

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-41067

(P2016-41067A)

(43) 公開日 平成28年3月31日(2016.3.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 31/712 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/712	4 C O 8 6
<b>A 6 1 K 31/7125 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7125	
<b>A 6 1 K 31/713 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/713	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-195988 (P2015-195988)	(71) 出願人	511049370
(22) 出願日	平成27年10月1日 (2015. 10. 1)		エクスカリアード・ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2012-287043 (P2012-287043) の分割		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 100 17、ニューヨーク、イースト・フォーティセカンド・ストリート 235
原出願日	平成21年8月25日 (2009. 8. 25)		
(31) 優先権主張番号	61/190, 121	(71) 出願人	593073230
(32) 優先日	平成20年8月25日 (2008. 8. 25)		アイシス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		I s i s P h a r m a c e u t i c a l s, I n c.
			アメリカ合衆国92010カリフォルニア州カールスバッド、ガゼル・コート285 5番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結合組織成長因子を対象とするアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 過剰増殖症、及び線維症の治療、並びに創傷治癒に起因する瘢痕の減少に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に結合組織成長因子の機能を効果的に抑制する修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの提供。

【解決手段】 連結した12～30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が、既知のヌクレオシド配列 (GenBank登録番号NM\_001901.2) における、特定の配列から選択される領域内に存在する化合物。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

連結した 12 ~ 30 のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも 12 の核酸塩基からなる配列部分が、配列番号 9 のヌクレオチド 718 ~ 751、1388 ~ 1423、1457 ~ 1689、2040 ~ 2069、2120 ~ 2147、2728 ~ 2797、2267 ~ 2301、553 ~ 611、1394 ~ 1423、1469 ~ 1508、1559 ~ 1605、1659 ~ 1689、2100 ~ 2129 および 1399 ~ 1423 から選択される領域内に存在する化合物。

**【請求項 2】**

連結した 12 ~ 30 のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、その少なくとも 12 の核酸塩基からなる配列部分が、配列番号 28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125 および 166 に示す核酸塩基配列内に存在する、化合物。

10

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが連結した 20 のヌクレオシドからなる化合物。

**【請求項 4】**

連結した少なくとも 12 のヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドを含み、その核酸塩基配列が、配列番号 28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125 および 166 に示す核酸塩基配列内に存在する化合物。

20

**【請求項 5】**

請求項 4 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが、連結した少なくとも 14 のヌクレオシドを含む化合物。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが 1 本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが 2 本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドがその全体に亘って、配列番号 28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125 および 166 に示す配列のうちの 1 つの一部分と 100% 同一である配列を有する化合物。

30

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む化合物。

**【請求項 10】**

請求項 9 に記載の化合物であって、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がホスホチオエートヌクレオシド間結合である化合物。

40

**【請求項 11】**

請求項 10 に記載の化合物であって、当該ヌクレオシド間結合の全てがホスホチオエートヌクレオシド間結合である化合物。

**【請求項 12】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾された糖を含む化合物。

**【請求項 13】**

請求項 12 に記載の化合物であって、当該修飾された糖が二環式の糖である化合物。

**【請求項 14】**

請求項 12 に記載の化合物であって、当該修飾された糖のうちの少なくとも 1 つが 2'

50

- O - メトキシエチルを含む化合物。

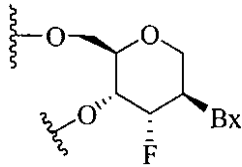
【請求項 15】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、テトラヒドロピラン環がフラノース環を置換した、少なくとも 1 つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドを含む化合物。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の化合物であって、当該少なくとも 1 つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドの各々が以下の構造を有する化合物：

【化 1】



10

式中、B x は、任意に保護されるヘテロ環塩基部分である。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾された核酸塩基を含む化合物。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の化合物であって、当該修飾された核酸塩基が 5' - メチルシトシンである化合物。

20

【請求項 19】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが：

( a ) 連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント ( gap segment ) と

；

( b ) 連結した修飾ヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント ( wing segment ) と

；

( c ) 連結した修飾ヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントと；を含み、当該ギャップセグメントが当該 5' ウィングセグメントと当該 3' ウィングセグメントとの間に位置し、各々のウィングセグメント内の各々の修飾ヌクレオチドが修飾された糖を含む化合物。

30

【請求項 20】

請求項 19 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが：

( a ) 連結した 13 のデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；

( b ) 連結した 2 つの修飾ヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメントと；

( c ) 連結した 5 つの修飾ヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントと；を含み、当該ギャップセグメントが当該 5' ウィングセグメントと当該 3' ウィングセグメントとの間に位置し、各々のウィングセグメント内の各々の修飾ヌクレオシドが、2' - O - メトキシエチル糖を含み、各々のヌクレオシド間結合がホスホチオエート結合である化合物。

40

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが連結した 20 のヌクレオシドからなる化合物。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号 39 に示す配列である化合物。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号

50

40に示す配列である化合物。

【請求項24】

請求項1～21のいずれか1項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号45に示す配列である化合物。

【請求項25】

請求項1～21のいずれか1項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号52に示す配列である化合物。

【請求項26】

請求項1～21のいずれか1項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号166に示す配列である化合物。

【請求項27】

核酸塩基配列が、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166のうちの1つに示す配列である連結したヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドまたはその塩と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む組成物。

【請求項28】

請求項1～21のいずれか1項に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が、配列番号9のヌクレオチドの範囲内（例えば、1388～1423、A-B、C-DおよびE-F）で、前もって設計したオリゴヌクレオチドがその範囲に入らない限りにおいて、100%相補的である化合物。

【請求項29】

請求項28に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが1本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

【請求項30】

請求項28に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが2本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

【請求項31】

請求項28～30のいずれか1項に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが、連結した20のヌクレオシドからなる化合物。

【請求項32】

結合組織成長因子の発現が阻害されるような条件下で、細胞または組織を請求項1～31のいずれか1項に記載の化合物と接触させることを含む、細胞または組織内で結合組織成長因子の発現を阻害する方法。

【請求項33】

結合組織成長因子の発現を阻害し、それによって動物を治療するのに効果的な量の請求項1～31の何れか1項に記載の化合物を、当該動物に投与することを含む、結合組織成長因子の発現に関連した疾患または症状を有する動物を治療する方法。

【請求項34】

請求項33に記載の方法であって、当該疾患が過剰増殖促進性疾患である方法。

【請求項35】

請求項34に記載の方法であって、当該過剰増殖促進性疾患が癌である方法。

【請求項36】

請求項33に記載の方法であって、当該疾患または症状が線維症である方法。

【請求項37】

請求項36に記載の方法であって、当該線維症が肥厚性癭痕、ケロイド、皮膚癭痕、肝線維症、肺線維症、腎線維症、心臓線維症または再狭窄である方法。

【請求項38】

請求項33に記載の方法であって、当該疾患または障害が、関節線維症（凍結肩症候群（frozen shoulder syndrome）、腱および末梢神経損傷を含む）、脊髄損傷、冠状動脈バイパス、腹部および腹膜癒着（子宮内膜症、子宮平滑筋腫および子宮筋腫を含む）、放射

10

20

30

40

50

状角膜切除術、レーザー屈折矯正角膜切除術、網膜復位術、装置介在線維症（たとえば糖尿病における）、腱癒着、デュピユイトラン拘縮または硬皮症である方法。

【請求項 39】

患者において結合組織成長因子の発現を阻害し、それによって当該患者における創傷治癒から生じる瘢痕を減少させるのに効果的な量の請求項 1 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の化合物を当該患者に投与することを含む、それを必要とする患者において創傷治癒に起因する瘢痕を減少させる方法。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法であって、創傷治癒が、皮膚切断、外科的切開および火傷からなる群より選択される創傷における治癒である方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書を通じて、特定の特許および刊行物が引用され、後者は筆者、学術誌により引用される。これらの特許および刊行物の開示全体が、引用により本明細書に組み込まれ、より完全に本発明の関連分野の技術水準を記載する。

【0002】

本発明は、過剰増殖症 (hyperproliferic disorder) および線維症の治療および創傷治癒に起因する瘢痕の減少に有用な新規アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) に関する。

20

【背景技術】

【0003】

アンチセンス技術は、特定の遺伝子産物の発現を減少させるための効果的な手法として登場しており、従って結合組織成長因子 (CTGF) の発現調節のための多くの治療的、診断的および研究的応用に非常に有用であることが証明される可能性がある (Gaardera の米国特許第 6,965,025 B2 号を参照のこと)。

【0004】

アンチセンス化合物は、標的核酸にハイブリダイズすることができるオリゴマー化合物 (例えば、標的 mRNA 分子) である。

【0005】

CTGF の発現を調節し、CTGF の発現に関連する疾患を治療するためのアンチセンス化合物、組成物および方法は、引用により本明細書に組み込まれる上述の米国特許第 6,965,025 B2 号に開示されている。しかしながら、増強した CTGF 発現および機能、ならびに他の有利な特性を提供することができる前記化合物の更なる必要性がある。

30

【0006】

一実施形態において、本発明は特に、CTGF 発現を抑制するための、修飾された好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。これらは、以前に開示された CTGF を標的とする ASO に比べて、有意に且つ予想外に有効であることが示された。

【0007】

結合組織成長因子 (CTGF; ctgrofact としても既知、線維芽誘導分泌タンパク質、*fisp-12*、NOV2、インスリン様成長因子結合タンパク質関連タンパク質 2、IGFBP-rP2、IGFBP-8、HBGF-0.8、Hcs24 および *ecogenin*) は、調節タンパク質の CCN (CTGF/CYR61/NOV) ファミリーのメンバーであり (これは同定された結合組織成長因子の第 1 のファミリーのメンバーに命名された)、システインリッチ (CYR61) であり、腎芽細胞腫を過剰産生するが (NOV)、ファミリーはタンパク質 ELM-1 (低転移性細胞において発現された)、WISP-3 (Wnt-1 誘発性分泌タンパク質) および COP-1 (WISP-2) をも含む。CCN タンパク質は、分泌された細胞外マトリックス会合タンパク質であることがわかっており、これは例えば、癒着、転移、有糸分裂誘発、分化、生存、血管形成、アテローム性

40

50

動脈硬化症、軟骨形成、創傷治癒、腫瘍形成、ならびに血管症および硬皮症のような線維症などである (Lau and Lam, *Exp. Cell Res.*, 1999, 248, 44-57)。結合組織成長因子タンパク質は、DNA合成を刺激し、線維芽細胞の走化性を促進することが示された (Bradham et al., *J. Cell Biol.*, 1991, 114, 1285-1294)。

#### 【0008】

多くの場合、膠芽腫細胞において3.5～7キロベースの転写物が報告されているが、発現の研究では単一の2.4キロベースのCTGF転写物が報告されている。結合組織成長因子は、通常の分化プロセスの間、線維芽細胞において発現し、これは細胞外マトリクス(ECM)の産生および再構築、例えば胚形成および着床後の子宮膜脱落などに関与する。結合組織成長因子はまた、線維性皮膚疾患、例えば全身性硬化症、局所的皮膚硬化症、ケロイド、癬痕細胞、好酸球性筋膜炎、結節性筋膜炎およびデュピュイトラン拘縮などにおいて頻繁に過剰発現する。結合組織成長因子のmRNAまたはタンパク質レベルは、主要な器官および組織の線維性障害において増加し、これは肝臓、腎臓、肺、循環系、膵臓、腸、眼および歯肉を含む。結合組織の有意な関与により特徴付けられる乳癌、膵臓癌および線維組織球癌において、間質区画で結合組織成長因子が過剰発現する。多くの場合、結合組織成長因子の発現は空間的且つ時間的に線維形成促進サイトカイン(profibrogenic cytokine)形質転換成長因子ベータ(TGF-ベータ)に関連する(Moussad and Brigstock, *Mol. Genet. Metab.*, 2000, 71, 276-292)。

10

#### 【0009】

結合組織成長因子を、c-myb遺伝子の近位にあるヒト染色体領域6p23.1に位置づけ、この領域に関与する染色体異常をヒト腫瘍、例えばWilms腫瘍などに関連付けた(Martinerie et al., *Oncogene*, 1992, 7, 2529-2534)。

20

#### 【0010】

有意な線維性および血管性成分を含む腫瘍は増加したCTGF発現を示し、CTGFが小児筋線維芽腫瘍の発症に関与することもある。試験された12の小児腫瘍のうちの全てが、関連する血管系の腫瘍細胞および/または内皮細胞において中程度～強度のCTGF発現を示した(Kasaragod et al., *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2001, 4, 37-45)。

#### 【0011】

結合組織成長因子mRNAは、急性リンパ性白血病(ALL)を有する小児の悪性ヒト白血病リンパ芽球において特異的に上方制御され(Vorwerk et al., *Br. J. Cancer*, 2000, 83, 756-760)、mRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方がHs578Tヒト乳癌細胞において用量依存的な様式でTGF-ベータにより上方制御され、このことはCTGFがTGF-ベータの重要な神経内分泌因子および重要な下流エフェクターであることを示す(Yang et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, 83, 2593-2596)。

30

#### 【0012】

マウスの肺線維形成モデルにおいて、結合組織成長因子のmRNA発現の増加が、既知の肺線維形成作用因子であるプレオマイシンによって誘発され(Lasky et al., *Am. J. Physiol.*, 1998, 275, L365-371)、これは健康的な非喫煙コントロール患者と比較した特発性肺線維症および肺サルコイドーシスを有する患者の気管支肺胞幼生細胞においても同様であり、このことは結合組織成長因子が、障害に対する線維増殖促進性の応答に関与することを示す(Allen et al., *Am. J. Respir. Cell Moll. Biol.*, 1999, 21, 693-700)。同様に、増殖促進性糸球体腎炎の実験モデルにおいては、結合組織成長因子mRNAの発現は、毛細血管外およびメサンギウム増殖促進性障害および糸球体周辺線維症の領域において大きく増加した。TGF-ベータタンパク質の著しい上方制御と一致する初期の糸球体結合組織成長因子の過剰発現および結合組織成長因子発現のキネティクスは、糸球体修復における役割を強く示唆し、これはこの一過性腎損傷のモデルにおいてTGF-ベータの下流のこともある(Ito et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2001, 12, 472-484)。

40

#### 【0013】

米国特許第5,876,730号において開示され且つ特許請求の範囲に記載されるのは実質的に、結合組織成長因子(CTGF)タンパク質のカルボキシ末端アミノ酸に対応

50

するアミノ酸配列を有することが特徴付けられる純粋または単離されたポリペプチド（当該ポリペプチドは結合組織成長因子のN末端から247または248のアミノ酸残基を起点とするアミノ酸配列を有する）、結合組織成長因子ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列、前記ポリヌクレオチドを含む変異発現ベクター、前記発現ベクターを含む宿主細胞、および薬学的に許容される担体中に治療に効果的な量の結合組織成長因子ポリペプチドを含む医薬組成物である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは一般的に開示されている（Brigstock and Harding, 1999）。

【0014】

米国特許5,783,187号、同第5,585,270号、同第6,232,064号、同第6,150,101号、同第6,069,006号およびPCT公報WO 00/35936に開示され且つ特許請求の範囲に記載されるのは、結合組織成長因子ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、発現ベクター、前記ベクターにより安定に形質転換または形質移入される宿主細胞；結合組織成長因子の上流から単離された5'非翻訳調節ヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド（ここで前記非翻訳調節ヌクレオチド配列は転写および翻訳開始領域を含み、前記配列はTGF-ベータ応答性の要素である）；結合組織成長因子（CTGF）遺伝子上流から単離された非コード調節配列を含む単離核酸構築物（ここで非コード調節配列は、対象のタンパク質を発現する核酸配列またはアンチセンスRNAに実施可能に結合しており、前記核酸配列は前記非コード配列に非相同的である）；およびECM合成、コラーゲン合成および/または筋線維芽細胞分化を誘発する能力を有し、前記ポリペプチドの少なくともエキソン2またはエキソン3によりコードされるアミノ酸配列を含む結合組織成長因子（CTGF）ペプチドの断片である。さらに特許請求の範囲に記載されるのは、TGF-ベータ誘発性の結合組織成長因子の発現に影響を与える組成物を特定する方法、線維症およびアテローム性動脈硬化症からなる群より選択される病状を有することが疑われる病理状態を診断する方法、結合組織成長因子を含むことが疑われる試料を得て、それにより患者中の結合組織成長因子に関連した細胞増殖性疾患により特徴付けられる病状の診断薬である正常標準試料中の結合組織成長因子のレベルと比較して患者からの試料中の結合組織成長因子のレベルの差を検出する方法である。さらに特許請求の範囲に記載されるのは、結合組織成長因子に関連する細胞増殖性疾患を改善する方法であって、前記疾患を有する患者の疾患部位に治療に効果的な量の抗体またはその断片を含む組成物を投与することを含む方法である（ここで、前記抗体またはその断片はPDGFには結合しない）。アンチセンスオリゴヌクレオチドは一般的に開示されている（Grotendorst, 2000; Grotendorst and Bradham, 2001; Grotendorst and Bradham, 2000; Grotendorst and Bradham, 1996; Grotendorst and Bradham, 1998; Grotendorst and Bradham, 2000)。

【0015】

PCT公報WO 00/27868に開示され且つ特許請求の範囲に記載されているのは実質的に、純粋な結合組織成長因子ポリペプチドまたはその機能的断片、前記ポリペプチドをコードする単離ポリペプチド配列、TがUであってもよい前記ポリペプチド配列、前記ポリヌクレオチド配列に相補的な核酸配列、および少なくとも15塩基長であり、緩徐ないし非常にストリンジェントな条件下で結合組織成長因子のアミノ酸配列をコードするDNAにハイブリダイズするであろう前記配列の断片である。さらに特許請求の範囲に記載されるのは、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、前記ベクターによって安定に形質転換される宿主細胞、前記ポリペプチドに結合する抗体、および前記ポリペプチドを産生する方法である。さらに特許請求の範囲に記載されるのは、結合組織成長因子の細胞内での発現を阻害する方法であって、細胞中で標的核酸に結合するポリヌクレオチドと細胞とを接触させることを含む方法（ここで、当該ポリヌクレオチドは細胞中で結合組織成長因子の発現を阻害し、当該ポリヌクレオチドはアンチセンスポリヌクレオチドである）、および結合組織成長因子の発現を検出するためのキットであり、1以上の容器を受け入れるように仕切られた運搬手段（carrier means）を含み、結合組織成長因子に結合する少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む少なくとも1つの容器を含むキットである

(Schmidt et al., 2000)。

【0016】

PCT公報WO 00/13706に開示され且つ特許請求の範囲に記載されるのは、線維症を治療または予防する方法、結合組織成長因子の発現または活性を調整、調節もしくは阻害する効果的な量の薬剤またはその断片を必要な患者に投与することを含む方法(ここで当該薬剤は抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子である)である。当該方法は、腎臓線維症および関連する腎臓疾患、特に糖尿病および高血圧に関連する合併症を治療することを対象とする(Riser and Denichili, 2000)。

【0017】

PCT公報WO 01/29217に開示され且つ特許請求の範囲に記載されるのは、NOV1、NOV2(結合組織成長因子)およびNOV3を含む群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単利核酸分子、前記群から選択されるアミノ酸配列の成熟形態または変異体、ならびに前記群および前記ポリペプチドの成熟形態および変異形態または断片より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸分子である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは一般に開示されている(Prayaga et al., 2001)。

10

【0018】

肥厚性瘢痕形成は特に、重篤な火傷の回復において主要な臨床的問題であり、永久的な機能喪失および外観を損なう斑点(stigma)を生じる過増殖性瘢痕を生じ得る。年間100万人を超える人々が、米国で火傷の治療を必要としている。火傷後の過増殖性瘢痕の発生は、一般的な結果であり、非常に大きな問題を生じる。したがって、CTGFのインヒビター、例えばアンセンスオリゴヌクレオチド(ASO)などは、火傷に続く過増殖性の瘢痕の重症度を予防するのに非常に効果的でなければならない。この活性は、配合されたASOを局所的に適用し、火傷の発生に続く発達した瘢痕の重症度をモニターすることにより評価し得る。

20

【0019】

CTGFは、いくつかの理由によって肥厚性瘢痕を調節するための興味深い標的であるかもしれない。TGF-1またはTGF-2の補因子および下流メディエータとしてCTGFは、瘢痕を目標とする遺伝子を対象とした分子治療(gene-directed molecular therapy)のため、TGF-1またはTFG-2よりも特異的な標的を意味してよい。これは、特にTGF-1またはTGF-2が瘢痕形成に関係のない多能性効果を有するためである。加えてCTGFは、線維形成表現型の維持においてTGF-1またはTGF-2の独立した機能を有してもよく、これは抗TGF-1またはTGF-2法により無視されるろう。多器官系および慢性皮膚疾患、例えば硬皮症におけるCTGFの瘢痕増大における役割の理解の発展にも関わらず、急性瘢痕および創傷治癒におけるCTGFの役割は、主に依然として観察に基づく。

30

【0020】

目下、効果的に結合組織成長因子を阻害する既知の治療薬はなく、これまでに結合組織成長因子の機能を調節することを目的とした調査手法は、酪酸ナトリウム(NaB)、機能阻害抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を伴っていた。

40

【0021】

食事的要因が、胸部癌腫を含むヒト癌の発生および予防の双方に重要な役割を果たすと考えられている。食物栄養素NaBは、食物デンプンや食物繊維の消化の主要な最終産物であり、インピトロで多くの細胞タイプの細胞分化を開始する効能のある成長インヒビターである。NaBは部分的には乳房上皮細胞におけるヒストン脱アセチル化インヒビターとして生物学的効果を奏し、Hs578Tエストロゲン非応答性のヒト乳癌細胞においてアポトーシス細胞死を誘発し、細胞タイプに応じた細胞周期停止に關与する活性のある異なる遺伝子を活性化し得る。NaBは特異的に、用量依存的な様式で結合組織成長因子の発現を上方調節し、癌性および非癌性乳腺細胞の両方においてmRNAおよびタンパク質レベルの双方の増加を刺激する(Tsubaki et al., J. Endocrinol., 2001, 169, 97-110)

