する抗 miR - 155 化合物もまた、これらの遺伝子標的の抑制解除に向かう傾向を示した。

#### 【 0079 】

上記ミクログリア恒常性遺伝子セットから、2 の抗 miR - 155 化合物によって 4 のマウスにおいて上方調節された直接的標的遺伝子のセットを、抗 miR 活性についての遺伝子発現シグネチャーを示すために選択した。図 6 は、各抗 miR - 155 化合物についての、この遺伝子発現シグネチャーについての変化倍数結果を示す。マン - ホイットニーノンパラメトリック検定によって、配列番号 23 を有する抗 miR 化合物および配列番号 3 を有する抗 miR 化合物は、このセットの恒常性遺伝子標的の有意な上方調節を示した。配列番号 25 を有する抗 miR - 155 化合物もまた、この遺伝子発現シグネチャーの抑制解除に向かう傾向を示した。

10

20

30

【図1】

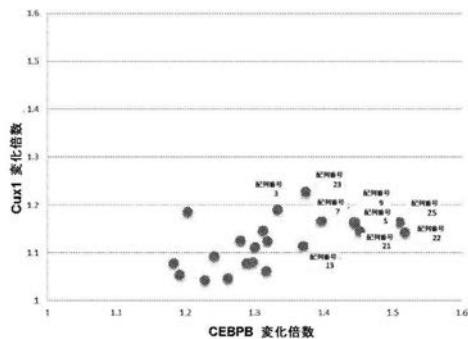


FIG. 1

【 図 2 】

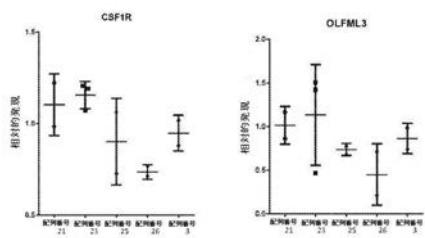


FIG. 2A

FIG. 2B

【 図 3 】

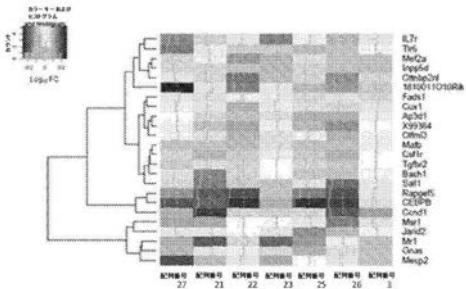


FIG. 3

【 図 4 】

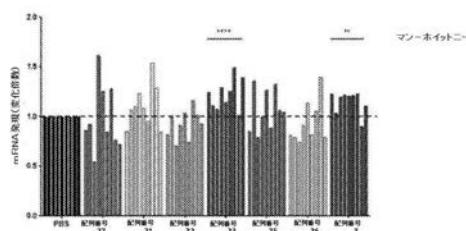


FIG. 4

【 図 5 】

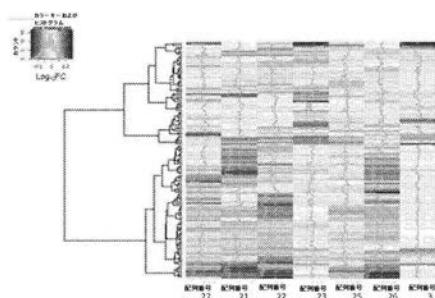


FIG. 5

( 6 )

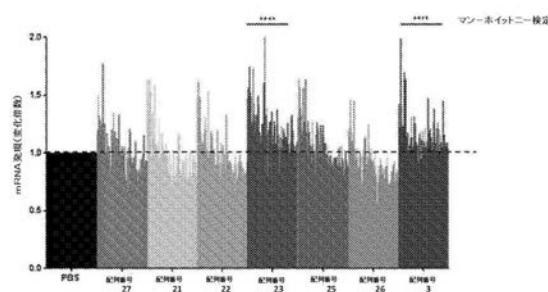


FIG. 6

【配列表】

2018517704000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/35794
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 15/113, A61K 31/7125, A61K 31/712, A61P 25/28 (2016.01) CPC - C12N 15/113, C12N 2310/113, C12N 2310/3231 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 15/113, A61K 31/7125, A61K 31/712, A61P 25/28 (2016.01) CPC: C12N 15/113, C12N 2310/113, C12N 2310/3231		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: A61K31/7115, A61K31/712		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: neurological disease, treatment select subject, oligonucleotide inhibitor, miR-155, LNA locked nucleic acid, phosphorothioate backbone, amyotrophic lateral sclerosis, ALS, inflammatory cells, neuro-inflammation, IL7r, Tlr6, Mef2a, Inpp5d, Cttrbp2nl, Fadsl, Cuxl, Ap3d1, X99384, Olfm1		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0283114 A1 (COHEN et al.) 8 November 2012 (08.11.2012) para [0020], [0021], [0028], [0093], Tables 2, 3	31
Y	WO 2013/134403 A1 (THE WASHINGTON UNIVERSITY) 12 September 2013 (12.09.2013) para [0005], [0027], [0070], [0171], [0180], [0201]	1-5, 7, 15-18
Y	US 2011/0077288 A1 (KAUPPINEN et al.) 31 March 2011 (31.03.2011) para [0020], [0022], [0039], [0062], [0063], [0064], Table 3, SEQ ID NOs: 164-165, 195-196	1-5, 7, 15-18
A	Koval et al. Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice. Hum Mol Genet. (15 October 2013) vol 22 no 20, pp 4127-4135. entire document	1-5, 7, 15-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  22 August 2016	Date of mailing of the international search report  13 SEP 2016	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/35794
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>. 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>. 1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>. 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/35794						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:								
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:							
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:							
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6, 8-14, 19-30 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).							
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:								
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.							
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.							
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:							
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:							
<b>Remark on Protest</b> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A Z
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806	Z
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 ジャクソン, エイミー

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, ルックアウト ロード 6200,  
ミラゲン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ダルビー, クリストイーナ

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, ルックアウト ロード 6200,  
ミラゲン セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 ウェイナー, ハワード エル.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02445, ブルックライン, コルボーン クレセント  
72

(72) 発明者 ブトフスキー, オレグ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02494, ニーダム, セントラル アベニュー 46  
7

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QS25

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA15 ZB11 ZC41