50



)。

【 0 0 2 2 】

TGF-βは軟寒天中で、正常線維芽細胞の成長を刺激する独自の能力を有し、これは形質転換細胞の特性である。結合組織成長因子は、これらの付着非依存性の成長正常ラット腎臓(NRK)線維芽細胞を誘発することができないが、結合組織成長因子の合成および作用はTGF-β誘発性の付着非依存性に不可欠である。結合組織成長因子に対する抗体は特異的にTGF-β誘発性の付着非依存性成長を阻止し、アンチセンス方向における結合組織成長因子遺伝子を発現する構築物により形質転換されたNRKフィブロブラストは、付着非依存性成長アッセイにおいてTGF-βに非応答性であった(Kothapalli et al., Cell Growth. Differ., 1997, 8, 61-68)。これらのCTGFアンチセンス発現NRK細胞はまた、TGF-β誘導性のコラーゲン合成が結合組織成長因子により仲介されることを示し、このことは結合組織成長因子が抗線維性治療の有用なターゲットであり得ることを示す(Duncan et al., Faseb J., 1999, 13, 1774-1786)。

10

【 0 0 2 3 】

ヒト結合組織成長因子cDNAの3'-不飽和領域(UTR)は、調節要素のためのいくつかの共通配列を有する。3'-UTRがレセプター遺伝子の下流に融合した場合、強力なシス作用抑制要素として作用することが見出され、アンチセンス3'-UTRは同様の、より強力な効果を有する(Kubota et al., FEBS Lett., 1999, 450, 84-88)。ヒトとマウスとの結合組織成長因子3'-UTRの比較から、91塩基の保存された小さなセグメントが明らかとなった。この領域はNIH3T3マウス線維芽細胞からRT-PCRにより増幅され、抑制効果の分析のためのキメラ融合構築物を作製するのに用いられた。センスまたはアンチセンス方向のいずれかにおけるマウスの結合組織成長因子3'-UTRは、レポーター遺伝子の転写に強い抑制効果を有しており、このことは、この調節要素の方向非依存性を示す(Kondo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 278, 119-124)。

20

【 0 0 2 4 】

ホスホロチオ酸アンチセンスオリゴヌクレオチド、これは16ヌクレオチド長であり、翻訳開始点を標的とするが、結合組織成長因子の発現を阻害し、ウシ大動脈内皮細胞の増殖および移動を抑制するために用いられた(Shimo et al., J. Biochem. (Tokyo), 1998, 124, 130-140)。このアンチセンスオリゴヌクレオチドが用いられ、結合組織成長因子がMCF-7ヒト乳癌細胞においてアポトーシスを誘発すること、TGF-β誘発性のアポトーシスは部分的には結合組織成長因子により仲介されることが示された(Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 1999, 274, 37461-37466)。同じアンチセンスオリゴヌクレオチドは、TGF-βが仲介するカスパーゼ3の活性化を阻害し、故にTGF-βが仲介するヒト大動脈平滑筋細胞(HASC)におけるアポトーシスの誘発を阻害することもわかった(Hishikawa et al., Eur. J. Pharmacol., 1999, 385, 287-290)。このアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、結合組織成長因子の発現を阻止し、高血圧が結合組織成長因子の発現をメサンギウム細胞において上方調節することを示し、これは次にECMタンパク質産生を増強し、アポトーシスを誘発し、メサンギウムのリモデリングおよび最終的には糸球体硬化に寄与する(Hishikawa et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 16797-16803)。

30

40

【 0 0 2 5 】

結果として、結合組織成長因子の機能を効果的に阻害することのできる更なる因子が長期間に亘り切実に必要とされている。

【 発明の概要 】

【 0 0 2 6 】

本発明は、12~30の連結したヌクレオシド、好ましくは20または少なくとも12の連結したヌクレオシド、より好ましくは少なくとも14の連結したヌクレオシドを含む修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、これは結合組織因子の発現を阻害

50

することができる。本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および他の組成物もまた提供される。

【0027】

さらに提供されるのは、CTGFの発現を阻害するのに効果的な量の前記化合物を投与することにより、CTGFに関連する疾患または症状を有する動物、特にヒトの治療方法であって、疾患または症状は、過剰増殖症、例えば癌および線維症などである。さらに提供されるのは、CTGFの発現を阻害するのに効果的な量の前記化合物を投与することによって創傷治癒に由来する瘢痕を減少させる方法である。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、CTGFゲノム配列上の標的セグメントまたは領域、主にエキソン標的セグメントを示し、これに対してCTGFへのアンチセンスオリゴヌクレオチドが作成された。

【図2】図2は、CTGF mRNA配列上の標的セグメントまたは領域を示し、これに対してCTGFへのアンチセンスオリゴヌクレオチドが作成された。

【図3】図3は、CTGF発現阻害のためのCTGF mRNA配列上のエキソン配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドのグラフ表示を提供する。

【図4】図4は、CTGFゲノム配列上の標的セグメントまたは領域、主にイントロン標的セグメントを示し、CTGFへのアンチセンスオリゴヌクレオチドがこれに対して作成された。

【図5】図5は、CTGF mRNA配列上の標的セグメントまたは領域を示し、これに対してCTGFへのアンチセンスオリゴヌクレオチドが作成された。

【図6】図6は、CTGF発現を阻害するためのCTGF mRNA配列上のイントロン配列を主に標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドの試験結果のグラフ表示を提供する。

【図7A】図7は、CTGFに対して高活性のアンチセンスオリゴヌクレオチドを示し、米国特許第6,965,025 B2号に開示されるこれまでに設計された2つのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 124238およびISIS 124212)の活性とそれらの活性とを比較する。図7Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを標的とする8のエキソンを特定し、図7Bはアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい配列を提供する。

【図7B】図7は、CTGFに対して高活性のアンチセンスオリゴヌクレオチドを示し、米国特許第6,965,025 B2号に開示されるこれまでに設計された2つのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 124238およびISIS 124212)の活性とそれらの活性とを比較する。図7Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを標的とする8のエキソンを特定し、図7Bはアンチセンスオリゴヌクレオチドの好ましい配列を提供する。

【図8】図8は、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるCTGF発現を阻害するための9つの高活性のヒトCTGF新規リードアンチセンス配列について得られる用量応答のグラフ表示を提供する。配列141923はネガティブコントロールであり、配列124238および124212はこれまでに設計された2つの配列である。

【図9A】図9は、25mg/kgまたは50mg/kgアンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 412294(配列番号39)、ISIS 412295(配列番号40)またはISIS 418899(配列番号166)による治療の4週間後のマウスにおける血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)(図9A)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)(図9B)レベルのグラフ表示を提供する。結果は、25mg/kgまたは50mg/kgのISIS 412294(配列番号39)もしくはISIS 412295(配列番号40)を投与した、または25mg/kgのISIS 418899(配列番号166)を投与したマウスにおける血漿ALTおよびASTレベルは、生理食塩水(ビヒクル)コントロール群におけるレベルと同じであるが、50mg

10

20

30

40

50

/kgのISIS418899(配列番号166)を投与されたマウスは、コントロール群において観察される値を超える有意な血漿ALTおよびASTレベルの増加を示すことを示す。

【図9B】図9は、25mg/kgまたは50mg/kgアンチセンスオリゴヌクレオチドISIS412294(配列番号39)、ISIS412295(配列番号40)またはISIS418899(配列番号166)による治療の4週間後のマウスにおける血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)(図9A)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)(図9B)レベルのグラフ表示を提供する。結果は、25mg/kgまたは50mg/kgのISIS412294(配列番号39)もしくはISIS412295(配列番号40)を投与した、または25mg/kgのISIS418899(配列番号166)を投与したマウスにおける血漿ALTおよびASTレベルは、生理食塩水(ビヒクル)コントロール群におけるレベルと同じであるが、50mg/kgのISIS418899(配列番号166)を投与されたマウスは、コントロール群において観察される値を超える有意な血漿ALTおよびASTレベルの増加を示すことを示す。

【図10】図10は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる投与の4週間後の結果のグラフ表示を提供し、これは50mg/kgの412295により治療された群の体重増加がコントロール群における体重増加よりも有意に低かったことを示す。

【図11】図11は、3.0、1.0、0.3または0.1mgのCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドによるラットにおける皮膚創傷の皮内治療は、全ての用量についてCTGFおよびCOL1A2 mRNA発現の両方において統計的に有意な減少をもたらしたことを示す。これらの結果は明らかに、2' MOE修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによるCTGF発現の阻害が皮膚におけるコラーゲン堆積を減少させることを示した。

【図12】図12は、50mg/mL(総用量5mg)の皮内投薬後少なくとも14日目にまでウサギにおいて存在するCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドの有意なレベルを示すグラフ表示を提供する。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0029】

一実施形態において、本発明は、連結した12~30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が配列番号9のヌクレオチド718-751、1388-1423、1457-1689、2040-2069、2120-2147、2728-2797、2267-2301、553-611、1394-1423、1469-1508、1559-1605、1659-1689、2100-2129および1399-1423から選択される領域内に存在する化合物を提供する。

##### 【0030】

別の実施形態において、本発明は連結した12~30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が配列番号10のヌクレオチド2540-2559、2568-2587、2623-2647および2623-2642から選択される領域内に存在する化合物を提供する。

##### 【0031】

一実施形態において、本発明は連結した12~30のヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す核酸塩基配列内に存在する化合物を提供する。

##### 【0032】

本発明の好ましい実施形態において、連結した20または少なくとも12のヌクレオシド、より好ましくは連結した少なくとも14のヌクレオシドを含む化合物であって、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す核酸塩基配列内に存在する。

## 【0033】

これらの配列の選択は、図1～7に示すスクリーニング結果およびヒト臍静脈内皮細胞（HuVEC）における用量応答研究の結果（図8）により決定した。実験およびデータの詳細は以下の実施例セクションの例8に提供される。

## 【0034】

図1～6に示す標的配列は、イントロンおよびエキソン標的配列を含む。標的領域は核酸の構造が定義された領域である。例えば、標的領域は3'UTR、5'UTR、エキソン、イントロン、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の定義された核酸領域を包んでもよい。ターゲティングは、所望の効果が生じるようにアンチセンスオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。この実施形態において、所望の効果はmRNA標的核酸レベルの減少である。

10

## 【0035】

これまでに設計された配列、例えば配列番号15（Isis 124238）よりも高い明らかな活性を有する多数の配列は、エキソンおよびイントロン領域の双方において特定された。多くの新規イントロン（配列番号125）およびエキソン（配列番号28、30、40、45、52、50および78）のオリゴヌクレオチドは、他の配列に比べて有意に活性が高いようである。配列番号39および40は、活性に関して、オリジナルのASOスクリーンにおけるCTGF発現の非常に効果的なインヒビターであることが示された（データは本明細書中に示される）。CTGF mRNA上のこの領域がASOにより標的とされる「ホットスポット（hot spot）」を示すか否かについて調べるために、更なるASO配列（配列番号166）が指定され、これは配列番号39および40により標的とされるもののすぐ上流の配列にハイブリダイズされるように設計されている。このASO（配列番号166）も、CTGF mRNA発現の非常に効力のあるインヒビターであることが見出され、これはCTGF mRNAのこのセクションがASOインヒビターにより標的とされる興味深い領域であることを示す。

20

## 【0036】

ある実施形態において、アンチセンス化合物は活性のあるオリゴヌクレオチドにより標的とされるCTGFの領域の一部に相補的であり、これは標的部位1396～1424まで広がる。これは、Isis 418899、412295および412294（それぞれ配列番号166、40および39）により標的とされる配列スペースである。

30

## 【0037】

本発明はまた、少なくとも12、好ましくは少なくとも連結した14のヌクレオチドを含む修飾オリゴヌクレオチドを含み、その核酸塩基配列が配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す核酸塩基配列のうちの一つの一部である化合物を提供する。

## 【0038】

ここにおいて記載されるアンチセンス化合物は、連結した12～30、12～20および好ましくは14～20のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを含み得る。

## 【0039】

本発明の一実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは一重鎖または二重鎖オリゴヌクレオチドである。

40

## 【0040】

本発明は、結合組織成長因子をコードする核酸分子の機能調節用、究極的には結合組織成長因子の産生量調節用のオリゴマー化合物、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる。これは、結合組織成長因子をコードする1以上の核酸に特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物を提供することにより達成される。ここで用いられる場合、「標的核酸」および「結合組織成長因子をコードする核酸」の語は、結合組織成長因子をコードするDNA、前記DNAから転写されるRNA（mRNA前駆体およびmRNA）、さらに前記RNA由来のcDNAを含む。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的なハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能を干渉する。特異的にハイブリダイズする化合

50

物によるこの標的核酸機能の調節は、一般的に「アンチセンス」と称される。干渉されるDNAの機能には、複製および転写が含まれる。干渉されるRNAの機能には、全ての生体機能、例えばタンパク質翻訳部位へのRNAの転座、RNAからのタンパク質翻訳、1以上のmRNA種を産生するRNAのスプライシング、およびRNAに結合するかまたはRNAにより促進され得る酵素活性が含まれる。前記標的核酸機能の干渉の全体的効果は、結合組織成長因子の発現調節である。本発明の文脈において「調節」は、遺伝子発現における増加（刺激）または減少（阻害）を意味する。本発明の文脈において阻害は、遺伝子発現の調節の好ましい形態であり、mRNAは好ましい標的である。

#### 【0041】

標的核酸、標的領域およびヌクレオチド配列

10

アンチセンスのための特異的な核酸を標的とすることが好ましい。特定の核酸に対するアンチセンスの「ターゲティング」は、本発明の文脈において、多段階のプロセスである。

#### 【0042】

ここに含まれる実施例における各々の配列番号に示す配列は、糖部分、ヌクレオシド間結合または核酸塩基へのいずれの修飾とも無関係であることが理解される。そのように配列番号により規定されるアンチセンス化合物は独立して、糖部分、ヌクレオシド間結合または核酸塩基への1以上の修飾を含んでよい。I s i s 番号 ( I s i s N o ) により記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列およびモチーフの組合せを示す。

#### 【0043】

20

一実施形態において、標的領域は核酸の構造が定義された領域である。例えば標的領域は、3'UTR、5'UTR、エキソン、イントロン、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域または他の定義された核酸領域を包んでよい。核酸の構造が定義された領域は、NCBIなどの配列データベースから受託番号により得られ、前記情報は引用によりここに組み込まれる。他の実施形態において標的領域は、標的領域内の1つの標的セグメントの5'標的部位から標的領域内の他の標的セグメントの3'標的部位までの配列を包含してよい。

#### 【0044】

ターゲティングは、所望の効果が起こるようにアンチセンス化合物がハイブリダイズする少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。ある実施形態において、所望の効果はmRNA標的核酸レベルにおける減少である。他の実施形態において、所望の効果は標的核酸によりコードされるタンパク質レベルの減少、または標的核酸に関連する表現型の変化である。

30

#### 【0045】

標的領域は1以上の標的セグメントを含んでよい。標的領域内の複数の標的セグメントが重複していてもよい。あるいは、それらは重複していなくてもよい。一実施形態において、標的領域内の標的セグメントはわずか約300ヌクレオチドによって隔てられている。他の実施形態において標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上のわずか約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20または10ヌクレオチドによって隔てられてよい。別の実施形態において標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上のわずか約5ヌクレオチドにより隔てられている。更なる実施形態において、標的セグメントは隣接している。

40

#### 【0046】

適切な標的セグメントは5'UTR、コード領域、3'UTR、イントロンまたはエキソン内に見出されてよい。開始コドンまたは終止コドンを含む標的セグメントもまた、適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、構造が定義された特定の領域、例えば開始コドンまたは終止コドンなどを特異的に除外してもよい。

#### 【0047】

適切な標的セグメントの決定は、ゲノム全体に亘って標的核酸の配列と他の配列とを比較することを含んでもよい。例えば、BLASTアルゴリズムが用いられ、異なる核酸間

50

での類似点を特定してもよい。この比較により、選択された標的核酸以外の配列（即ち、非標的または標的外の配列）に非特異的な様式でハイブリダイズしてもよいアンチセンス化合物の配列の選択が阻害されてよい。

【0048】

活性な標的領域内のアンチセンス化合物の活性には、（例えば、標的核酸レベルのパーセント分の減少により定義される通り）変化があってもよい。一実施形態において、CTGF mRNA レベルの減少はCTGF発現の阻害を示す。CTGFタンパク質のレベルの減少もまた、標的mRNA発現の阻害を示す。さらに、表現型の変化はCTGF発現の阻害を示す。例えば、CTGFの一定量の増加は、CTGF発現の阻害を示す。

【0049】

詳細には、ターゲティングプロセスは通常、機能が調節され得る核酸配列の同定から始まる。例えばこれは、発現が特定の障害および疾患状態に関連する細胞遺伝子（または遺伝子から転写されたmRNA）であってよい。本発明において、結合組織成長因子をコードする標的は核酸分子である。ターゲティングプロセスはまた、所望の効果、例えば、タンパク質の発現の検出または調節が生じるように起こるアンチセンス相互作用のためのこの遺伝子内の1つの部位または複数の部位の決定を含む。本発明の文脈の中で、好ましい遺伝子内部位は、遺伝子の読み取り枠（ORF）の翻訳開始または終止コドンを含む領域である。当該分野で既知の通り、翻訳開始コドンは典型的に5'-AUG（転写mRNA分子中で；対応するDNA分子内の5'-ATG）であるため、翻訳開始コドンもまた“AUGコドン”、“開始コドン”または“AUG開始コドン”と呼ばれる。遺伝子の少数は、RNA配列5'-GUG、5'-UUGまたは5'-CUGを有する翻訳開始コドンを有し、5'-AUA、5'-ACGおよび5'-CUGはインビボで機能することを示した。従って、「翻訳開始コドン」および「開始コドン」の語は、各々の場合、開始アミノ酸が典型的にメチオニン（真核生物において）またはホルミルメチオニン（原核生物において）であるにも関わらず、多くのコドン配列を包み得る。当該分野において、真核生物および原核生物の遺伝子は2以上の代替的なコドンを有しても良く、好ましくはこのうちのいずれか1つが特定の細胞タイプもしくは組織において、または特定のセットの条件下で翻訳開始のために利用されてよいことも既知である。本発明の文脈において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、前記コドンの配列に関わらず、インビボで用いられ、結合組織成長因子をコードする遺伝子から転写されたmRNA分子の翻訳を開始するコドンまたは複数のコドンをいう。

【0050】

当該分野において、遺伝子の翻訳終止コドン（または「終止コドン」）は3つの配列、即ち、5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA（対応するDNA配列は、それぞれ5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGA）のうちの1つを有してもよいことも既知である。「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」の語は、翻訳開始領域からいずれかの方向（即ち、5'または3'）において約25～約50の隣接するヌクレオチドを含むようなmRNAまたは遺伝子の一部をいう。同様に、「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」の語は、いずれかの方向（即ち、5'または3'）において隣接する約25～約50のヌクレオチドを含むようなmRNAまたは遺伝子の一部をいう。

【0051】

当該分野において翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域をいうことが既知である、読み取り枠（ORF）または「コドン領域」もまた、効果的に標的とされてよい領域である。他の標的領域は、翻訳開始コドンから5'方向におけるmRNAの一部をいい、故に5'キャップ部位とmRNAの翻訳開始コドンまたは遺伝子上の対応するヌクレオチドとの間のヌクレオチドを含むことが既知である5'非翻訳領域（5'UTR）と、翻訳終止コドンから3'方向におけるmRNAの一部をいい、故に翻訳終止コドンとmRNAの3'末端または遺伝子上の対応するヌクレオチドとの間のヌクレオチドを含むことが既知である3'非翻訳領域（3'UTR）とを含む。mRNAの5'キャップは、5'-5'トリフォスフェート結合によってmRNAの最も5'側の（5'-most）残基に結合する

10

20

30

40

50

N7メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自体、およびキャップに隣接する最初の50ヌクレオチドを含むと考えられる。5'キャップ領域もまた、好ましい標的領域であってもよい。

【0052】

いくつかの真核生物のmRNA転写物は直接的に翻訳されるが、多くは「イントロン」として既知の1以上の領域を含み、それが翻訳される前にこれは転写物から切除される。残った（それ故翻訳される）領域は「エキソン」として既知であり、共にスプライスされ、連続的なmRNA配列を形成する。mRNAスプライス部位、即ち、イントロン-エキソン接合部は好ましい標的領域であってよく、異常なスプライシングが疾患に関係している場合または特定のmRNAスプライス産物の過剰産生が疾患に関係している状況において特に有用である。再配列または欠失による異常な融合接合部もまた好ましい標的である。イントロンが効果的であり得ることも見出されたため、例えばDNAまたはmRNA前駆体を標的としたアンチセンス化合物が好ましい。

10

【0053】

当該分野において、代替のRNA転写物がDNAの同じゲノム領域から産生され得ることも既知である。これらの代替の転写物は一般に「変異体」として既知である。より詳細には「mRNA前駆体の変異体」は、同じゲノムDNAから産生される転写物であり、これは開始位置または終止位置のいずれかにおいて同じゲノムDNAから産生される他の転写物とは異なり、イントロンおよびエキソン領域の両方を含む。

【0054】

スプライシングの間の1以上のエキソンまたはイントロン領域もしくは部分の切除に際して、mRNA前駆体の変異体はより小さな「mRNA変異体」を産生する。結果としてmRNA変異体は、処理されたmRNA前駆体の変異体であり、特有のmRNA前駆体の変異体の各々はスプライシングの結果として常に特有のmRNAを産生しなければならない。これらのmRNAの変異体は「代替のスプライス変異体」としても既知である。mRNA前駆体の変異体のスプライシングが起こらない場合、mRNA前駆体の変異体はmRNA変異体と同一である。

20

【0055】

当該分野において、代替のシグナルの使用により変異体が産生され、転写を開始または終結させること、mRNA前駆体およびmRNAが1以上の開始コドンまたは終止コドンを処理し得ることも既知である。代替の開始コドンを用いるmRNA前駆体またはmRNAから生じる変異体は、mRNA前駆体またはmRNAの「代替の開始変異体」として既知である。代替の終止コドンを用いるそれらの転写物は、mRNA前駆体またはmRNAの「代替の終止変異体」として既知である。ある特定のタイプの代替の終止変異体は、産生した多数の転写物が転写機構による「ポリA終止シグナル」のうちの一つの代替の選択に由来する「ポリA変異体」であり、それによって特有のポリA部位で終結する転写物を産生する。

30

【0056】

アンチセンス化合物は一般に、研究試薬および診断（diagnostics）として用いられる。例えば、精巧な特異性により遺伝子発現を阻害することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドは一般に、当業者により用いられ、特定の遺伝子の機能を解明する。例えば、アンチセンス化合物もまた用いられ、生物学的経路の種々のメンバーの機能を特徴づける。従って、アンチセンス調節は研究的使用のために利用される。

40

【0057】

キットおよび診断の使用のため、本発明のアンチセンス化合物は、単独または他のアンチセンス化合物もしくは治療学（therapeutics）と組み合わせて、示唆および/または組合せの解析のツールとして用いることができ、細胞および組織内で発現する遺伝子の一部または全体的な捕捉物の発現パターンを解明する。

【0058】

1以上のアンチセンス化合物により治療される細胞または組織内の発現パターンを比較

50

し、アンチセンス化合物により治療されていない細胞または組織を制御し、例えばそれらが疾病関連性、試験される遺伝子のシグナル経路、細胞局在、発現レベル、サイズまたは機能に関係する場合、生じるパターンが遺伝子発現の微分レベルについて分析される。これらの分析が、刺激細胞または非刺激細胞について、および発現パターンに影響するほかの化合物の存在または非存在下で行われ得る。

#### 【0059】

当該分野における遺伝子発現分析の方法は、DNAアレイまたはマイクロアレイを含む (Brazma and Vilo, *FEDS Lett.*, 2000, 480, 17-24; Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16)、SAGE (serial analysis of gene expression) (Madden, et al., *Drug Discov. Today*, 2000, 5, 415-425)、READS (restriction enzyme amplification of digested cDNAs) (Prashar and Weissman, *Methods Enzymol.*, 1999, 303, 258-72)、TOGA (total gene expression analysis) (Sutcliffe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 1976-81)、タンパク質アレイおよびプロテオミクス (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Jungblut, et al., *Electrophoresis*, 1999, 20, 2100-10) 発現配列標識 (EST) シークエンシング (Celis, et al., *FEBS Lett.*, 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., *J. Biotechnol.*, 2000, 80, 143-57)、サブトラクティブRNAフィンガープリンティング (SURF) (Fuchs, et al., *Anal. Biochem.*, 2000, 286, 91-98; Larson, et al., *Cytometry*, 2000, 41, 203-208)、サブトラクティブクローニング、差次的発現 (DD) (Jurecic and Belmont, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 316-21)、比較ゲノムハイブリダイゼーション (Carulli, et al., *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1998, 31, 286-96)、FISH (蛍光in-situハイブリダイゼーション) 技術 (Going and Gusterson, *Eur. J. Cancer*, 1999, 35, 1895-904) および質量分析法 (To, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2000, 3, 235-41) に記載される) を含む。

10

20

#### 【0060】

##### アンチセンス化合物

本発明の文脈において、「オリゴヌクレオチド」の語は、リボ核酸 (RNA) もしくはデオキシリボ核酸 (DNA) のオリゴマーもしくはポリマー、またはその模倣物をいう。この語は、天然由来の核酸塩基、糖、ヌクレオシド (骨格) 間共有結合を有するオリゴヌクレオチド、および同様に機能する非天然由来部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。前記修飾または置換オリゴヌクレオチドは、所望の特性、例えば増強された細胞取り込み、核酸標的への増強された親和性およびヌクレアーゼ存在下での増加した安定性などのため、天然形態よりも一般に好ましい。

30

#### 【0061】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス化合物の好ましい形態であるが、本発明は他のオリゴマーアンチセンス化合物を含み、これはオリゴヌクレオチド模倣物を含むがこれらに限定されない。

#### 【0062】

アンチセンス化合物は、水素結合を介して標的核酸にハイブリダーゼーションすることのできるオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物は、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、RNAi、リボザイム、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド (オリゴザイム)、および標的核酸にハイブリダイズしてその発現を調節する他のオリゴヌクレオチドを含むがこれらに限定されない。

40

#### 【0063】

ある実施形態において、アンチセンス化合物は、5' から 3' 方向に記載される場合、標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。ある実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは 5' から 3' 方向に記載される場合、標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。

#### 【0064】

50



ある実施形態において、核酸を標的とするアンチセンス化合物は長さ12~30サブユニットである。言い換えれば、アンチセンス化合物は12~30の連結したサブユニットである。他の実施形態において、アンチセンス化合物は8~80、12~50、15~30、18~24、19~22、または20の連結したサブユニットである。ある実施形態において、アンチセンス化合物は長さ8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79または80の連結したサブユニット、または上記値のいずれか2つによって定義される範囲である。いくつかの実施形態において、アンチセンス化合物はアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、連結したサブユニットはヌクレオチドである。

10

**【0065】**

本発明の好ましい一実施形態において、化合物は20または少なくとも14の連結したヌクレオチドを含み、ここにおいて修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号28、30、39、40、45、52、56、78、125および166に示す配列のうちの1つと100%同一の配列を有する。別の好ましい実施形態において、重要なリード化合物は配列番号39 ( I S I S 4 1 2 2 9 4 ) に示す配列を有する。

**【0066】**

20

ある実施形態において、核酸を標的とする短縮または切り詰められたアンチセンス化合物は、5'末端(5'切り詰め)、または3'末端(3'切り詰め)から単一のサブユニットを欠失している。核酸を標的とする短縮または切り詰められたアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の5'末端から2つのサブユニットを欠失しているか、または3'末端から2つのサブユニットを欠失しているか、あるいは、欠失ヌクレオチドは例えば、5'末端から1のヌクレオチドを欠失し且つ3'末端から1のヌクレオチドを欠失しているアンチセンス化合物中に分散されてもよい。

**【0067】**

延長されたアンチセンス化合物中に単一の更なるサブユニットが存在する場合、更なるサブユニットはアンチセンス化合物の5'または3'末端に位置してもよい。2以上の更なるサブユニットが存在する場合、例えばアンチセンス化合物の5'末端(5'付加)または3'末端(3'付加)に追加された2つのサブユニットを有するアンチセンス化合物中において、互いに隣接しているか、あるいは追加されたサブユニットが例えば、5'末端に付加された1つのサブユニットおよび3'末端に付加された1つのサブユニットを有するアンチセンス化合物においてアンチセンス化合物全体に分散してもよい。

30

**【0068】**

アンチセンス化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さを増加または減少すること、および/または活性を除去することなく mismatches を導入することが可能である。例えば、Woolfら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)において13-25核酸塩基長の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、卵母細胞注入モデルにおいて標的RNAの開裂を誘発する能力について試験された。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端付近に8または11の mismatches を有する25核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 mismatches を含んでいなかったアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低い程度であっても、直接的に標的mRNAの特異的開裂を行うことができた。同様に、標的的特異的な開裂は、13の核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて達成され、これは1または3の mismatches を有するものを含む。

40

**【0069】**

Gautschira(J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001)は、bc1-2 mRNAに対して100%の相補性を有し、bc1-xL mRNAに対する3つの mismatches を有するオリゴヌクレオチドの、インビトロおよびインビボでbc1-2および

50

b c l - x L の双方の発現を減少させる能力を示した。さらにこのオリゴヌクレオチドは、インピボで強力な抗腫瘍活性を示した。

【 0 0 7 0 】

M a h e r および D o l n i c k (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358,1988) は、ヒト D H F R の翻訳抑制能力について、一連の直列型の 1 4 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにそれぞれ 2 または 3 の直列型アンチセンスオリゴヌクレオチド配列から構成される 2 8 および 4 2 の核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドをウサギ網状赤血球アッセイにおいて試験した。3 つの 1 4 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドの各々は、2 8 または 4 2 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドよりも緩やかなレベルにもではあるが、単独で翻訳を阻害することができる。

10

【 0 0 7 1 】

B h a n o t ら ( P C T / U S 2 0 0 7 / 0 6 8 4 0 1 ) は、ショートアンチセンス化合物を提供し、これは化学的に修飾された 8 ~ 1 6 モノマー長の高親和性モノマーを含む。これらのショートアンチセンス化合物は、増加した効果および改善した治療指数により、標的核酸および/またはタンパク質を細胞、組織および動物中で減少させるのに有用であることが示された。ショートアンチセンス化合物は、前述のアンチセンス化合物よりも低い用量で効果的であり、これにより治療の毒性およびコストを減少させることができる。さらに、前述のショートアンチセンス化合物は経口投与に関してより大きな可能性を有する。

20

【 0 0 7 2 】

ハイブリダイゼーション

1 以上の標的部位が特定されると、標的に十分相補的な、即ち十分にハイブリダイズし、十分な特異性を有するオリゴヌクレオチドが選択される。

【 0 0 7 3 】

本発明の文脈において、「ハイブリダイゼーション」は、相補的なヌクレオチドまたはヌクレオチド塩基間の W a t s o n - C r i c k、H o o g s t e e n または逆 H o o g s t e e n 水素結合を意味する。例えば、アデニンおよびチミンは相補的な核酸塩基であり、これは水素結合の形成により対を成す。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーションはここで開示されるアンチセンス化合物と核酸との間で生じる。最も一般的なハイブリダイゼーション機構は、核酸分子の相補的な核酸塩基間での水素結合に関する。

30

【 0 0 7 5 】

ハイブリダイゼーションは、種々の条件下で起こりうる。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、ハイブリダイズする核酸分子の性質および組成により決定される。

【 0 0 7 6 】

配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズすることができるかどうかを決定する方法は、当該分野において既知である。一実施形態においてここで提供されるアンチセンス化合物は核酸に特異的にハイブリダイズすることができる。

【 0 0 7 7 】

相補性

ここで用いられる場合、「相補性」とは、2 つのヌクレオチド間の正確な対形成能力をいう。例えば、オリゴヌクレオチドの特定の部位におけるヌクレオチドは、D N A または R N A 分子の同じ位置のヌクレオチドと水素結合することができ、そのときオリゴヌクレオチドと D N A または R N A はその位置で互いに相補的であると考えられる。各々の分子の十分な数の対応する位置が互いに水素結合することのできるヌクレオチドにより占有される場合、オリゴヌクレオチドおよび D N A または R N A は互いに相補的である。したがって、「特異的にハイブリダイズ可能」および「相補的」は、安定且つ特異的な結合がオリゴヌクレオチドと D N A または R N A 標的との間で生じるのに十分な程度の相補性または正確な対形成を示すのに用いられる語である。当該分野において、アンチセンス化合物

40

50

の配列は、特異的にハイブリダイズ可能な標的核酸の配列と100%相補的である必要はない。アンチセンス化合物は、化合物の標的DNAまたはRNA分子への結合が標的DNAまたはRNAの正常機能を干渉して有用性を消失する場合、特異的にハイブリダイズ可能であり、特異的な結合が所望される条件下、即ちインビボアッセイまたは治療上の措置の場合は生理的条件下で、インビトロアッセイの場合はアッセイが行われる条件下で、アンチセンス化合物の非標的配列への非特異的な結合を回避する十分な程度の相補性がある。

**【0078】**

標的にハイブリダイズし、標的の発現を阻害する本発明のアンチセンスおよび他の化合物は実験により特定され、これらの化合物の配列は以下に本発明の好ましい実施形態として特定される。これらの好ましい配列が相補的である標的配列を以下で「活性部位」と称し、故にこれはターゲティングに好ましい部位である。従って、本発明の別の実施形態はこれらの活性部位にハイブリダイズする化合物を含む。

10

**【0079】**

アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基に所望の効果が起こるように（たとえば、標的核酸、例えばCTGF核酸などのアンチセンス阻害）水素結合し得る場合、アンチセンス化合物および標的核酸は、互いに相補的である。

**【0080】**

アンチセンス化合物が特異的に標的核酸にハイブリダイズ可能なままであるという条件で、アンチセンス化合物とCTGF核酸との間の非相補的な核酸塩基が許容される。さらにアンチセンス化合物は、介在または隣接するセグメントがハイブリダイゼーションイベントに関係しないように、CTGF核酸の1以上のセグメントに対してハイブリダイズしてもよい（例えば、ループ構造、ミスマッチまたはヘアピン構造）。

20

**【0081】**

いくつかの実施形態において、ここで提供されるアンチセンス化合物は、CTGF核酸に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相補的である。標的核酸に対するアンチセンス化合物の相補性の割合は、定型の方法を用いて決定され得る。

**【0082】**

例えば、アンチセンス化合物の20の核酸塩基のうちの18が標的領域に相補的であり、従って特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は90%の相補性を示すだろう。この例において、残りの非相補的な核酸塩基は、相補的な核酸塩基とともにクラスターを形成または散在していてもよく、互いに隣接または核酸塩基に相補的である必要はない。そのようにして、標的核酸に完全に相補的な2つの領域により隣接する（flank）4の非相補的な核酸塩基を有する18核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸と77.8%の全体的相補性を有し、故に本発明の範囲内に入る。アンチセンス化合物の標的核酸の領域との相補性の割合は、当該分野で既知のBLASTプログラム（基礎的局所的アラインメントサーチツール）およびPowerBLASTプログラムを用いて慣行的に決定し得る（Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）。相同性、配列同一性または相同性の割合は例えば、デフォルト設定（Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489）を用いて、Smith and Watermanアルゴリズムを用いたGapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix（登録商標）, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.）により決定され得る。

30

40

**【0083】**

別の実施形態において、ここで提供されるアンチセンス化合物は、標的核酸に完全に相補的（即ち100%相補的）である。例えば、アンチセンス化合物はCTGF核酸、または標的領域、またはその標的セグメントもしくはその標的配列に対して完全に相補的である。ここで用いられる場合、「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各々の核酸塩

50

基が標的核酸の対応する核酸塩基と正確に塩基対形成することができることを意味する。

【0084】

非相補的な核酸塩基の位置は、アンチセンス化合物の5'末端または3'末端であってよい。あるいは非相補的な核酸塩基または核酸塩基が、アンチセンス化合物の内部の位置にあってよい。2以上の非相補的な核酸塩基が存在する場合、それらは隣接している（即ち、連結する）か、または隣接していなくてもよい。一実施形態において、非相補的な核酸塩基は、ギャップマー（gapmer）アンチセンスオリゴヌクレオチドのウィングセグメント（wing segment）に位置する。

【0085】

一実施形態において、最高20の核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的核酸、例えばCTGF核酸などに関連した4未満、3未満、2未満または1未満の非相補的な核酸塩基を含む。

10

【0086】

別の実施形態において、最高30の核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸、例えばCTGF核酸などに関連した6未満、5未満、4未満、3未満、2未満または1未満の非相補的な核酸塩基を含む。

【0087】

ここで提供されるアンチセンス化合物は、標的核酸の一部に相補的なものを含む。ここで用いる場合、「部分」とは、標的核酸の領域またはセグメント内の規定された数の隣接した（即ち、連結した）核酸塩基をいう。一実施形態において、アンチセンス化合物は標的セグメントの少なくとも8の核酸塩基部分に相補的である。別の実施形態において、アンチセンス化合物は標的セグメントの少なくとも12の核酸塩基部分に相補的である。さらに別の実施形態において、アンチセンス化合物は標的セグメントの少なくとも15の核酸塩基部分に相補的である。さらに意図されるのは、標的セグメントの少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の核酸塩基部分、またはこれらの値のうちのいずれか2つにより定義される範囲と相補的である。

20

【0088】

同一性

ここで提供されるアンチセンス化合物は、特定のヌクレオチド配列、配列番号、または特定のISIS番号により示される化合物に対して規定された同一性の割合を有してよい。ここで用いられる場合、同じ核酸塩基対形成能を有するとき、アンチセンス化合物は本明細書中で開示される配列と同一である。例えば、ウラシルおよびチミジンはアデニンと対を形成するため、開示されたDNA配列にチミジンの代わりにウラシルを含むRNAは、当該DNA配列と同一と考えられる。ここにおいて記載されるアンチセンス化合物の短縮および延長したバージョン、ならびにここで提供されるアンチセンス化合物と同一でない塩基を有する化合物もまた意図される。同一でない塩基は、互いに隣接するかまたはアンチセンス化合物中で分散してよい。アンチセンス化合物の同一性の割合は、それと比較される配列を基準として、同一の塩基対を有する塩基の数に応じて計算される。

30

40

【0089】

一実施形態において、アンチセンス化合物は、ここで開示される1以上のアンチセンス化合物またはその一部分と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0090】

修飾

本発明のある実施形態において、アンチセンス化合物の修飾は、置換、またはヌクレオシド間結合、糖部分もしくは核酸塩基への変化を含む。

【0091】

本発明の一実施形態において、化合物は、修飾ヌクレオシド間結合、修飾された糖およ

50

び修飾された核酸塩基からなる群より選択される少なくとも1つの修飾を含む。

【0092】

種々の修飾ヌクレオシド間結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが用いられ得るが、現在好ましい修飾ヌクレオシド間結合が1以上のヌクレオシド間のホスホチオエート結合であるか、またはヌクレオシド間結合の全てがホスホチオエートヌクレオシド間結合である。一般に、アンチセンスオリゴヌクレオチドが少なくとも1つ、典型的には1より多くの修飾された糖を含むことが好ましく、ここにおいて糖は二環糖である。種々の修飾された糖が用いられてもよいが、現時点では2'-O-メトキシエチル糖が用いられることが好ましい。

【0093】

さらに、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける少なくとも1つ、典型的には1を超える核酸塩基が、修飾ヌクレオチド、例えば5-メチルシトシンなどである。

【0094】

ヌクレオシドは、塩基-糖の組合せである。ヌクレオシドの核酸塩基(塩基としても既知)部分は通常、ヘテロ環塩基部分である。ヌクレオシドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合的に結合するホスフェート基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオシドについて、ホスフェート基は糖の2'、3'または5'ヒドロキシ部分に結合し得る。オリゴヌクレオチドは、互いに隣接するヌクレオシドの共有結合によって形成され、直線状のポリマーオリゴヌクレオチドを形成する。オリゴヌクレオチド構造内において、ホスフェート基は一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成するといわれる。

【0095】

アンチセンス化合物への修飾は、置換、またはヌクレオシド間結合、糖部分もしくは核酸塩基への変化を包む。修飾されたアンチセンス化合物は一般に、所望の特性、例えば増強した細胞取り込み、核酸標的に対する増強した親和性、ヌクレアーゼ存在下での増加した安定性、または増加した阻害活性などのため、天然形態よりも好ましい。

【0096】

化学的に修飾されたヌクレオシドが用いられ、短縮または切り詰められたアンチセンスオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結合親和性を増加させてもよい。このため、一般に前記化学的に修飾されたヌクレオシドを有するより短いアンチセンス化合物によって比較可能な結果が得られる。

【0097】

修飾されたヌクレオチド間結合

RNAおよびDNAの天然由来のヌクレオシド間結合は、3'から5'へのホスホジエステル結合である。1以上の修飾された、即ち非天然由来のヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物が一般に、所望の特性、例えば増強された細胞取り込み、増強された標的核酸への親和性、およびヌクレアーゼ存在下での増加した安定性のために、自然発生的なヌクレオシド間結合よりも選択される。

【0098】

修飾されたオリゴヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を有するヌクレオシド間結合、およびリン原子を持たないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデートおよびホスホロチオエートを含むがこれらに限定されない。リン含有およびリン非含有結合の調製方法は既知である。

【0099】

一実施形態において、CTGF核酸を標的とするアンチセンス化合物は1以上の修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合はホスホチオエート結合である。他の実施形態において、アンチセンス化合物の各々のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0100】

10

20

30

40

50

当該分野で既知の通り、ヌクレオシドは塩基 - 糖の組合せである。ヌクレオシドの塩基部分は通常、ヘテロ環塩基である。前記ヘテロ環塩基の最も一般的な種類はプリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合的にホスフェート基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオシドについては、ホスフェート基が糖の 2'、3' または 5' ヒドロキシル部分のいずれかに結合し得る。オリゴヌクレオチドの形成において、ホスフェート基は隣接するヌクレオシドに互いに共有結合的に結合し、直線状のポリマー化合物を形成する。次に、この直線状ポリマー構造のそれぞれの末端がさらに結合し、円形構造を形成し得るが、しかしながら、開放直線状構造が一般的に好ましい。オリゴヌクレオチド構造においては、ホスフェート基は一般にオリゴヌクレオチドのヌクレオシド骨格を形成するといわれている。RNA および DNA の骨格の通常の結合は 3' - 5' ホスホジエステル結合である。

10

#### 【0101】

本発明において有用な好ましいアンチセンス化合物の特定の例は、修飾された骨格または非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを含む。本明細書に規定される通り、修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドは、骨格にリン原子を有するもの、および骨格にリン原子を持たないものを含む。本明細書の目的のため、当該分野で時折言及される通り、それらのヌクレオシド間骨格にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドもまたオリゴヌクレオチドと解されてもよい。

#### 【0102】

好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格は例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルならびに、3' - アルキレンホスホネート、5' - アルキレンホスホネート、およびキラルホスホネートを含む他のアルキルホスホネート、ホスフィンエート、3' - アミノホスホルアミデートおよびアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の 3' - 5' 結合を有するセレノホスフェートおよびボラノホスフェート、これらの 2' - 5' 結合類似体、および 1 以上のヌクレオチド間結合が 3' - 3'、5' - 5' または 2' - 2' 結合である逆転した極性を有するものを含む。逆転した極性を有する好ましいオリゴヌクレオチドは、最も 3' 側の (3' - most) ヌクレオチド結合、即ち、脱塩しているもよい単一の逆転したヌクレオチド残基において単一の 3' - 3' 連結を含む (核酸塩基がないか、またはその代わりにヒドロキシル基を有する)。種々の塩、混合した塩および遊離酸形態もまた含まれる。

20

30

#### 【0103】

上記リン含有結合の調製について教示する代表的な米国特許は、米国特許 3,687,808 号; 同第 4,469,863 号; 同第 4,476,301 号; 5,023,243 号; 同第 5,177,196 号; 同第 5,188,897 号; 同第 5,264,423 号; 同第 5,276,019 号; 同第 5,278,302 号; 同第 5,286,717 号; 同第 5,321,131 号; 同第 5,399,676 号; 同第 5,405,939 号; 同第 5,453,496 号; 同第 5,455,233 号; 同第 5,466,677 号; 同第 5,476,925 号; 同第 5,519,126 号; 同第 5,536,821 号; 同第 5,541,306 号; 同第 5,550,111 号; 同第 5,563,253 号; 同第 5,571,799 号; 同第 5,587,361 号; 同第 5,194,599 号; 同第 5,565,555 号; 同第 5,527,899 号; 同第 5,721,218 号; 同第 5,672,697 号および同第 5,625,050 号を含むがこれらに限定されず、これらのうちのいくつかは一般に本出願に含まれ、その各々は引用によりここに組み込まれる。

40

#### 【0104】

その中にリン原子を含まない好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間結合、混合したヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオチド結合、または 1 以上の短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環ヌクレオチド間結合により形成される骨格を有する。これらは、モルホリノ結合 (一部ヌクレオ

50

シドの糖部分から形成される) ; シロキサン骨格 ; スルフィドおよびスルホン骨格 ; ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格 ; メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格 ; リボアセチル骨格 ; アルケン含有骨格 ; スルファメート骨格 ; メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格 ; スルホネートおよびスルホンアミド骨格 ; アミド骨格 ; ならびに混合した N、O、S および  $CH_2$  成分部分を有する他のものを含む。

#### 【0105】

上記オリゴヌクレオチドの調製について教示する代表的な米国特許は、米国特許 5,034,506号 ; 同第 5,166,315号 ; 同第 5,185,444号 ; 同第 5,214,134号 ; 同第 5,216,141号 ; 同第 5,235,033号 ; 同第 5,264,562号 ; 同第 5,264,564号 ; 同第 5,405,938号 ; 同第 5,434,257号 ; 同第 5,466,677号 ; 同第 5,470,967号 ; 同第 5,489,677号 ; 同第 5,541,307号 ; 同第 5,561,225号 ; 同第 5,596,086号 ; 同第 5,602,240号 ; 同第 5,610,289号 ; 同第 5,602,240号 ; 同第 5,608,046号 ; 同第 5,610,289号 ; 同第 5,618,704号 ; 同第 5,623,070号 ; 同第 5,663,312号 ; 同第 5,633,360号 ; 同第 5,677,437号 ; 同第 5,792,608号 ; 同第 5,646,269号および同第 5,677,439号であるがこれらに限定されず、これらのうちいくつかは一般に本願に含まれ、その各々は引用によってここに組み込まれる。

10

#### 【0106】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物において、糖およびオリゴヌクレオチド結合の両方、即ちヌクレオチド単位の骨格が新規の基により置き換わっている。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。前記オリゴマー化合物の1つである、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されたオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸 (PNA) と称される。PNA 化合物において、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格により置き換わっている。核酸塩基が保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している。PNA 化合物の調製について教示する代表的な米国特許は、米国特許第 5,539,082号 ; 同第 5,714,331号および同第 5,719,262号を含むがこれらに限定されず、これらの各々は引用によりここに組み込まれる。PNA 化合物の更なる教示は Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500に見出すことができる。

20

30

#### 【0107】

本発明の最も好ましい形態は、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオチドであり、特に上で引用した米国特許第 5,489,677号の  $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$  [メチレン(メチリミノ)またはMMI骨格として既知]、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$  および  $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$  [天然のホスホジエステル骨格は  $-O-P-O-CH_2-$  として表わされる]、ならびに上で引用した米国特許第 5,602,240号のアミド骨格である。好ましいのはさらに、上で引用した米国特許第 5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドである。

40

#### 【0108】

##### 修飾された糖部分

修飾オリゴヌクレオチドは、一以上の置換された糖部分を含んでもよい。例えば、フラノシル糖環は、置換基による置換、二環式核酸「BNA」を形成する架橋、および、Sethらの米国特許第 7,399,845号 (その全体が参照によって本明細書に援用される) に記載されているように、S または N(R) のようなヘテロ原子による 4'-O の置換を含む多くの方法で修飾され得る。BNA の他の例は、国際公開公報 WO 2007/146511 (その全体が参照によって本明細書に援用される) に開示されている。

#### 【0109】

本発明のアンチセンス化合物は、修飾された糖部分を有する一以上のヌクレオチドを任

50

意に含むことができる。糖修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性またはアンチセンス化合物に対する幾つかの他の有益な生物学的性質を与えることができる。ヌクレオシドのフラノシル糖環は、これらに限定されないが、置換基の追加、特に2'位での置換基の追加；二環式核酸(BNA)を形成する二つの非ジェミナル環原子の架橋；-S-、-N(R)-または-C(R1)(R2)のような原子または基での4'位の環酸素の置換を含む多数の方法で修飾され得る。修飾された糖は、これらに限定されないが、置換された糖、特に2'-F、2'-OCH<sub>2</sub>(2'-OMe)または2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>(2'-O-メトキシエチルまたは2'-MOE)置換基を有する2'-置換された糖；および、4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2'架橋を有する二環式の修飾された糖(BNA)を含み、ここでn=1またはn=2である。修飾された糖の調製方法は、当業者に周知である。

10

## 【0110】

ある実施形態において、2'-修飾されたヌクレオシドは、二環式の糖部分を有する。そのようなある実施形態において、二環式の糖部分は、アルファ立体配置のD糖である。ある実施形態において、二環式の糖部分は、ベータ立体配置のD糖である。ある実施形態において、二環式の糖部分は、アルファ立体配置のL糖である。ある実施形態において、二環式の糖部分はベータ立体配置のL糖である。

## 【0111】

ある実施形態において、二環式の糖部分は、2'と4'-炭素原子との間の架橋基を含む。ある実施形態において、該架橋基は1~8の連結したピラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式の糖部分は、1~4の連結したピラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式の糖部分は、2または3の連結したピラジカル基を含む。ある実施形態において、二環式の糖部分は、2つの連結したピラジカル基を含む。ある実施形態において、連結したピラジカル基は、-O-、-S-、-N(R1)-、-C(R1)(R2)-、-C(R1)=C(R1)-、-C(R1)=N-、-C(=NR1)-、-Si(R1)(R2)-、-S(=O)<sub>2</sub>-、-S(=O)-、-C(=O)-および-C(=S)-から選択され、ここで、R1およびR2はそれぞれ独立して、H、ヒドロキシル、C1-C12アルキル、置換されたC1-C12アルキル、C2-C12アルケニル、置換されたC2-C12アルケニル、C2-C12アルキニル、置換されたC2-C12アルキニル、C5-C20アリール、置換されたC5-C20アリール、ヘテロ環ラジカル、置換されたヘテロ環ラジカル、ヘテロアリール、置換されたヘテロアリール、C5-C7脂環式ラジカル、置換されたC5-C7脂環式ラジカル、ハロゲン、置換されたオキシ(-O-)、アミノ、置換されたアミノ、アジド、カルボキシル、置換されたカルボキシル、アシル、置換されたアシル、CN、チオール、置換されたチオール、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>-H)、置換されたスルホニル、スルホキシル(S(=O)-H)または置換されたスルホキシルであり；各置換基は独立して、ハロゲン、C1-C12アルキル、置換されたC1-C12アルキル、C2-C12アルケニル、置換されたC2-C12アルケニル、C2-C12アルキニル、置換されたC2-C12アルキニル、アミノ、置換されたアミノ、アシル、置換されたアシル、C1-C12アミノアルキル、C1-C12アミノアルコキシ、置換されたC1-C12アミノアルキル、置換されたC1-C12アミノアルコキシまたは保護基である。

20

30

40

## 【0112】

幾つかの実施形態において、二環式の糖部分は、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-O-CH(アルキル)-、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-N(アルキル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-O-CH(アルキル)-、-(CH(アルキル))-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-NH-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、-N(アルキル)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-、または-O-N(アルキル)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-から選択されるピラジカル基により2'と4'の炭素原子の間で架橋されており、ここでpは1、2、3、4または5であり、各アルキル基はさらに置換されてよい。ある実施形態において、pは1、2または3である。

50



## 【0113】

一つの側面において、前記架橋はそれぞれ独立して、 $-[C(R1)(R2)]_n-$ 、 $-[C(R1)(R2)]_n-O-$ 、 $-C(R1R2)-N(R1)-O-$ または $-C(R1R2)-O-N(R1)-$ である。他の側面において、前記架橋はそれぞれ独立して、 $4'-(CH_2)_3-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-2'$ 、 $4'-CH_2-O-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-O-2'$ 、 $4'-CH_2-O-N(R1)-2'$ および $4'-CH_2-N(R1)-O-2'$ であり、ここでR1はそれぞれ独立して、H、保護基またはC1-C12アルキルである。

## 【0114】

修飾された糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分（天然の、修飾された、またはそれらの組合せ）は、適切な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持される。

10

## 【0115】

一つの実施形態において、アンチセンス化合物は、修飾された糖部分を有する一以上のヌクレオチドを含む核酸を標的にする。好ましい実施形態において、該修飾された糖部分は2'-MOEである。他の実施形態において、2'-MOE修飾ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフ中に配置される。

## 【0116】

現在好ましいオリゴヌクレオチドは、以下の一つを2'位に含む：OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；O-、S-またはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル、ここでアルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換されているか又は置換されていない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あってよい。O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>、およびO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>が特に好ましく、ここでnおよびmは1~約10である。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位において以下の一つを含む：C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>低級アルキル、置換された低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、RNA切断基、レセプター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的性質を改善するための基、および同様の性質を有する他の置換基。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、2'-O-(2-メトキシエチル)または2'-MOEとしても知られる)(Martine et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)、即ち、アルコキシアルコキシ基を含む。さらに好ましい修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基(2'-DMAOEとしても知られる)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としても知られる)、即ち、2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>を含む。さらに好ましい修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の3'または4'炭素原子に連結して、それによって二環式の糖部分を形成している、二環式の核酸(ロックされた核酸(LNA)とも称される)を含む。連結は好ましくは、2'酸素原子と4'炭素原子とを架橋するメチレン(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>基であり、ここでnは1または2であり、a-L-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNA、D-メチレンオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNAおよびエチレンオキシ(4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2')BNAを含む。二環式の修飾された糖も(6'S)-6'メチルBNA、アミノオキシ(4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2')BNA、オキシアミノ(4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2')BNAを含み、ここでRは独立して、H、保護基、またはC1-C12アルキルである。LNAも、相補的DNA、RNAまたはLNAと、高い熱親和性で二

20

30

40

50

重鎖を形成する。円二色性(CD)スペクトルは、完全に修飾されたLNA(特に、LNA:RNA)を含む二重鎖が、A-形態のRNA:RNA二重鎖と構造的に似ていることを示している。LNA:DNA二重鎖の核磁気共鳴(NMR)試験により、LNAモノマーの3'端の立体配座が確認された。二重鎖DNAの認識によっても、LNAによる鎖侵入の示唆が証明されている。ミスマッチ配列の研究により、LNAが、対応する非修飾参照鎖と比較して通常、改善された選択性でワトソン-クリックの塩基対の規則に従うことが示されている。

【0117】

2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結しているLNAは、これによって2'-C, 4'-C-オキシメチレン連鎖を形成し、これによって二環式の糖部分を形成する。該連鎖は、2'酸素原子と4'炭素原子を架橋するメチレン(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>基であってよく、ここでnは1または2である(Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456)。LNAおよびLNAアナログは、相補的DNAおよびRNAと極めて高い二重鎖熱安定性を示し(T<sub>m</sub> = +3から+10)、3'末端核酸分解(3'-exonucleolytic degradation)に対する安定性を示し、また良好な溶解性質を示す。他の好ましい架橋基は、2'-デオキシ-2'-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-4'架橋を含む。LNAおよびそれらの調製は、国際公開公報WO98/39352およびWO99/14226に開示されている。

10

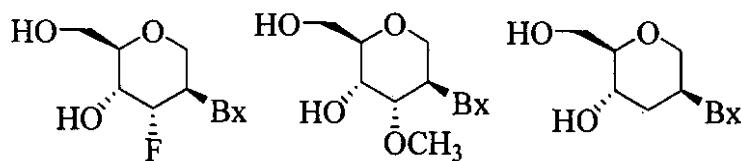
【0118】

他の好ましい修飾は、2'-メトキシ(2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、2'-アリル(2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、2'-O-アリル(2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)および2'-フルオロ(2'-F)を含む。2'-修飾は、アラビノ(上)位置またはリボ(下)位置であってよい。好ましい2'-アラビノ修飾は2'-Fである。同様の修飾が、オリゴヌクレオチドの他の位置で、特に3'末端ヌクレオチド上または2'-5'連結オリゴヌクレオチド中の糖の3'位で、および5'末端ヌクレオチドの5'位で行われても良い。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに糖模倣物またはシクロブチル部分のような代理物(時にDNAアナログとも呼ばれる)を有してもよい。そのような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、これらに限定されないが、米国特許第4,981,957号、同第5,118,800号、同第5,319,080号、同第5,359,044号、同第5,393,878号、同第5,446,137号、同第5,466,786号、同第5,514,785号、同第5,519,134号、同第5,567,811号、同第5,576,427号、同第5,591,722号、同第5,597,909号、同第5,610,300号、同第5,627,053号、同第5,639,873号、同第5,646,265号、同第5,658,873号、同第5,670,633号、同第5,792,747号、および同第5,700,920号を含み、その中の幾つかは本願と共通する出願人により所有されており、それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される。ある実施形態において、ヌクレオチドは下式のうちの1つを有するような、ホルリノ環、シクロヘキセニル環、シクロヘキシル環またはテトラヒドロピラニル環のような代理環構造でリボシル環を置換することによって修飾される。

20

30

【化1】



40

【0119】

多くの他のピシクロおよびトリシクロ糖代理環構造も、アンチセンス化合物への組み入れのためヌクレオチドを改変するのに用いることができることが当該分野で知られている(例えば、Leumann, Christian J.の概説記事を参照)。そのような環構造は、活性を増

50

強するために種々のさらなる置換を行うことができる。

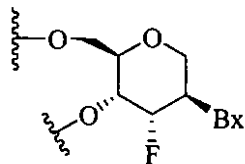
【0120】

本発明の一実施形態において、該化合物は、少なくとも一つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドを含み、ここでテトラヒドロピラン環はフラノース環に置換されている。

【0121】

本発明の他の実施形態において、少なくとも一つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドのそれぞれは、下記構造を有する：

【化2】



10

【0122】

ここで、B x は任意に、ヘテロ環式塩基部分で保護される。

【0123】

修飾ヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、核酸塩基（当該分野では単に「塩基」と称することが多い）の修飾または置換を含んでもよい。核酸塩基の修飾または置換は、天然由来のまたは合成的な非修飾核酸塩基とは構造的に区別できるが、機能的には交換可能である。天然の核酸塩基および修飾核酸塩基は何れも、水素結合に参与することができる。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性またはアンチセンス化合物に他の幾つかの有益な生物学的性質を付与することができる。修飾された核酸塩基は、例えば5 - メチルシトシン（5 - m e - C）のような合成的なおよび天然の核酸塩基を含む。5 - メチルシトシン置換を含むある核酸塩基置換は、特に、標的核酸のためのアンチセンス化合物の結合親和性を上昇させるために有用である。例えば、5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6 ~ 1.2 上昇させることが示されている（Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）。

20

30

【0124】

さらなる非修飾核酸塩基は、5 - ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2 - アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6 - メチルおよび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、ピリミジン塩基の5 - プロピニル（- C C - C H<sub>3</sub>）ウラシルおよびシトシンおよび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（偽性ウラシル）、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 - ヒドロキシルおよび他の8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ（特に5 - プロモ）、5 - トリフルオロメチルおよび他の5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニンおよび8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび7 - デアザアデニンおよび3 - デアザグアニンおよび3 - デアザアデニンを含む。

40

【0125】

ヘテロ環の塩基部分は、プリンまたはピリミジン塩基が他のヘテロ環、例えば7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリミジンおよび2 - ピリドンで置換されたものを含んでもよい。特にアンチセンス化合物の結合親和性を増大するために有用な核酸塩基は、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンならびにN - 2、N - 6およびO - 6置換プリンを含み、これは2アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む。

50

## 【 0 1 2 6 】

一つの実施形態において、C T G F 核酸を標的にするアンチセンス化合物は、一以上の修飾された核酸塩基を含む。さらなる実施形態において、C T G F 核酸を標的にするギャップが広げられた (gap-widened) アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一以上の修飾核酸塩基を含む。ある実施形態において、修飾核酸塩基は 5 - メチルシトシンである。さらなる実施形態において、各シトシンは 5 - メチルシトシンである。

## 【 0 1 2 7 】

本明細書で用いられる場合、「非修飾」または「天然の」核酸塩基は、プリン塩基であるアデニン (A) およびグアニン (G)、およびピリミジン塩基であるチミン (T)、シトシン (C) およびウラシル (U) を含む。

10

## 【 0 1 2 8 】

修飾核酸塩基は、5 - メチルシトシン (5 - me - 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、ピリミジン塩基の 5 - プロピニル (- C C - C H<sub>3</sub>) ウラシルおよびシトシンおよび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 (偽性ウラシル)、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 - ヒドロキシルおよび他の 8 - 置換アデニンおよびグアニン、5 - ハロ (特に 5 - プロモ)、5 - トリフルオロメチルおよび他の 5 - 置換ウラシルおよびシトシン、7 - メチルグアニンおよび 7 - メチルアデニン、2 - F - アデニン、2 - アミノ - アデニン、8 - アザグアニンおよび 8 - アザアデニン、7 - デアザグアニンおよび 7 - デアザアデニンならびに 3 - デアザグアニンおよび 3 - デアザアデニンのような他の合成および天然の核酸塩基を含む。

20

## 【 0 1 2 9 】

さらなる修飾核酸塩基は、フェノキサジンシチジン (1 H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4] ベンゾキサジン - 2 (3 H) - オン)、フェノチアジンシチジン (1 H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4] ベンゾチアジン - 2 (3 H) - オン)、置換フェノキサジンシチジン (例えば 9 - (2 - アミノエトキシ) - H - ピリミド [5, 4 - b] [1, 4] ベンゾキサジン - 2 (3 H) - オン) のような G - クランプ、カルバゾールシチジン (2 H - ピリミド [4, 5 - b] インドール - 2 - オン)、ピリドインドールシチジン (H - ピリド [3', 2' : 4, 5] ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 2 - オン) のような三環式ピリミジンを含む。修飾核酸塩基は、プリンまたはピリミジン塩基が他のヘテロ環、例えば 7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジンおよび 2 - ピリドンで置換されたものを含んでもよい。さらなる核酸塩基は、米国特許第 3, 687, 808 号に開示されたもの、「The Concise Encyclopedia Of polymer Science and Engineering」(pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990) に開示されたもの、Englischrä によって開示されたもの (Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613)、および、Sanghvi, Y. S. によって開示されたもの (Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993.) を含む。

30

40

## 【 0 1 3 0 】

それらの核酸塩基の中には本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大するために特に有用なものがある。それらは、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンならびに N - 2, N - 6 および O - 6 置換プリンであり、これは 2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピニルウラシルおよび 5 - プロピニルシトシンを含む。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を 0.6 ~ 1.2 増大させることが示されており (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、現在好ましい塩基置換であり、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組合せた場合、より好ましい塩基置換である。

50

## 【0131】

上記の修飾核酸塩基ならびに他の修飾核酸塩基の幾つかの調製を教示する代表的な米国特許はこれらに限定されないが、上記米国特許第3,687,808号、並びに、米国特許第4,845,205号、同第5,130,302号、同第5,134,066号、同第5,175,273号、同第5,367,066号、同第5,432,272号、同第5,457,187号、同第5,459,255号、同第5,484,908号、同第5,502,177号、同第5,525,711号、同第5,552,540号、同第5,587,469号、同第5,594,121号、同第5,596,091号、同第5,614,617号、同第5,645,985号、同第5,830,653号、同第5,763,588号、同第6,005,096；および同第5,681,941号（上記のうちの幾つかは本出願人により共通して所有されており、上記米国特許のそれぞれは、参照によって本明細書に援用される）、ならびに米国特許第5,750,692号（その権利者は本願の権利者と共通しており、参照により本明細書に援用される）を含む。

10

## 【0132】

## アンチセンス化合物モチーフ

本発明のある実施形態において、化合物は、(a) 連結デオキシヌクレオシドから成り、好ましくは13の連結した修飾デオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント (gap segment) と；(b) 連結した修飾ヌクレオシドから成り、好ましくは2つの連結した修飾ヌクレオシドから成る5' ウィングセグメント (wing segment) と；(c) 連結修飾ヌクレオシドから成り、好ましくは5つの連結したヌクレオシドから成る3' ウィングセグメントと；から構成されている修飾オリゴヌクレオチドを含む。ここで、該ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと3' ウィングセグメントの間に位置し；各ウィングセグメント内の各修飾ヌクレオシドは、修飾された糖を含み、好ましくは2'-O-メトキシエチル糖を含み；および、各ヌクレオシド間の結合は、ホスホチオエート結合である。アンチセンス化合物中のそれらの修飾ヌクレオチドのパターンは、モチーフと呼ばれる。それらのモチーフは、阻害活性を増大するか、標的核酸への結合親和性を増大するか、またはインピボでのヌクレアーゼによる分解に対する耐性を増大させるような性質をアンチセンス化合物に与える。

20

## 【0133】

ある実施形態において、CTGF核酸を標的とするアンチセンス化合物は、パターン中に配置された化学的に修飾されたサブユニットまたはモチーフを有し、阻害活性を増大するか、標的核酸への結合親和性を増大するか、またはインピボでのヌクレアーゼによる分解に対する耐性を増大させるような性質をアンチセンス化合物に与える。

30

## 【0134】

キメラのアンチセンス化合物は典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞取り込みの増大、標的核酸への結合親和性の増大および/または阻害活性の増大を与えるように修飾された少なくとも一つの領域を含む。キメラのアンチセンス化合物の第二の領域は任意に、細胞性のエンドヌクレアーゼ RNase H（これはRNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する）の基質として機能し得る。

40

## 【0135】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、キメラのアンチセンス化合物と見なされる。ギャップマーにおいて、RNase Hの切断をサポートする複数のヌクレオチドを有する内部領域は、該内部領域のヌクレオシドと化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外部領域間に位置する。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは一般にエンドヌクレアーゼ切断の基質として機能し、一方ウィングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。好ましい実施形態において、ギャップマーの領域はそれぞれ異なる領域を含む糖部分のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために用いられる糖部分のタイプは、幾つかの実施形態において、-D-リボヌクレオシド、-D-デオキシ-リボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド（そのような2'-修飾ヌクレオシドはとりわけ、2'-MOEおよび2'-

50

O-CH<sub>3</sub>を含み得る)および二環式糖修飾ヌクレオシド(そのような二環式糖修飾ヌクレオシドは4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-2'架橋を有するものを含み、ここでn=1またはn=2である)を含む。好ましくは、それぞれの異なる領域は、均一な糖部分を含む。ウィング-ギャップ-ウィングモチーフは一般に、「X-Y-Z」として記載され、ここで「X」は5'ウィング領域の長さを表し、「Y」はギャップ領域の長さを表し、「Z」は3'ウィング領域の長さを表す。ここで記載するアンチセンス化合物は何れも、ギャップマーモチーフを有することができる。ある実施形態において、XおよびZは同一であり、他の実施形態においてそれらは相違する。好ましい実施形態において、Yは8から15ヌクレオチドである。X、YまたはZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30以上のヌクレオチドの何れかであり得る。従って、本発明のギャップマーは、これらに限定されないが、例えば2-13-5、5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1または2-8-2を含む。

10

## 【0136】

ある実施形態において、「ウィングマー(wingmer)」モチーフとしてのアンチセンス化合物は、ギャップマー立体配置について上述したような、ウィング-ギャップまたはギャップ-ウィング立体配置、即ちX-YまたはY-Z立体配置を有する。従って、本発明のウィングマー立体配置は、これらに限定されないが、例えば5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10または8-2を含む。

20

## 【0137】

一実施形態において、核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5-10-5ギャップマーモチーフを有する。

## 【0138】

いくつかの実施形態において、核酸を標的とするアンチセンス化合物は、ギャップが広げられたモチーフを有する。他の実施形態において、核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップが広げられたモチーフを有する。

## 【0139】

一実施形態において、核酸を標的とするギャップが広げられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、3つの化学的に修飾されたヌクレオシドのウィングセグメント間に位置する14の2'-デオキシリボヌクレオチドのギャップセグメントを有する。一実施形態において、化学的な修飾は2'-糖修飾を含む。他の実施形態において、化学的修飾は2'-MOE糖修飾を含む。

30

## 【0140】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、「キメラの」アンチセンス化合物または「キメラ」と見なされ、これはそれぞれが少なくとも一つのモノマーユニット、即ち、オリゴヌクレオチド化合物の場合はヌクレオチドから構成される二以上の化学的に異なる領域を含む。それらのオリゴヌクレオチドは典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増大、細胞取り込みの増大、標的核酸への結合親和性の増大および/または、阻害活性の増大を与えるように修飾された少なくとも一つの領域を含む。与えられた化合物の全ての位置が均一に修飾される必要はなく、実際には、上記の修飾の2以上は、単一の化合物に導入されるか、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに導入されてよい。

40

## 【0141】

オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを切断できる酵素の基質として機能することができる。例として、RNase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。RNase Hの活性は、それ故RNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大きく増大させる。結果的に、キメラのオリゴヌクレオチドを用

50

いた場合、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドに匹敵する結果が、より短いオリゴヌクレオチドによって得られることが多い。RNA 標的の切断は、ゲル電気泳動、および必要であれば、当該分野で既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって、慣例的に検出することができる。

#### 【0142】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、上記2以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドおよび/またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成され得る。そのような化合物は、当該分野においてはハイブリッドまたはギャップマーとも呼ばれている。そのようなハイブリッド構造の調製を教示している代表的な米国特許は、これらに限定されないが、米国特許第5,013,830号、同第5,149,797号、同第5,220,007号、同第5,256,775号、同第5,366,878号、同第5,403,711号、同第5,491,133号、同第5,565,350号、同第5,623,065号、同第5,652,355号、同第5,652,356号、および同第5,700,922号(このうち幾つかは、本願と権利者が共通し、それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される)を含む。

10

#### 【0143】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは一般に、エンドヌクレアーゼ切断の基質として機能し、一方ウィングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。好ましい実施形態において、ギャップマーの領域は、それぞれ異なる領域を含む糖部分のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために用いられる糖部分のタイプは、 $\beta$ -D-リボヌクレオシド、 $\beta$ -D-デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド(そのような2'-修飾ヌクレオシドは2'-MOEを含んでよい)、および二環式の糖修飾ヌクレオシドを含んでよい。

20

#### 【0144】

本発明のオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドと、活性、細胞分布またはオリゴヌクレオチドの細胞性の取り込みを増強する一以上の部分または接合体の化学的な結合に関与する。本発明の化合物は、一級または二級ヒドロキシル基のような、官能基に共有結合した接合体基(conjugate group)を含むことができる。本発明の接合体基は、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬学的性質を増強する基、および、オリゴマーの薬物動態学的性質を増強する基を含む。典型的な接合体基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ピオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および染料を含む。本発明の文脈において、薬学的性質を増強する基は、オリゴマー取り込みを改善し、分解に対するオリゴマーの耐性を増強し、および/またはRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基を含む。本発明の文脈において、薬物動態学的性質を増強する基は、オリゴマー取り込み、分布、代謝または排出を改善する基を含む。代表的な接合体基は、1992年10月23日に出版された国際特許出願PCT/US92/09196(その全開示が参照によって本明細書に援用される)に開示されている。接合体部分(conjugate moiety)は、これに限定されないが、以下のものを含む:コレステロール部分のような脂質部分(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール(Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基(Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-ラック-グリセロールまたはトリエチル-アンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-ラック-グリセロ-3-H-ホスホネート(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; S

30

40

50

hea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)。本発明のオリゴヌクレオチドは、活性薬物物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォルリン酸、ベンゾサイアジアザイド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルピツレート、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌薬または抗生物質に接合されてもよい。オリゴヌクレオチド - 薬物接合体およびそれらの調製は、米国特許出願第 09 / 334, 130 号 (1999 年 6 月 15 日に開示され、その全体が参照によって本明細書に援用される) に開示されている。

10

20

30

40

50

**【0145】**

そのようなオリゴヌクレオチド接合体の調製を教示している代表的な米国特許は、これらに限定されないが、米国特許第 4, 828, 979 号、同第 4, 948, 882 号、同第 5, 218, 105 号、同第 5, 525, 465 号、同第 5, 541, 313 号、同第 5, 545, 730 号、同第 5, 552, 538 号、同第 5, 578, 717、同第 5, 580, 731 号、同第 5, 580, 731 号、同第 5, 591, 584 号、同第 5, 109, 124 号、同第 5, 118, 802 号、同第 5, 138, 045 号、同第 5, 414, 077 号、同第 5, 486, 603 号、同第 5, 512, 439 号、同第 5, 578, 718 号、同第 5, 608, 046 号、同第 4, 587, 044 号、同第 4, 605, 735 号、同第 4, 667, 025 号、同第 4, 762, 779 号、同第 4, 789, 737 号、同第 4, 824, 941 号、同第 4, 835, 263 号、同第 4, 876, 335 号、同第 4, 904, 582 号、同第 4, 958, 013 号、同第 5, 082, 830 号、同第 5, 112, 963 号、同第 5, 214, 136 号、同第 5, 082, 830 号、同第 5, 112, 963 号、同第 5, 214, 136 号、同第 5, 245, 022 号、同第 5, 254, 469 号、同第 5, 258, 506 号、同第 5, 262, 536 号、同第 5, 272, 250 号、同第 5, 292, 873 号、同第 5, 317, 098 号、同第 5, 371, 241、同第 5, 391, 723 号、同第 5, 416, 203 号、同第 5, 451, 463 号、同第 5, 510, 475 号、同第 5, 512, 667 号、同第 5, 514, 785 号、同第 5, 565, 552 号、同第 5, 567, 810 号、同第 5, 574, 142 号、同第 5, 585, 481 号、同第 5, 587, 371 号、同第 5, 595, 726 号、同第 5, 597, 696 号、同第 5, 599, 923 号、同第 5, 599, 928 および同第 5, 688, 941 号を含み、その一部は、本願と共通して所有されており、それぞれ、参照によって本明細書に援用される。

**【0146】**

本発明の他の実施形態において、該化合物は 20 の連結したヌクレオチドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。

**【0147】**

本発明の好ましい実施形態において、該化合物は配列番号：39、40、45、52 および 166 で定義される配列の核酸塩基配列を含む。

**【0148】**

本発明の一実施形態において、該組成物はその核酸塩基配列が配列番号：28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125 および 166 のうちの一つで定義される配列である、連結したヌクレオチドを含む修飾オリゴヌクレオチドまたはそれらの塩、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む。薬学的に許容される塩の例は、当業者に周知である。

**【0149】**



本発明の一実施形態においてアンチセンス化合物は、CTGF配列上のヌクレオチドの範囲内で相補的である。ある実施形態においてアンチセンス化合物は、配列番号9のヌクレオチド718-751、1388-1423、1457-1689、2040-2069、2120-2147、または2267-2301の範囲内で相補的である。ある実施形態において、アンチセンス化合物は、配列番号10のヌクレオチド2728-2797の範囲内で相補的である。それらの範囲を標的にする化合物は、少なくとも50%の阻害を示す(即ち、配列番号:15、29、31、42、46-49、53、72、81、82、152-154、164、および165)。表1に示した特定の標的も、少なくとも50%の阻害を示す(即ち、配列番号:12、20、33、34、76、107、129、132、134、136、および146)。ある実施形態において、アンチセンス化合物は、配列番号9のヌクレオチド553-611、1394-1423、1469-1508、1559-1605、1659-1689または2100-2129、および配列番号10の2623-2647の範囲内で相補的である。その中で標的とされる化合物は、少なくとも60%阻害(即ち、配列番号:27、28、38、39、40、43、44、45、50、51、52、54、55、56、77、78、79、138および139)を示す。表1に示す特定のさらなる標的部位も、少なくとも60%阻害(即ち、配列番号:24、30、61、63、67、69、73、86、125、128、および161)を示すものがある。ある実施形態においてアンチセンス化合物は、ヌクレオチド1399-1423の範囲内に相補的である。その点で標的にする化合物は、少なくとも70%阻害(即ち、配列番号:39および40)を示す。表1に示した特定の標的部位もまた、少なくとも70%阻害を実証している(即ち、配列番号:28、30、44、45、51、56、78、128、および138)。表1に示した1つの標的部位もまた、少なくとも80%阻害を示す(即ち、配列番号44)。ある実施形態において、阻害割合はアンチセンス化合物が50nmの濃度でHuVec細胞に送達されたときに達成される。より詳細には、下記実施例8を参照されたい。

10

20

#### 【0150】

組成物の一実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチドである。本発明の他の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドを含み、ここで該修飾オリゴヌクレオチドは20の連結したヌクレオチドから成る。

#### 【0151】

本発明の他の実施形態は、細胞または組織中で結合組織成長因子の発現を阻害するための方法を提供し、該方法は、該細胞または組織を、結合組織成長因子の発現が阻害されるような条件下で関心の対象である化合物と接触させることを含む。

30

#### 【0152】

組成物、および、医薬組成物の処方のための方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物または製剤の調製のための薬学的に許容される、活性な物質および/または不活性な物質と混合されてよい。組成物および医薬組成物の処方のための方法は、これらに限定されないが、投与経路、疾病の程度または投与される用量を含む多くの基準に従う。

#### 【0153】

核酸を標的にするアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物を適切な薬学的に許容される希釈剤または担体と組合せることによって医薬組成物中で利用され得る。薬学的に許容される希釈剤は、リン酸緩衝食塩水(PBS)を含む。PBSは非経口的に送達される組成物中で用いられるのに適した希釈剤である。従って、一実施形態において、核酸を標的にするアンチセンス化合物および薬学的に許容される希釈剤を含む薬学的組成物がここで記載される方法において用いられる。一実施形態において、薬学的に許容される希釈剤はPBSである。別の実施形態において、薬学的に許容される希釈剤は、製薬等級の生理食塩水または製薬等級のPBSである。他の実施形態において、アンチセンス化合物はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

40

#### 【0154】

50

アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、任意の薬学的に許容される塩、エステルまたはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物に投与された場合に生物学的に活性な代謝産物またはそれらの残渣を（直接的にまたは間接的に）提供できる、任意の他のオリゴヌクレオチドを包含する。従って例えば、該開示は、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的同等物まで及ぶ。適切な薬学的に許容される塩は、これらに限定されないが、ナトリウム塩およびカリウム塩を含む。

【0155】

プロドラッグは、体内で内因性ヌクレアーゼにより切断され、活性なアンチセンス化合物を形成するアンチセンス化合物の一端または両端でのさらなるヌクレオチドの取り込みを含むことができる。特に、本発明のオリゴヌクレオチドのプロドラッグ変型は、WO 93 / 24510 (Gosselinら、1993年12月9日に公開)またはWO 94 / 26764 および米国特許第5,770,713号 (Imbachら) に開示された方法に従って、SATE [(S-アセチル-2-チオエチル)ホスフェート]誘導体として調製される。

10

【0156】

「薬学的に許容される塩」という用語は、生理的および薬学的に許容される本発明の化合物の塩をいい、即ち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、且つそれらに望ましくない中毒学的影響を与えない塩を指す。

【0157】

薬学的に許容される塩基付加塩は、アルカリ及びアルカリ土類金属または有機アミンのような金属またはアミンにより形成される。カチオンとして用いられる金属の例は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどである。適切なアミンの例は、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、およびプロカインである (例えば、Berge et al., 「Pharmaceutical Salts,」 J. of Pharma Sci., 1977, 6, 1-19を参照)。前記酸性化合物の塩基付加塩は慣習的な方法で、遊離酸形態を、塩を生産するのに十分な量の所望の塩基と接触させることにより調製される。遊離酸形態は慣習的な方法で、塩形態を酸と接触させ、遊離酸を単離することにより再生され得る。遊離酸形態は、極性溶媒中の特定の物理的性質、例えば溶解性などにおいてそれらのそれぞれの塩形態と幾分相違するが、そうでなければ、該塩は、本発明の目的のため、それらの遊離酸それぞれと等価である。ここで用いられる場合、「薬学的付加塩」は、本発明の組成物の成分のうちの一つの酸形態の薬学的に許容される塩を含む。これらは、アミンの有機酸塩または無機酸塩を含む。好ましい酸塩は、塩酸塩、酢酸塩、サリチル酸塩、硝酸塩およびリン酸塩である。他の適切な薬学的に許容される塩は、当業者に周知であり、種々の有機酸及び無機酸の塩基性塩を含み、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸またはリン酸のような無機酸と；スルホン酸、スルホ酸またはホスホ酸 (phospho acids) のような有機酸と、または、N-置換スルファミド酸、例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、メチルマレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸、シュウ酸、グルコン酸、グルカン酸、グルクロン酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、2-フェノキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸、エンボン酸、ニコチン酸またはイソニコチン酸；および、天然のタンパク質合成に關与する20アルファ-アミノ酸、例えば、グルタミン酸またはアスパラギン酸のようなアミノ酸と、および、フェニル酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、エタン-1,2-ジスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-メチルベンゼンスルホン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ナフタレン-1,5-ジスルホン酸、2-または3-ホスホグリセリン酸、グルコース-6-ホスフェート、N-シクロヘキシルスルファミン酸 (シクラミン酸塩の形成による) と、または、アスコルビン酸のような他の酸有機化合物との塩を含む。化合物の薬学的に許容される塩は、薬学的に許容されるカチオンと調製されることもできる。適切な薬学的に許容されるカチオンは、当業者に周知であり、アルカリカチオン、アルカリ土類カチオン、アンモニ

20

30

40

50

ウム及び四級アンモニウムカチオンを含む。炭酸塩または炭酸水素塩も可能である。

【0158】

オリゴヌクレオチドについて、薬学的に許容される塩の好ましい例は、これらに限定されないが、(a)ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、スベルミンおよびスベルミジンのようなポリアミンのようなカチオンなどにより形成された塩；(b)無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などと形成された酸付加塩；(c)有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトン酸などにより形成された塩；および(d)元素アニオン、例えば塩素、臭素、およびヨウ素などから形成された塩を含む。

10

【0159】

本発明のある実施形態において、薬学的に許容される担体または希釈剤は、組成中で薬理的活性を欠く成分であるが、一以上の核酸をヒトまたは非ヒト動物に送達するために、薬学的に必要であるか、または溶媒、懸濁剤もしくは任意の他の薬学的に不活性なビヒクルとして望ましい。薬学的担体は当業者に周知である。

【0160】

担体

本発明の組成物の幾つかは、製剤中に担体化合物をも取り込んでいる。本明細書で用いられる場合、「担体化合物」または「担体」は、核酸またはそれらのアナログを指すことができ、これは不活性であるが(即ち、それ自体は生物学的活性を有さない)、例えば生物学的に活性な核酸の分解または循環からのその除去の促進によって生物学的活性を有する核酸の生物学的利用率を減少させるインビボプロセスにより核酸として認識される。核酸および担体化合物の同時投与、典型的には後者の物質が過剰である同時投与は、恐らくは共通するレセプターに対する担体化合物と核酸との競合のために、肝臓、腎臓または他の循環器外の貯蔵器に回収される核酸の量を実質的に減少することができる。例えば、肝臓組織内の部分的なホスホロチオアートオリゴヌクレオチドの回収は、それがポリイノシン酸、デキストラン硫酸、ポリシチジル酸または4-アセトアミド-4'-イソチオシアノ-スチルベン-2,2'-ニスルホン酸と同時投与されたときに減少させることができる(Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183)。

20

30

【0161】

賦形剤

担体化合物とは対照的に、「薬学的担体」または「賦形剤」は一以上の核酸を動物に送達するための薬学的に許容される溶媒、懸濁剤、または他の任意の薬理的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体または固体であってよく、核酸および与えられた医薬組成物の他の成分と組合せる場合、計画した投与方法を念頭において選択され、所望のバルク、一貫性などに提供する。典型的な薬学的担体は、これらに限定されないが、結合剤(例えば、アルファ化トウモロコシスターチ、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)；充填剤(例えば、ラクトースおよび他の糖、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレートまたはリン酸水素カルシウムなど)；潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど)；崩壊剤(例えば、スターチ、グリコール酸ナトリウムスターチ(sodium starch glycolate)など)；および湿潤剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウムなど)を含む。

40

【0162】

核酸と有害に反応しない、非経口的投与に適した薬学的に許容される有機または無機賦形剤は、本発明の組成物を処方するために用いられ得る。適切な薬学的に許容される担体

50

は、これらに限定されないが、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、珪酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどを含む。

【0163】

核酸の局所的投与のための製剤は、無菌および非無菌の水溶液、アルコールなどの一般溶媒中の非水溶液、または液体もしくは固体の油ベースの核酸溶液を含んでよい。該溶液は、バッファー、希釈剤および他の適切な添加剤を含んでもよい。核酸と有害に反応しない、非経口投与に適した薬学的に許容される有機賦形剤または無機賦形剤を用いることができる。

【0164】

本発明の一実施形態において、該組成物は、一本鎖または二重鎖オリゴヌクレオチドを含む修飾オリゴヌクレオチドを含み、ここで該修飾オリゴヌクレオチドは20の連結したヌクレオチドから成る。

【0165】

本発明の別の実施形態は、細胞または組織における結合組織成長因子の発現を阻害する方法に関し、該方法は、結合組織成長因子の発現が阻害されるような条件下で、細胞または組織を上記化合物の何れか一つと接触させることを含む。

【0166】

本発明のある実施形態は、結合組織成長因子の発現に付随する疾病または状態を有する動物の治療方法に関し、該方法は、結合組織成長因子の発現を阻害するのに有効な量の上記化合物を該動物に投与して、これによって該動物を治療することを含む。

【0167】

本発明の方法の実施において、動物はヒト並びに非ヒト動物を含み、好ましくはヒトを含む。

【0168】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤を含む。本発明の医薬組成物は、局所性のまたは全身性の処置が望まれているかどうか依存して、および、治療されるべき領域に依存して、多くの方法で投与され得る。投与は、局所的（眼の膜、ならびに膈および直腸送達を含む粘膜への投与を含む）、肺性、例えば粉末またはエアロゾルの吸入またはガス注入であり、これは気管内、鼻腔内、上皮性および経皮性、経口または非経口によるものを含む。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射もしくは注入；または頭蓋内、例えばくも膜下腔内または脳室内の投与を含む。少なくとも一つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドが、経口投与のために特に有用であると考えられている。

【0169】

局所的投与のための医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、スプレー、液体および粉末を含んでよい。慣習的な薬学的担体、水、粉末または油性ベース、濃厚剤などが必要であるかまたは望ましい。被覆されたコンドーム、グローブなども有用である。好ましい局所的製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤などの局所的送達剤と混合されたものを含む。好ましい脂質およびリポソームは、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジル DOPE エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン DMPC、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール DMPG）およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル DOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン DOTMA）を含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、リポソーム内に被包されてよく、または特にカチオン性リポソームへの複合体を形成することができる。或いは、オリゴヌクレオチドは、脂質、特にカチオン性脂質に複合してよい。好ましい脂肪酸およびエステルは、これらに限定されないが、アラキドン酸、オレイン酸、エイコサン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸

10

20

30

40

50

、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプラート、トリカプラート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプラート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはC<sub>1-10</sub>アルキルエステル(例えば、イソプロピルミリステート I P M)、モノグリセリド、ジグリセリドまたは薬学的に許容されるそれらの塩を含む。局所的製剤は、1999年5月20日に出願された米国特許出願第09/315,298号(その全体が参照によって本明細書に援用される)に詳細に開示されている。

#### 【0170】

経口投与のための組成物および製剤は、粉末または顆粒、微小粒子、ナノ粒子、水または非水媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、サッシェ、錠剤または微小錠剤を含む。濃厚剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散剤または結合剤も望ましい。好ましい経口製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが一以上の浸透促進剤の界面活性剤およびキレート剤と組合せて投与されるものである。好ましい界面活性剤は、脂肪酸および/またはエステルまたはそれらの塩、胆汁酸および/またはそれらの塩を含む。好ましい胆汁酸/塩は、ケノデオキシコール酸(C D C A)およびウルソデオキシケノデオキシコール酸(U D C A)、コール酸、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、グルコール酸、グリコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロデオキシコール酸、ナトリウムタウロ-24,25-ジヒドロ-フシデート、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウムを含む。好ましい脂肪酸は、アラキドン酸、ウンデカン酸、オレイン酸、ラウリン酸、カプリル酸、カプリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプラート、トリカプラート、モノオレイン、ジラウリン、グリセリル1-モノカプラート、1-ドデシルアザシクロヘプタン-2-オン、アシルカルニチン、アシルコリン、またはモノグリセリド、ジグリセリドまたは薬学的に許容されるそれらの塩(例えば、ナトリウム)を含む。浸透促進剤の組合せ、例えば、胆汁酸/塩との組合せにおける脂肪酸/塩もまた好ましい。特に好ましい組み合わせは、ラウリン酸、カプリル酸およびU D C Aのナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤は、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルを含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥した粒子を含む顆粒形態で経口的に送達され得るか、あるいは複合化して微小粒子ナノ粒子を形成し得る。オリゴヌクレオチド複合化剤は、ポリアミノ酸；ポリイミン；ポリアクリラート；ポリアルキルアクリラート、ポリオキセサン、ポリアルキルシアノアクリラート；カチオン化ゼラチン、アルブミン、スターチ、アクリラート、ポリエチレングリコール(P E G)およびスターチ；ポリアルキルシアノアクリラート；D E A E-変性ポリイミン、ポルラン(pollulans)、セルロースおよびスターチを含む。特に好ましい複合化剤は、キトサン、N-トリメチルキトサン、ポリ-L-リジン、ポリヒスチジン、ポリオルニチン、ポリスペルミン、プロタミン、ポリビニルピリジン、ポリチオジエチルアミノメチル-エチレンP(T D A E)、ポリアミノスチレン(例えば、p-アミノ)、ポリ(メチルシアノアクリラート)、ポリ(エチルシアノアクリラート)、ポリ(ブチルシアノアクリラート)、ポリ(イソブチルシアノアクリラート)、ポリ(イソ-ヘキシルシアノアクリラート)、D E A E-メタクリレート、D E A E-ヘキシルアクリラート、D E A E-アクリルアミド、D E A E-アルブミンおよびD E A E-デキストラン、ポリメチル-アクリラート、ポリヘキシルアクリラート、ポリ(D,L-乳酸)、ポリ(DL-乳酸-グリコール酸(P L G A)、アルギナート、およびポリエチレン-グリコール(P E G)を含む。オリゴヌクレオチドの経口製剤およびそれらの調製は、米国特許出願第08/886,829号(1997年7月1日出願)、同第09/108,673号(1998年7月1日出願)、同第09/256,515号(1999年2月23日出願)、同第09/082,624号(1998年5月21日出願)および同第09/315,298号(1999年5月20日出願)(それらの全体はそれぞれ、参照によって本明細書に援用される)に詳細に開示されている。

#### 【0171】

経口、くも膜下腔内または脳室内投与のための組成物および製剤は、緩衝液、希釈剤お

よび他の適切な添加剤、例えば、これらに限定されないが、浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体または賦形剤を含み得る滅菌水溶液を含んでもよい。

【0172】

本発明の医薬組成物は、これらに限定されないが、溶液、エマルション、およびリポソーム含有製剤を含む。これら組成物は、種々の成分から産生することができ、これは予備成形された液体、自己乳化固体および自己乳化半固体を含むが、これらに限定されない。

【0173】

単位投与量形態で都合よく提供され得る本発明の医薬品製剤は、製薬産業において周知の従来技術に従って調製され得る。そのような技術は、活性成分を医薬品の担体または賦形剤と会合させる工程を含む。一般に製剤は、活性成分を均一におよび本質的に液体担体または細かく分割した担体またはその両方に会合させ、次いで必要であれば、産物を成形することにより調製される。

【0174】

本発明の組成物は、これらに限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐薬、および浣腸のような多くの可能な剤形の何れかに処方され得る。本発明の組成物は、水中、非水中、または混合溶媒中の懸濁液としても処方され得る。水性懸濁液は、さらに例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む懸濁液の粘度を増大させる物質を含んでもよい。懸濁液は、安定剤を含んでもよい。

【0175】

本発明の一実施形態において、医薬組成物は、泡沫として処方および使用され得る。医薬的泡沫は、これらに限定されないが、エマルション、マイクロエマルション、クリーム、ゼリーおよびリポソームのような製剤を含む。基本的に性質は同じであるものの、それらの製剤は、成分と最終産物の濃度 (consistency) が異なっている。そのような組成物及び製剤の調製は、医薬及び製剤分野の技術者に一般に知られており、本発明の組成物の処方に適用され得る。

【0176】

エマルション

本発明の組成物は、エマルションとして調製及び処方されても良い。エマルションは典型的には、一つの液体が他の液体中に、通常  $0.1 \mu\text{m}$  を超える直径の液滴の形態で分散している不均一系である (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301)。エマルションは多くの場合、本質的に互いに混合および分散した、二つの不混和性の液相を含む二相性の系である。一般にエマルションは、油中水 (w/o) または水中油 (o/w) の種類の何れかである。水相が細かく分けられ、微小な液滴としてバルクの (bulk) 油相中に分散されている場合、得られる組成物は油中水 (w/o) エマルションと呼ばれる。一方、油相が細かく分けられ、微小な液滴としてバルクの水相中に分散されている場合、得られる組成物は水中油 (o/w) エマルションと呼ばれる。エマルションは、分散相の他にさらなる成分と、水相、油相、または分離した相としてのそれ自体の何れかの溶液として存在し得る活性薬剤を含み得る。乳化剤、安定剤、染料、および抗酸化剤などの医薬賦形剤もまた、必要な場合はエマルション中に存在してよい。医薬エマルションは例えば、油中水中油 (o/w/o) および水中油中水 (w/o/w) の場合のエマルションなどの、2より多い相で構成された多重エマルションであってもよい。そのような複合製剤は多くの場合、単純な二成分エマルションが提供しない利点を提供する。o/w エマルションの個々の油滴が小さい水滴を取り囲んでいる多重エマルションは、w/o/w エマルションを構成する

10

20

30

40

50

。同様に、連続する油中で安定化された水の小球中に取り囲まれた油滴の系は  $o/w/o$  エマルジョンを提供する。

【0177】

エマルジョンは、熱力学的な安定性がわずかであるか、または安定性がないことによって特徴付けられる。多くの場合、エマルジョンの分散相または不連続相は、外側の相または連続相中に良く分散され、乳化剤または製剤の粘度によってこの形態で維持される。エマルジョン何れかの相は、エマルジョン系軟膏ベースおよびクリームの場合のように、半固体または固体であってよい。エマルジョンを安定化させる他の手段は、エマルジョンの何れかの相に取り込まれ得る乳化剤の使用を必要とする。乳化剤は、大まかに次の4つのカテゴリーに分類され得る：合成界面活性剤、天然由来の乳化剤、吸収ベース、および微細分散固体 (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

10

【0178】

合成界面活性剤は、表面活性剤としても知られ、エマルジョンの処方において広い適応性が見出されており、文献に概説されている (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199)。界面活性剤は典型的には、両親媒性であり、親水性部分と疎水性部分を含む。界面活性剤の親水性性質と疎水性性質の割合は、親水 - 親油平衡 (HLB) と名付けられ、製剤の調製において界面活性剤を分類および選択する際に有益な手段である。界面活性剤は、親水基：非イオン性、陰イオン性、陽イオン性および両性の性質に基づいて異なるクラスに分類され得る (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285)。

20

【0179】

エマルジョン製剤中で用いられる天然由来の乳化剤は、ラノリン、蜜蝋、ホスファチド、レシチンおよびアカシアを含む。吸収基剤 (absorption base) は、無水ラノリンおよび親水性ワセリンのような、水に浸漬されて  $w/o$  エマルジョンを形成し、それらの半固体コンシステンシー (consistency) をなお保持することが可能であるような親水性の性質を有する。微細に分割された固体は、特に界面活性剤と組み合わせられ、粘稠性製剤中で良好な乳化剤として用いられ得る。これらは、重金属水酸化物などの極性無機固体、ペントナイト、アタパルジャイト、ヘクトライト、カオリン、モンモリロナイト、コロイド性ケイ酸アルミニウムおよびコロイド性ケイ酸アルミニウムマグネシウムなどの非膨張性粘土、色素および炭素などの無極性固体またはトリストエアリン酸グリセリンを含む。

30

【0180】

多くの多様な非乳化材料もまた、エマルジョン製剤に含まれ、エマルジョンの性質に寄与する。これらは、脂肪、油、ワックス、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪エステル、湿潤剤、親水性コロイド、保存剤および抗酸化剤を含む (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。

40

【0181】

親水性コロイドまたは親水コロイドは、天然由来のガムおよび多糖類などの合成ポリマー (例えば、アカシア、寒天、アルギン酸、カラゲナン、ガーゴム、カラヤゴム、およびトラガカント)、セルロース誘導体 (例えば、カルボキシメチルセルロースおよびカルボキシプロピルセルロース)、および合成ポリマー (例えば、カルボマー、セルロースエーテル、およびカルボキシビニルポリマー) を含む。これらは、水中で分散または膨張して、分散された相液滴の周囲に強い界面膜を形成することにより、および外側相の粘度を増大させることにより、エマルジョンを安定化するコロイド溶液を形成する。

50

## 【0182】

エマルションは一般に、炭水化物、タンパク質、ステロールおよびホスファチドなどの微生物の成長を容易に支援し得る多くの成分を含むことが多いため、これらの製剤は保存剤を組み入れることが多い。通常用いられるエマルション製剤中に含まれる保存剤は、メチルパラベン、プロピルパラベン、四級アンモニウム塩、塩化ベンザルコニウム、p-ヒドロキシ安息香酸のエステル、およびホウ酸を含む。製剤の劣化を防ぐため、抗酸化剤も通常エマルション製剤に添加される。用いられる抗酸化剤は、トコフェロール、没食子酸アルキル、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエンのような遊離ラジカル捕捉剤、またはアスコルビン酸およびメタ重亜硫酸ナトリウムなどの還元剤、およびクエン酸、酒石酸、およびレシチンなどの抗酸化協力剤であってよい。

10

## 【0183】

皮膚科学的、経口的、及び非経口的な経路を介したエマルション製剤の適用およびそれらの製造方法は、文献に概説されている (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。経口送達のためのエマルション製剤は、処方容易さ、吸収及び生物学的利用率の効率の観点からの理由のために、極めて広く用いられている (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199)。鉱物油ベースの緩下薬、油溶解性ビタミンおよび高脂肪栄養製剤はとりわけ、通常 o/w エマルションとして経口的に投与される材料である。

20

## 【0184】

本発明の一実施形態において、オリゴヌクレオチドおよび核酸の組成物は、マイクロエマルションとして処方される。マイクロエマルションは、光学的に等方性であり熱力学的に安定な単一の液体溶液である、水性、油性および両親媒性の系として定義される (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245)。典型的にはマイクロエマルションは、最初に油を水性界面活性剤溶液中に分散させ、次いで十分な量の第四成分、一般には中間の鎖長のアルコールを添加して、透明な系を形成することによって調製される系である。したがって、マイクロエマルションは、熱力学的に安定な界面活性分子の界面膜によって安定化された、二つの不混和性の液体の等方的に清澄な分散として記述されている (Leung and Shah, in: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215)。マイクロエマルションは通常、油、水、界面活性剤、補助界面活性剤および電解質を含む 3 ~ 5 種の成分の組み合わせによって調製される。マイクロエマルションが油中水 (w/o) タイプかまたは水中油 (o/w) タイプかということは、用いられる油及び界面活性剤の性質ならびに界面活性分子の極性頭部および炭化水素尾部の構造および幾何学的充填に依存する (Schott, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271)。

30

## 【0185】

相図を用いる現象学的なアプローチが広範囲に研究されており、どのようにマイクロエマルションを処方するのかについて当業者に包括的な知識を与えている (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger および Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335)。従来のエマルションと比較して、マイクロエマルションは、自発的に形成される熱力学的に安定な液滴の製剤中に、水不溶性薬物を可溶化する利点を提供する。

40

## 【0186】

マイクロエマルションの調製において用いられる界面活性剤は、これらに限定されない

50



が、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、Brij 96、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリグリセロール脂肪酸エステル、テトラグリセロールモノラウレート (M L 3 1 0)、テトラグリセロールモノオレアート (M O 3 1 0)、ヘキサグリセロールモノオレアート (P O 3 1 0)、ヘキサグリセロールペンタオレアート (P O 5 0 0)、デカグリセロールモノカプラート (M C A 7 5 0)、デカグリセロールモノオレアート (M O 7 5 0)、デカグリセロールセスキオレアート (S O 7 5 0)、デカグリセロールデカオレアート (D A O 7 5 0) を単独でまたは補助界面活性剤と組み合わせて含む。補助界面活性剤は通常、エタノール、1-プロパノール、および1-ブタノールのような短鎖アルコールであり、界面活性剤膜中に浸透することにより界面の流動性を増大させるのに役立つ。結果として空間が界面活性剤分子の間に生じるために不規則な膜を作り出す。マイクロエマルションはしかしながら、補助界面活性剤を使用せずに調製されることもでき、アルコールを含まない自己乳化マイクロエマルション系が当該分野で知られている。水相は典型的に、これらに限定されないが、水、薬物の水溶液、グリセロール、PEG 300、PEG 400、ポリグリセロール、プロピレングリコール、およびエチレングリコールの誘導体であってよい。油相は、これらに限定されないが、Captex 300、Captex 355、Capmul MCM、脂肪酸エステル、中程度の鎖状 (C8 - C12) モノ、ジ、およびトリ-グリセリド、ポリオキシエチレングリセリル脂肪酸エステル、脂肪アルコール、ポリグリコールグリセリド、飽和ポリグリコール C8 - C10 グリセリド、植物油およびシリコン油などの物質を含んでよい。

#### 【0187】

マイクロエマルションは、薬物の可溶化と増強された薬物の吸収の観点から特に興味深い。脂質ベースのマイクロエマルション (o/w および w/o のいずれも) は、ペプチドを含む薬物の経口的な生物学的利用率を増強することが提唱されている (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205)。マイクロエマルションは、薬物可溶化の改善、酵素的加水分解からの薬物の保護、膜流動性および透過性における界面活性剤誘導変化による薬物の吸収の可能な増強、調製の容易さ、固体投与剤形の経口投与の容易さ、臨床的力価の改善、および毒性の減少の利点を与える (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143)。マイクロエマルションは、それらの成分が環境温度で一緒になったときに自然に形成され得ることが多い。これは、熱不安定性の薬物、ペプチドまたはオリゴヌクレオチドを処方するときに特に有利である。マイクロエマルションはまた、化粧品および医薬の適用の両方において活性成分の経皮的送達にも有効である。本発明のマイクロエマルション組成物および製剤が、消化管からのオリゴヌクレオチドおよび核酸の増大した全身的な吸収を促進し、ならびに消化管、膈、口腔および他の投与領域内でのオリゴヌクレオチドおよび核酸の局所的な細胞取り込みを改善することが予期される。

#### 【0188】

本発明のマイクロエマルションは、ソルビタンモノステアレート (Grill 3)、ラブラソール (Labrasol)、および製剤の性質を改善し、本発明のオリゴヌクレオチドおよび核酸の吸収を増強するための浸透促進剤のような、さらなる成分および添加剤を含んでもよい。本発明のマイクロエマルションに用いられる浸透促進剤は、5つの広いカテゴリー：界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート化非界面活性剤の一つに属するように分類されることができる (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92)。これらの分類のそれぞれについては、上述した。

#### 【0189】

##### リポソーム

マイクロエマルション以外にも多くの有機的界面活性剤構造が研究されており、薬物の製剤に用いられている。それらは、単分子層、ミセル、二分子層および小胞を含む。リポソームのような小胞について、それらの特異性と薬物送達の観点からそれらが提供する作用期間のために、大きな関心が持たれている。本発明で用いられる場合、「リポソーム」

の語は、球状の二分子層（または複数の二分子層）に配置された両親媒性脂質で構成された小胞を意味する。

【0190】

リポソームは、親油性物質から形成された膜と水性の内部とを有する単層または多層の小胞である。水性部分は、送達すべき組成物を含む。カチオン性リポソームは、細胞壁に融合できるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、細胞壁と効率的に融合することはできないものの、インピボでマクロファージに取り込まれる。

【0191】

無処置の哺乳類の皮膚を通過するために、脂質小胞は、適切な経皮的勾配の影響下で、それぞれ直径が50nm未満である一続きの微細な穴を通過しなければならない。それ故、高度に変形することができ、且つそのような微細な穴を通過することができるリポソームの使用が望まれている。

10

【0192】

リポソームのさらなる利点には次のものが含まれる；天然のリン脂質から得られたリポソームは生体適合性および生分解性である；リポソームは、広い範囲の水および脂質溶解性薬物を取込むことができる；リポソームは、それらの内部区画に被包した薬物を代謝および分解から保護することができる（Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245）。リポソーム製剤の調製において重要な検討は、脂質表面電荷、小胞サイズおよびリポソームの水性容積である。

20

【0193】

リポソームは、作用部位に活性成分を移動し送達するために有用である。リポソームの膜が生体膜に構造的に類似しているために、リポソームが組織に適用される場合、リポソームは細胞膜と融合し始める。リポソームと細胞との融合が進行すると、リポソームの内容物が細胞に移動し、ここで活性剤が作用する。

【0194】

リポソーム製剤は、多くの薬物送達の形態として広範な治験の中心になっている。局所投与についてリポソームが他の製剤を超える幾つかの利点を提示する証拠が増加している。そのような利点は、投与された薬物の高い全身性の吸収に関する副作用の減少、所望の標的における投与された薬物の蓄積の増大、および親水性と疎水性両方の多種多様な薬物を皮膚に投与する能力を含む。

30

【0195】

高分子量DNAを皮膚に送達するリポソームの能力を詳細に述べた報告が幾つかある。鎮痛薬、抗体、ホルモンおよび高分子量DNAを含む化合物が皮膚に投与された。大多数の適用は、結果として上皮を標的にしたものである。

【0196】

リポソームは二つの広い分類に入る。カチオン性リポソームは、負の電荷をもつDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成する正の電荷をもつリポソームである。正の電荷をもつDNA/リポソーム複合体は、負の電荷を持つ細胞表面に結合し、エンドソーム内に内部移行する。エンドソーム内の酸性pHのため、リポソームが破裂し、その内容物を細胞質に放出する（Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985）。

40

【0197】

pH感受性または負の電荷をもつリポソームは、DNAと複合するというよりもDNAを閉じ込める。DNAと脂質の両方が同じ電荷を持つため、複合体形成を生じるよりむしろ反発を生じる。それにも関わらず、幾つかのDNAは、これらのリポソームの水性内部に取り込まれる。pH感受性リポソームは、培養中の細胞の単分子層に、チミジンキナーゼ遺伝子をコードするDNAを送達するために用いられている。外来性遺伝子の発現が標的細胞中で検出された（Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274）。

50

## 【0198】

リポソーム組成物の主要なタイプの1つは、天然由来のホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)またはジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)から形成され得る。アニオン性リポソーム組成物は一般に、ジミリストイルホスファチジルグリセロールから形成され、一方でアニオン性融合性リポソームは主に、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)から形成される。他のタイプのリポソーム組成物は例えば、ダイズPCおよび卵PCなどのホスファチジルコリン(PC)から形成される。他のタイプは、リン脂質および/またはホスファチジルコリンおよび/またはコレステロールの混合物から形成される。

10

## 【0199】

幾つかの研究では、リポソーム薬物製剤の皮膚への局所的送達を評価している。モルモットにインターフェロンを含むリポソームを適用した結果、皮膚ヘルペスのはれものが減少したが、一方、他の手段による(例えば、溶液としてまたはエマルジョンとしての)インターフェロンの送達は効果がなかった(Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410)。さらに、リポソーム製剤の一部として投与されたインターフェロンから水性の系を用いたインターフェロンの投与まで、さらなる研究によって有効性が試験され、リポソーム製剤が水性系投与よりも優れていると結論づけた(du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265)。

20

## 【0200】

非イオン性リポソーム系、特に非イオン性界面活性剤およびコレステロールを含む系も試験され、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を決定した。Novasome(商標)I(グリセリルジラウレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)およびNovasome(商標)II(グリセリルジステアレート/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル)を含む非イオン性リポソーム製剤が用いられ、マウスの皮膚の真皮にシクロスポリン-Aを送達した。その結果、非イオン性リポソーム系が皮膚の異なる層へのシクロスポリン-Aの堆積を促進するのに有効であることが示された(Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466)。

## 【0201】

リポソームはまた、「立体的に安定化した」リポソームを含み、該用語は、本明細書で用いられる場合、1以上の特殊化された脂質を含むリポソームを指し、これがリポソーム中に取り込まれたとき、そのような特殊化された脂質を欠くりポソームと比べて増強された循環寿命をもたらす。立体的に安定化したリポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、(A)モノシアロガングリオシド $G_{M1}$ のような1以上の糖脂質を含むものであるか、または(B)ポリエチレングリコール(PEG)部分のような1以上の親水性ポリマーで誘導体化されたものである。いずれの特定の理論によっても制約されることがないが、当該分野では、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、またはPEG-誘導体化脂質を含む立体的に安定化したリポソームについては少なくとも、これらの立体的に安定化したリポソームの増強した循環寿命は、細網内皮系(RES)の細胞への取り込みの減少に由来すると考えられる(Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765)。

30

40

## 【0202】

1以上の糖脂質を含む種々のリポソームが当該分野で知られている。Papahadjopoulosら(Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64)は、モノシアロガングリオシド $G_{M1}$ 、硫酸ガラクトセレブロシドおよびホスファチジリンシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力を報告した。これらの発見は、Gabizonらにより解説された(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949)。米国特許第4,837,028号およびWO88/04924(何れもAllenら)は、(1)スフィンゴミエリンと、(2)ガングリオシド $G_{M1}$ または硫酸ガラクトセレブロシドエステルとを含むリポソームを開示している。米国特許第5,543,152号(Webbら)は、スフィンゴミエリンを含むリポソーム

50

を開示している。1,2-sn-ジミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームが、WO 97/13499 (Limら) に開示されている。

#### 【0203】

一以上の親水性ポリマーで誘導体化した脂質を含む多くのリポソームおよびそれらの調製方法は当該分野で知られている。Sunamotoら (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) は、PEG部分を含む、非イオン性洗浄剤 2C<sub>12</sub>15G を含むリポソームを開示した。Illumら (FEBS Lett., 1984, 167, 79) は、高分子グリコールによるポリスチレン粒子の親水性コーティングが血中半減期を著しく増大させたことを記述した。ポリアルキレングリコール (例えば PEG) のカルボン酸基の付加による合成リン脂質修飾が、Sears (米国特許第4,426,330号および同第4,534,899号) によって開示されている。Klibanovら (FEBS Lett., 1990, 268, 235) は、PEGまたはPEGステアレートで誘導体化したホスファチジルエタノールアミン (PE) を含むリポソームが、血中循環半減期を著しく増大させたことを実証する実験を開示した。Blumeら (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) は、そのような観察を、他のPEG-誘導体化リン脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSE) およびPEGの組み合わせから形成されたDSE-PEGに拡張した。それらの外側表面上のPRG部分に共有結合を有するリポソームは、欧州特許EP 0 445 131 B1およびWO 90/04384 (Fisher) に開示されている。PEGで誘導体化したPEを1~20モルパーセント含むリポソーム組成物、およびそれらの使用方法が、Woodleら (米国特許第5,013,556号および同第5,356,633号) およびMartinら (米国特許第5,213,804号および欧州特許EP 0 496 813 B1) によって開示されている。他の多くの脂質-ポリマー接合体を含むリポソームが、WO 91/05545および米国特許第5,225,212号 (何れもMartinら) およびWO 94/20073 (Zalipskyら) に開示されている。PEG-修飾セラミド脂質を含むリポソームが、WO 96/10391 (Choiら) に開示されている。米国特許第5,540,935号 (Miyazakiら) および同第5,556,948号 (Tagawaら) は、それらの表面において機能的部分によりさらに誘導体化されることができる、PEG-含有リポソームを開示している。

10

20

#### 【0204】

当該分野で知られている核酸を含むリポソームの数は限定されている。WO 96/40062 (Thierryら) は、リポソーム中に高分子量の核酸を被包する方法を開示している。米国特許第5,264,221号 (Tagawaら) は、タンパク質が結合したリポソームを開示しており、そのようなリポソームの内容物がアンチセンスRNAを含み得ることを主張している。米国特許第5,665,710号 (Rahmanら) は、リポソーム中にオリゴデオキシヌクレオチドを被包する方法を開示している。WO 97/04787 (Loveら) は、raf遺伝子を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むリポソームを開示している。

30

#### 【0205】

トランスファーソーム (Transfersomes) はさらに別のタイプのリポソームであり、高度に変形し得る脂質凝集であり、これは薬物送達のビヒクルの魅力的な候補である。トランスファーソームは、それらが液滴よりも小さい穴を通して容易に透過できるように高度に変形しやすい脂質液滴として述べることができる。トランスファーソームは、それらが用いられる環境に適応し、例えば自己最適化し (皮膚の穴の形状に適応する)、自己修復し、往々にして断片化することなくそれらの標的に到達し、また自動装填する (self-loading) ことが多い。トランスファーソームを作るために、表面エッジ活性化因子、通常は界面活性剤を、標準的なリポソーム組成物に添加することが可能である。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚に送達するために用いられている。トランスファーソームが媒介する血清アルブミンの送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同等に有効であることが示されている。

40

#### 【0206】

界面活性剤は、エマルション (マイクロエマルションを含む) およびリポソームなどの

50

製剤中での広い適用が見出されている。天然および合成のいずれにおいても、多くの異なるタイプの界面活性剤の性質を分類および順位付けする最も一般的な方法は、親水-親油平衡(HLB)の使用による。親水性基(「頭部(head)」としても既知)の性質は、製剤中で用いられる異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手法を提供する(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

#### 【0207】

界面活性剤分子がイオン化されていない場合、それは非イオン性界面活性剤に分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬および化粧品製品における広範な適用が見出されており、広い範囲のpH値に亘って使用に適している。一般にそれらのHLB値は、それらの構造に依存して2~約18である。非イオン性界面活性剤は、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、およびエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルを含む。脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、およびエトキシ化/プロポキシ化ブロックポリマーなどの非イオン性アルカノールアミドおよびエーテルも、この分類に含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤の分類の最も普及したものである。

10

#### 【0208】

界面活性剤分子が水に溶解または分散した場合に負の電荷を持つとき、その界面活性剤はアニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤は、石鹼のようなカルボキシレート、アシルラクチネート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸アルキルおよびエトキシ化硫酸アルキルのような硫酸のエステル、アルキルベンゼンスルホネートなどのスルホネート、アシルイセチオネート、アシルタウレートおよびスルホサクシネート、およびホスホネートを含む。アニオン性界面活性剤の分類の最も重要なものは、硫酸アルキルおよび石鹼である。

20

#### 【0209】

界面活性剤分子が、水に溶解または分散した場合に正の電荷を持つとき、その界面活性剤はカチオン性に分類される。カチオン性界面活性剤は、四級アンモニウム塩およびエトキシ化アミンを含む。四級アンモニウム塩は、この分類で最も使用されているものである。

30

#### 【0210】

界面活性剤分子が正電荷または負電荷の何れかを保持する能力を有する場合、その界面活性剤は、両性として分類される。両性界面活性剤は、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタインおよびホスファチドを含む。

#### 【0211】

薬剤生成物、製剤およびエマルションにおける界面活性剤の使用が報告されている(Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285)。

#### 【0212】

##### 浸透促進剤

一実施形態において、本発明は、核酸、特にオリゴヌクレオチドの動物の皮膚への効率的な送達を達成する様々な浸透促進剤を使用する。ほとんどの薬剤は、イオン化および非イオン化の両形態にて溶液中に存在する。しかしながら、通常、脂溶性または親油性薬剤のみが細胞膜を容易に通過する。通過させようとする膜を浸透促進剤で処理することで、非親油性薬剤でさえ細胞膜を通過し得ることがわかっている。浸透促進剤は、細胞膜を介した非親油性薬剤の拡散を助けることに加えて、さらに親油性薬剤の透過性を増強する。

40

#### 【0213】

浸透促進剤は、5つの大まかなカテゴリー、すなわち界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート化非界面活性剤の1つに属すと分類してよい(Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92)。浸透促進剤の

50

上記分類のそれぞれについて、以下に詳述する。

【0214】

界面活性剤：本発明に関して、界面活性剤（または「表面 - 活性剤」）とは、水溶液に溶解した場合に溶液の表面張力または水溶液とその他の液体との間の界面張力を減少させ、その結果、粘膜を通したオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化学物質である。胆汁酸塩および脂肪酸に加えて、これらの浸透促進剤は、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルを含み (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92); および FC - 43 などの過フルオロ化合物エマルジョンを含む (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252)。

10

【0215】

脂肪酸：浸透促進剤として機能する様々な脂肪酸およびそれらの誘導体は、例えばオレイン酸、ラウリン酸、カプリン酸 (n - デカン酸)、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、ジカプレート、トリカプレート、モノオレイン (1 - モノオレオイル - rac - グリセロール)、ジラウリン、カプリル酸、アラキドン酸、グリセロール 1 - モノカプレート、1 - ドデシルアザシクロヘプタン - 2 - オン、アシルカルニチン、アシルコリン、それらの C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキルエステル (例えばメチル、イソプロピルおよび t - ブチル) 並びにそれらのモノ - およびジ - グリセリド (即ち、オレアート、ラウレート、カプレート、ミリステート、パルミテート、ステアレート、リノレエート等) を含む (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654)。

20

【0216】

胆汁酸塩：胆汁の生理的役割は、脂質および脂溶性ビタミンの分散および吸収の促進を含む (Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935)。様々な天然の胆汁酸塩およびそれらの合成的誘導体は浸透促進剤として作用する。したがって、「胆汁酸塩」の語は、胆汁の天然由来のいずれかの成分並びにそれらの合成的誘導体のいずれかを含む。本発明の胆汁酸塩は、例えば、コール酸 (またはその薬学的に許容されるナトリウム塩、コール酸ナトリウム)、デヒドロコール酸 (デヒドロコール酸ナトリウム)、デオキシコール酸 (デオキシコール酸ナトリウム)、グルコール酸 (glucolic acid) (グルコール酸ナトリウム)、グリコール酸 (glycolic acid) (グリコール酸ナトリウム)、グリコデオキシコール酸 (グリコデオキシコール酸ナトリウム)、タウロコール酸 (タウロコール酸ナトリウム)、タウロデオキシコール酸 (タウロデオキシコール酸ナトリウム)、ケノデオキシコール酸 (ケノデオキシコール酸ナトリウム)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、タウロ - 24, 25 - ジヒドロ - フシジン酸ナトリウム (STDHF)、グリコジヒドロフシジン酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル (POE) を含む (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583)。

30

40

【0217】

キレート剤：本発明に関して使用されるキレート剤とは、金属イオンと複合体を形成することで、それらを溶液から除去し、その結果、粘膜を通したオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化合物として定義できる。本発明における浸透促進剤としてのそれらの使用に関して、キレート剤は、DNase 阻害剤としても働くという更なる利点を有する。これは、この最も特徴づけられた DNA ヌクレアーゼが、触媒作用のために二価金属イオンを必要とし、したがってキレート剤によって阻害されるためである (Jarrett, *J. Chromato*

50

gr., 1993, 618, 315-339)。本発明のキレート剤は、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA)、クエン酸、サリチレート (例えばサリチル酸ナトリウム、5-メトキシサリチレートおよびホモバニリエート)、コラーゲンのN-アシル誘導体、ラウレス-9およびベータ-ジケトンのN-アミノアシル誘導体 (エナミン) を含むが、これらに限定されない (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51)。

#### 【0218】

非キレート化非界面活性剤：ここに使用される非キレート化非界面活性浸透促進化合物とは、キレート剤または界面活性剤として微々たる活性を示すものの、それでもなお消化性粘膜を介したオリゴヌクレオチドの吸収を増強する化合物として定義できる (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33)。この分類の浸透促進剤は例えば、不飽和環状尿素、1-アルキル-および1-アルケニルアザシクロ-アルカノン誘導体 (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92)；並びに非ステロイド性抗炎症剤、例えばジクロフェナクナトリウム、インドメタシンおよびフェニルブタゾンなどを含む (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626)。

#### 【0219】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを増強する薬剤も、本発明の医薬組成物およびその他の組成物に加えてよい。例えば、カチオン性脂質、例えばリポフェクチン (Junichi et al., U.S. Pat. No. 5,705,188)、カチオン性グリセロール誘導体、およびポリカチオン性分子、例えばポリリシンなど (Lollo et al., PCT Application WO 97/30731) もまた、オリゴヌクレオチドの細胞の取り込みを増強することが知られている。

#### 【0220】

その他の薬剤は、投与された核酸の透過を増強するために利用されてよく、グリコール、例えばエチレングリコールおよびプロピレングリコールなど、ピロール、例えば2-ピロール、アゾン (azones) およびテルペン、例えばリモネンおよびメントンなどを含む。

#### 【0221】

その他の成分

本発明の組成物は、医薬組成物において慣習的に見られるその他の補助成分を、それらの分野で確立された使用濃度でさらに含んでよい。したがって、例えば組成物は、付加的で適合性のある医薬活性物質、例えば鎮痛薬、収れん剤、局所麻酔薬もしくは抗炎症剤を含んでよく、または本発明の組成物の様々な剤形を物理的に処方するのに有用な更なる材料、例えば色素、香料、防腐剤、酸化防止剤、乳白剤、増粘剤および安定剤を含んでよい。しかしながら、そのような材料は、添加された場合に、本発明の組成物の成分の生物学的活性を過度に妨げてはならない。製剤は殺菌でき、必要であれば助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧を調製するための塩類、緩衝剤、着色剤、調味料および/または芳香剤および製剤の核酸と有害に相互作用しない同様のものと混合することができる。

#### 【0222】

水性懸濁剤は、懸濁剤の粘性を増大する物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含んでよい。懸濁剤はさらに安定剤を含んでよい。

#### 【0223】

本発明のある実施形態は、(a) 1以上のアンチセンス化合物、および(b) 非アンチセンス機構により機能する1以上のその他の化学療法剤を含む医薬組成物を提供する。そのような化学療法剤の例は、ダウノルピシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、エソルピシン、プレオマイシン、マフォスファミド、イフォスファミド、シトシンアラビノシド、ビス-クロロエチルニトロソウレア

10

20

30

40

50

、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブチル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシパーオキシシクロホスホロアミド、5-フルオロウラシル(5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン(5-FUdR)、メトトレキサート(MTX)、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド(VP-16)、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタピン、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール(DES)を含むが、これらに限定されない。一般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J.を参照されたい。本発明の化合物と共に使用される場合、そのような化学療法剤は、個々に使用してよく(例えば5-FUおよびオリゴヌクレオチド)、連続して使用してよく(例えば5-FUおよびオリゴヌクレオチドの一定期間後、MTXおよびオリゴヌクレオチド)、または1以上のその他のそのような化学療法剤と組み合わせて使用してよい(例えば5-FU、MTXおよびオリゴヌクレオチド、または5-FU、放射線療法およびオリゴヌクレオチド)。非ステロイド系抗炎症薬および副腎皮質ステロイドを含むがこれらに限定されない抗炎症性薬剤、ならびにリバビリン(ribovirin)、ピダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルを含むがこれらに限定されない抗ウイルス剤を、本発明の組成物において組み合わせてよい。一般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N. J.の2499-2506頁および46-49頁をそれぞれ参照されたい。その他の非アンチセンス化学療法剤もまた本発明の範囲内である。2以上の組み合わせた化合物を、一緒にまたは連続して使用してよい。別の関連する実施形態において本発明の組成物は、第1の核酸を標的とする1つ以上のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第2の核酸標的を標的とする1つ以上のさらなるアンチセンス化合物を含んでよい。アンチセンス化合物の多数の例が当該分野において既知である。2以上の組み合わせた化合物を、一緒にまたは連続して使用してよい。

10

20

#### 【0224】

30

本発明に従って使用されるアンチセンス化合物は、固相合成法の周知技術によって好都合に且つ慣例的に作製してよい。そのような合成のための装置は、例えばアプライドバイオシステムズ(カリフォルニア、フォスターシティ)を含む幾つかのベンダーにより販売されている。当該分野において既知のそのような合成のための他のいずれかの手段を、追加的にまたは代替的に使用してよい。同様の技術を使用して、オリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオネートおよびアルキル化誘導体などを作製することが周知である。

#### 【0225】

本発明のアンチセンス化合物は、インビトロで合成され、生物由来のアンチセンス組成物、またはアンチセンス分子のインビボ合成を行うように設計された遺伝的ベクター構築物を含まない。本発明の化合物は、取り込み、分散および/または吸収を助けるためのその他の分子、分子構造または化合物混合物、例えば、リボソーム、受容体標的分子、経口製剤、直腸製剤、局所製剤またはその他の製剤に混合し、それらで被包し、それらに抱合し、またはほかの分子と結合してよい。そのような取り込み、分布および/または吸収を助ける製剤の作製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第5,108,921号;第5,354,844号;第5,416,016号;第5,459,127号;第5,521,291号;第5,543,158号;第5,547,932号;第5,583,020号;第5,591,721号;第4,426,330号;第4,534,899号;第5,013,556号;第5,108,921号;第5,213,804号;第5,227,170号;第5,264,221号;第5,356,633号;第5,395,619号;第5,416,016号;第5,417,978号;第5,462,854号;第

40

50



5, 469, 854号;第5, 512, 295号;第5, 527, 528号;第5, 534, 259号;第5, 543, 152号;第5, 556, 948号;第5, 580, 575号;および第5, 595, 756号を含むがこれらに限定されず、これらはそれぞれ本願に援用される。

【0226】

一定の徴候

アンチセンスの特異性および感受性もまた、治療的使用のため当業者に利用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物および人において疾患状態の治療における治療成分として使用されてきた。リボザイムを含むアンチセンスオリゴヌクレオチド薬剤は、ヒトに対して安全且つ有効に投与されており、多数の臨床試験が現在進行中である。したがってオリゴヌクレオチドは、細胞、組織および動物、特にヒトの治療のための治療措置に有用であるように構成可能な有用な治療手段であり得るということが確立されている。

10

【0227】

本発明のある実施形態において、CTGFの発現に関連する疾患または症状を治療する方法が提供され、ここにおいて当該疾患は癌を含む過剰増殖促進性疾患であり、当該癌は、乳癌、前立腺癌、腎臓癌、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌および多発性骨髄腫癌である(Pickles M and Leask A, J Cell Commun Signal. 2007 Sep;1(2):85-90. Epub 2007 Jul 17; Mullis T.C., Tang X., Chong K.T., J Clin Pathol. 2008 May;61(5):606-10; Liu L.Y., et al. World J Gastroenterol. 2008 Apr 7;14(13):2110-4; Chintalapudi M.R., et al., Carcinogenesis. 2008 Apr;29(4):696-703. Epub 2008 Jan 22; Munemasa S., et al. Br J Haematol. 2007 Oct;139(1):41-50; Shimo T., et al. J Bone Miner Res. 2006 Jul;21(7):1045-59; およびYang F., et al. Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8887-95が参照される)。

20

【0228】

本発明の一実施形態において、方法は疾患または症状を治療することを含み、ここにおいて疾患または障害は線維性疾患である。本発明の方法の一実施形態において線維性疾患は、肥厚性瘢痕、ケロイド、皮膚瘢痕、肝線維症、肺線維症、腎線維症、心臓線維症または再狭窄である。

【0229】

本発明の別の実施形態において、方法は上述の疾患または症状を治療することをさらに含み、ここにおいて疾患または障害は、関節線維症(凍結肩症候群、腱および末梢神経損傷を含む)、脊髄損傷、冠状動脈バイパス、腹部および腹膜癒着(子宮内膜症、子宮平滑筋腫および子宮筋腫を含む)、放射状角膜切除術およびレーザー屈折矯正角膜切除術、網膜復位術、装置介在線維症(例えば糖尿病におけるもの)、腱癒着、デュブイトラン拘縮または硬皮症である。

30

【0230】

さらに本発明の別の実施形態は、その必要のある対象において皮膚の創傷治癒に起因する肥厚性瘢痕を減少させる方法であって、前記対象において結合組織成長因子(CTGF)の発現を阻害するのに有効な量のアンチセンスオリゴヌクレオチドの化合物を前記対象に投与し、これにより前記対象において創傷治癒からの瘢痕を減少させることを含む方法を提供する。前記対象はヒトまたはヒトを除く動物を含んでよい。

40

【0231】

治療用組成物の処方およびその後の投与は、当該分野の技術の範囲内であると考えられる。投与は、数日から数か月または治療が達成されるまでもしくは疾患状態の減少が達成されるまで継続する治療過程にて、治療すべき疾患状態の重症度および応答性に依存する。最適な投与計画は、患者の身体における薬剤蓄積の測定から計算することができる。当業者は、最適用量、投与方法および反復率を容易に決定することができる。最適用量は、各々のオリゴヌクレオチドの相対的力価に依存して変化してよく、一般にインビトロおよびインビボの動物モデルにおいて有効であると見出されたEC<sub>50</sub>に基づき決定され得る。一般に用量は、体重1kg当り0.01μgから100gであり、1日に、週に、月に

50

もしくは年に1回以上投与されてよく、または2～20年に1度投与されてもよい。当業者は、体液または組織における薬剤の滞在時間および濃度の測定結果に基づいて、投与のための反復率を容易に推定できる。良好な治療の後、患者は疾患状態の再発を妨げるために維持療法を受けることが望ましいこともあり、ここにおいてオリゴヌクレオチドは、体重1kg当たり0.01μgから100gまでの維持用量で、1日に1回以上～20年に1度投与される。

【0232】

本発明の別の実施形態において、方法はさらに、皮膚の創傷治癒に起因する肥厚性瘢痕を減少することを含み、ここにおいて創傷治癒は皮膚切断、外科的切開および火傷から成る群より選択される創傷における治癒である。

10

【0233】

ある実施形態において本発明は、本発明の1以上の医薬組成物を投与することを含む、個体の治療方法を提供する。ある実施形態において個体は、上述の障害の1つを有している。ある実施形態において個体は、上述の障害の1つのリスクを有する。ある実施形態において個体は、治療の必要があると確認されている。ある実施形態において本発明は、個体におけるCTGF発現を予防的に低下させる方法を提供する。

【0234】

ある実施形態は、CTGF核酸を標的とする治療的有効量のアンチセンス化合物を個体へ投与することによる、その必要のある個体の治療を含む。

20

【0235】

一実施形態において、CTGF核酸を標的とするアンチセンス化合物の治療的有効量の投与には、個体の血清中のCTGF濃度のモニタリングにより、アンチセンス化合物の投与に対する個体の反応を決定することを伴う。アンチセンス化合物の投与に対する個体の反応は、治療の介入の量および継続期間を決定するために内科医により利用される。

【0236】

一実施形態において、CTGF核酸を標的とするアンチセンス化合物の投与は、少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%、またはこれらの値のうちいずれか2つによって定義される範囲でCTGF発現の減少をもたらす。一実施形態において、CTGF核酸を標的とするアンチセンス化合物の投与は、標準試験によって測定されるCTGFの基準（例えばCTGF、但しこれに限定されない）の変化をもたらす。いくつかの実施形態において、CTGFアンチセンス化合物の投与は、少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%、またはこれらの値のうちいずれか2つによって定義された範囲で基準を増大させる。いくつかの実施形態において、CTGFアンチセンス化合物の投与は、少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%、またはこれらの値のうちいずれか2つによって定義された範囲で基準を減少させる。

30

【0237】

ある実施形態において、CTGFを標的とするアンチセンス化合物を含む医薬組成物は、上述した障害のうちいずれか1つを患うまたはその疑いのある患者を治療するための薬剤の製造に使用される。

40

【0238】

一定の併用療法

ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物は1以上の他の医薬品と同時投与される。ある実施形態において、そのような1以上の他の医薬品は、本発明の1以上の医薬組成物と同一の疾患または症状を治療するように設計されている。ある実施形態において、そのような1以上の他の医薬品は、本発明の1以上の医薬組成物とは異なる疾患または症状を治療するように設計されている。ある実施形態において、そのような1以上の他の医薬品は、本発明の1以上の医薬組成物の望ましくない効果を治療するように設計されて

50

いる。ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物は、当該他の医薬品の望まれない効果を治療するために、別の医薬品と同時投与される。ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物および1以上の他の医薬品は同時に投与される。ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物および1以上のその他の医薬品は異なる時に投与される。ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物および1以上の他の医薬品は、単一の製剤において一緒に処方されている。ある実施形態において、本発明の1以上の医薬組成物および1以上の他の医薬品は、別々に処方されている。

**【0239】**

ある実施形態において、本発明の医薬組成物と同時投与してよい医薬品は第2治療薬を含む。あるそのような実施形態において、本発明の医薬組成物と同時投与してよい医薬品は第2治療薬を含むがこれに限定されない。あるそのような実施形態において、第2治療薬は本発明の医薬組成物の投与に先立って投与される。あるそのような実施形態において、第2治療薬は、本発明の医薬組成物の投与の後に投与される。あるそのような実施形態において、第2治療薬は本発明の医薬組成物と同時に投与される。あるそのような実施形態において、同時投与される第2治療薬の用量は、第2治療薬を単独で投与する場合と同じ用量である。あるそのような実施形態において、同時投与される第2治療薬の用量は、第2治療薬を単独で投与する場合よりも低い用量である。あるそのような実施形態において、同時投与される第2治療薬の用量は、第2治療薬を単独で投与する場合よりも高い用量である。

10

**【0240】**

ある実施形態において、第2化合物の同時投与は、第1化合物の治療効果を増強し、化合物の同時投与は、第1化合物を単独で投与する効果より大きな治療効果（相乗効果）をもたらす。他の実施形態において同時投与は、単独で投与された場合の化合物の効果が付加された治療効果をもたらす。他の実施形態において同時投与は、単独で投与された場合の化合物の効果を越える効果が付加された治療効果をもたらす。いくつかの実施形態において、第1化合物はアンチセンス化合物である。いくつかの実施形態において、第2化合物はアンチセンス化合物である。

20

**【0241】**

本発明は、以下の実験の詳細の部分において例証される。この部分は、本発明の理解を助けるために説明されるが、添付される特許請求の範囲に係る発明を限定することを意図しておらず、且つそのように解釈してはならない。

30

**【実施例】****【0242】**

実施例1：細胞培養およびアンチセンス化合物治療

CTGF核酸の濃度、活性または発現に対するアンチセンス化合物の効果を、様々な細胞種においてインビトロで試験できる。前記分析に使用する細胞種は、商用ベンダー（例えば、American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD）から入手可能であり、細胞は市販の試薬を用いて、ベンダーの説明書に従って培養される（例えば、Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）。例となる細胞種は、HepG2細胞、Hep3B細胞および一次肝細胞を含むが、これらに限定されない。

40

**【0243】**

実施例2：アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ実験

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる細胞の治療方法がここに記載され、その他のアンチセンス化合物による治療のために適切に改変され得る。

**【0244】**

一般に、細胞が培養液において約60～80%の集密度に達したとき、細胞はアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理される。

**【0245】**

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために一般的に使用される1つ

50

の試薬は、陽イオン性脂質トランスフェクション試薬 L I P O F E C T I N (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM (登録商標) 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で L I P O F E C T I N (登録商標) と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の終濃度、および典型的には 1 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチド当り 2 から 1 2 μ g / m L である L I P O F E C T I N (登録商標) 濃度を達成する。

【0246】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の試薬は、L I P O F E C T A M I N E (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM (登録商標) 1 血清低下培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中で L I P O F E C T A M I N E (登録商標) と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度、および典型的には 1 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチド当り 2 から 1 2 μ g / m L である L I P O F E C T A M I N E (登録商標) 濃度が達成される。

10

【0247】

細胞は慣行的な方法によりアンチセンスオリゴヌクレオチドによって処理される。細胞は典型的に、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理の 1 6 ~ 2 4 時間後に収集され、このとき標的核酸の R N A またはタンパク質の濃度は、当該分野において既知であり且つここに記載される方法によって測定する。一般に、複数の反復試験において処理が行なわれる場合、データは複数の処理の平均として示される。

20

【0248】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は細胞株ごとに変えられる。特定の細胞株に最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を決定する方法は、当該分野で周知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは典型的に、1 n M ~ 3 0 0 n M の濃度で用いられる。

【0249】

実施例 3 : R N A 単離

R N A 分析は全細胞 R N A またはポリ ( A ) + m R N A について行なうことができる。R N A 単離の方法は当該分野で周知である。R N A は、当該分野で周知の方法を用い、例えば製造者の推奨するプロトコールに従って T R I Z O L (登録商標) 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて調製される。

30

【0250】

実施例 4 : 標的の濃度または発現阻害の分析

C T G F 核酸の濃度または発現の阻害は、当該技術にて既知の様々な方法によって分析し得る。例えば標的核酸濃度は、例えばノーザンプロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) または定量的リアルタイム P C R により定量し得る。R N A 分析は、全細胞 R N A またはポリ ( A ) + m R N A について行なうことができる。R N A の単離方法は当該分野で周知である。さらに、ノーザンプロット解析は当該分野慣行的なものである。定量的リアルタイム P C R は、A B I P R I S M (登録商標) 7 6 0 0、7 7 0 0 または 7 9 0 0 配列決定システム (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を説明書に従って用いることで都合よく達成できる。

40

【0251】

実施例 5 : 標的 R N A 濃度の定量的リアルタイム P C R 分析

標的 R N A 濃度の定量は、A B I P R I S M (登録商標) 7 6 0 0、7 7 0 0 または 7 9 0 0 配列決定システム (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) を説明書に従って用いて定量的リアルタイム P C R により都合よく達成され得る。定量的リアルタイム P C R の方法は当該分野で周知である。

【0252】

リアルタイム P C R に先立って、単離した R N A を逆転写酵素 ( R T ) 反応に供し、相補的 D N A ( c D N A ) を生成し、それをリアルタイム P C R 増幅のための基質として使

50

用する。RTおよびリアルタイムPCRの反応は、同一サンプルウェルにて連続して行なわれる。RTおよびリアルタイムPCRの試薬はInvitrogen (Carlsbad, CA) から入手される。RT、リアルタイムPCR反応は当業者に周知の方法によって行なわれる。

#### 【0253】

リアルタイムPCRによって得られた遺伝子（またはRNA）標的量は、サイクロフィリンAのようにその発現が一定である遺伝子の発現濃度を使用して、またはRIBOGREEN（登録商標）(Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)を用いて全RNAを定量することで標準化される。サイクロフィリンAの発現は、標的と同時に、多重化して、または別々に行うことでリアルタイムPCRにより定量化される。全RNAはRIBOGREEN（登録商標）RNA定量試薬（Invitrogen, Inc. Eugene, OR）を使用して定量化される。RIBOGREEN（登録商標）によるRNA定量法はJones, L.J.らが教示している（Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374）。CYTOFLUOR（登録商標）4000機器（PE Applied Biosystems）を使用して、RIBOGREEN（登録商標）蛍光を測定する。

10

#### 【0254】

プローブおよびプライマーは、CTGF核酸にハイブリダイズするように設計されている。リアルタイムPCRプローブおよびプライマーを設計する方法は当該分野で周知であり、例えばPRIMER EXPRESS（登録商標）ソフトウェア（Applied Biosystems, Foster City, CA）などのソフトウェアの使用を含んでよい。

20

#### 【0255】

##### 実施例6：タンパク質濃度の分析

CTGF核酸のアンチセンス阻害はCTGFタンパク質濃度の測定により評価可能である。CTGFタンパク質濃度は、当該分野で周知の種々の方法、例えば免疫沈殿、以下実施例9に記載のウェスタンブロット分析（免疫ブロット）、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ（ELISA）、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えばカスパーゼ活性アッセイ）、免疫組織化学、免疫細胞化学または蛍光活性化細胞分類（FACS）にて評価または定量化可能である。標的に対する抗体は、種々のソース、例えば抗体のMSSカタログ（Aerie Corporation, Birmingham, MI）などから特定され且つ得ることができるか、あるいは当該分野で周知の従来モノクローナルまたはポリクローナル抗体産生方法によって作製することができる。ヒトおよびラットのCTGFの検出に有用な抗体は商業的に入手可能である。

30

#### 【0256】

##### 実施例7：アンチセンス化合物のインビボ実験

アンチセンス化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドを動物において試験し、CTGFの発現を阻害し且つ表現型の変化をもたらすそれらの能力を評価する。試験は正常な動物または実験的疾患モデルにおいて行なってよい。動物への投与のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドはリン酸緩衝生理食塩水のような薬学的に許容される希釈剤中で処方される。投与は、非経口の投与経路、例えば腹腔内、静脈内および皮下投与を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドの用量および投与頻度の計算は当業者の能力の範囲内であり、投与経路および動物の体重などの因子に依存する。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理期間の後、RNAを肝臓組織から単離し、CTGF核酸発現の変化が測定される。CTGFタンパク質濃度の変化もまた、実施例6にて記載した方法を使用して測定される。

40

#### 【0257】

実施例8：リードヒト結合組織成長因子（CTGF）アンチセンスオリゴヌクレオチドの候補の選択

##### 導入

本発明に従って、ヒト結合組織成長因子RNAの種々の領域を標的とするために、公表されている配列を使用して、一連のオリゴヌクレオチドを設計した（GenBank登録

50

番号 NM\_\_001901.2 : 配列番号 9、および GenBank 登録番号 NT\_\_025741.14 : 配列番号 10)。

【0258】

この研究は、利用可能な配列スペースおよび CTGF のエキソンおよびイントロンの両方のスペースを標的とする修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを分析する。1つの標的当たり約 150 の新規配列を合成し、細胞培養中での CTGF に対する活性を評価した。オリゴヌクレオチドは表 1 に示される。表 1 の全ての化合物は、20ヌクレオチド長のキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)であり、10の 2'-デオキシヌクレオチドからなる中央の「ギャップ」領域と、その両側(5'および3'方向)に隣接する5ヌクレオチドの「ウイング」とからなるか、または13の 2'-デオキシヌクレオチドとその両側(5'および3'方向)に隣接するそれぞれ2および5ヌクレオチドの「ウイング」とからなる。ウイングは、2'-メトキシエチル(2'-MOE)ヌクレオチドからなる。ヌクレオチド間(骨格)結合は、オリゴヌクレオチド全体にわたってホスホロチオネート(P=S)である。全てのシチジン(cytidine)残基は5-メチルシチジン(5-methylcytidines)である。化合物は、ヒト結合組織成長因子の mRNA 濃度に対する効果について、その他の実施例に記載されるような定量的リアルタイムPCRによって分析した。データは2つの実験結果の平均である。「N.D.」とは「データがない」ことを示す。

【表 1 - 1】

表 1

2'-MOE ウィングおよびデオキシギャップを有する  
キメラホスホロチオエートオリゴヌクレオチドによるヒト結合組織成長因子 mRNA レベルの阻害

ISIS 番号	領域	標的 配列番号	標的部位	配列	阻害%	配列 番号
124173	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	35	11
124189	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTTGA	57	12
124212	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	47	13
124235	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	47	14
124238	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTGGTCA	53	15
412271	5'-UTR	9	4	GGGAAGAGTGTGTGTGTGAG	0	16
412272	5'-UTR	9	38	AGGGTGGAGTCGCACTGGCT	46	17
412273	CDS	9	228	ACGAAGGCGACGCGGACGGG	35	18
412274	CDS	9	265	GCCGACGGCCGGCCGGCTGC	40	19
412275	CDS	9	475	GGTGCACACGCCGATCTTGC	52	20
412276	CDS	9	483	TCTTTGGCGGTGCACACGCC	0	21
412277	CDS	9	489	GCACCATCTTTGGCGGTGCA	0	22
412278	CDS	9	496	GCAGGGAGCACCATCTTTGG	16	23
412279	CDS	9	501	AAGATGCAGGGAGCACCATC	63	24
412280	CDS	9	507	CCACCGAAGATGCAGGGAGC	0	25
412281	CDS	9	512	CCGTACCACCGAAGATGCAG	47	26
412282	CDS	9	553	GTACTTGCAGCTGCTCTGGA	68	27
412283	CDS	9	592	GGGCATGCAGCCACCGCCC	72	28
412284	CDS	9	718	AGGCCAACCACGGTTTGGT	59	29
412285	CDS	9	723	AGGGCAGGCCCAACCACGGT	79	30
412286	CDS	9	732	TAAGCCGCGAGGGCAGGCC	55	31
412287	CDS	9	829	CCCACAGTCTTGAACAGG	30	32
412288	CDS	9	839	AGATGCCCATCCCACAGGTC	55	33
412289	3'-UTR	9	1273	CCAGTCTAATGAGTTAATGT	56	34
412290	3'-UTR	9	1281	TTCAAGTCCAGTCTAATGA	10	35
412291	3'-UTR	9	1361	TTTTCCCCAGTTAGAAAAA	38	36
412292	3'-UTR	9	1388	CACAATGTTTGAATTGGGT	50	37
412293	3'-UTR	9	1394	ACATGGCACAAATGTTTGA	67	38
412294	3'-UTR	9	1399	GTTTGACATGGCACAATGTT	73	39
412295	3'-UTR	9	1404	TATTTGTTTGACATGGCACA	74	40
412296	3'-UTR	9	1412	TGATAGACTATTTGTTTGAC	35	41
412297	3'-UTR	9	1457	GTTCCACTGTCAAGTCTTAA	55	42
412298	3'-UTR	9	1469	TGTACTAATGTAGTTCCACT	69	43
412299	3'-UTR	9	1482	CATTCTGGTGTGTGACTA	86	44
412300	3'-UTR	9	1489	TAATATACATTCTGGTGCTG	76	45
412301	3'-UTR	9	1495	ACACCTTAATATACATTCTG	54	46
412302	3'-UTR	9	1502	TAAAGCCACACCTTAATATA	54	47
412303	3'-UTR	9	1520	GTACCCTCCACTGCTCCTA	53	48
412304	3'-UTR	9	1554	AAGATGCTATCTGATGATAC	52	49
412305	3'-UTR	9	1559	CGTATAAGATGCTATCTGAT	69	50
412306	3'-UTR	9	1577	AATAGCAGGCATATTACTCG	74	51
412307	3'-UTR	9	1586	TACACTCAAATAGCAGGCA	69	52
412308	3'-UTR	9	1591	TCAATTCACTTCAAATAGC	50	53
412309	3'-UTR	9	1659	GGAGAATGCACATCCTAGCT	66	54
412310	3'-UTR	9	1665	ATGGCTGGAGAATGCACATC	60	55

(続く)

【表 1 - 2】

(続き)

ISIS 番号	領域	標的 配列番号	標的部位	配列	阻害%	配列 番号
412311	3'-UTR	9	1670	TCTTGATGGCTGGAGAATGC	71	56
412312	3'-UTR	9	1729	GAATCAGAATGTCAGAGCTG	37	57
412313	3'-UTR	9	1946	CATTGAAATATCAAAGCATT	0	58
412314	3'-UTR	9	1952	GGCTAACATTGAAATATCAA	25	59
412315	3'-UTR	9	1958	AATTGAGGCTAACATTGAAA	1	60
412316	3'-UTR	9	1965	GTTCCAGAAATGAGGCTAAC	65	61
412317	3'-UTR	9	1971	TATGGTGTTCAGAAATTGAG	13	62
412318	3'-UTR	9	1976	CTACCTATGGTGTTCAGAAA	61	63
412319	3'-UTR	9	1982	TACATTCTACCTATGGTGT	38	64
412320	3'-UTR	9	1991	GACAAGCTTTACATTCTACC	24	65
412321	3'-UTR	9	1996	GATCAGACAAGCTTTACATT	37	66
412322	3'-UTR	9	2007	ATGCTTTGAACGATCAGACA	64	67
412323	3'-UTR	9	2012	ATTTTCATGCTTTGAACGATC	44	68
412324	3'-UTR	9	2018	GTATCCATTTTCATGCTTTGA	60	69
412325	3'-UTR	9	2026	CCATATAAGTATCCATTTCA	48	70
412326	3'-UTR	9	2032	GAATTTCCATATAAGTATCC	28	71
412327	3'-UTR	9	2040	TCTGAGCAGAATTTCCATAT	58	72
412328	3'-UTR	9	2050	TGTCATTCTATCTGAGCAGA	61	73
412329	3'-UTR	9	2060	TTTGACGGACTGTCATTCTA	47	74
412330	3'-UTR	9	2070	AACAATCTGTTTTCGACGGAC	48	75
412331	3'-UTR	9	2088	TGATGCCTCCCTTTGCAAA	53	76
412332	3'-UTR	9	2100	TGCCAAGGACACTGATGCCT	68	77
412333	3'-UTR	9	2105	CAGCCTGCCAAGGACACTGA	75	78
412334	3'-UTR	9	2110	GAAATCAGCCTGCCAAGGAC	60	79
412335	3'-UTR	9	2115	ACCTAGAAATCAGCCTGCCA	46	80
412336	3'-UTR	9	2120	TTCTACCTAGAAATCAGCC	51	81
412337	3'-UTR	9	2128	TACCACATTTCTACCTAGA	59	82
412338	3'-UTR	9	2134	TGAGGCTACCACATTTCTTA	0	83
412339	3'-UTR	9	2140	TAAAAGTGAGGCTACCACAT	48	84
412340	3'-UTR	9	2213	CAAATGCTTCCAGGTGAAA	49	85
412341	3'-UTR	9	2219	TAGAAACAAATGCTTCCAGG	66	86
412342	3'-UTR	9	2230	TCATATCAAAGTAGAAACAA	12	87
412343	3'-UTR	9	2242	TCCGAAAAACACTCATATCA	24	88
412368	Intron 1	10	1308	ACCCGGCTGCAGAGGGCGAG	0	89
412369	Intron 1	10	1313	CGCTTACCCGGCTGCAGAGG	0	90
412370	Intron 1	10	1410	GACAGGGCGGTCAGCGGCGC	0	91
412371	Intron 2	10	1730	AGTCCGAGCGGTTTCTTTTT	0	92
412372	Intron 2	10	1735	AACTCAGTCCGAGCGGTTTC	19	93
412373	Intron 2	10	1740	AAAGAACTCAGTCCGAGCGG	10	94
412374	Intron 2	10	1745	TGGAGAAAGAACTCAGTCC	45	95
412375	Intron 2	10	1750	GCAGCTGGAGAAAGAACTC	14	96
412376	Intron 2	10	1755	TGGCAGCAGCTGGAGAAAGA	46	97
412377	Intron 2	10	1887	AGGGAGCACCATCTTTGGCT	20	98
412378	Intron 3	10	2125	TCACCCGCGAGGGCAGGCC	33	99
412379	Intron 3	10	2137	GAAGACTCGACTCACCCGC	0	100
412380	Intron 3	10	2142	TTAGAGGAAGACTCGACTCA	0	101
412381	Intron 3	10	2150	ACCCTGACTTAGAGGAAGAC	47	102
412382	Intron 3	10	2155	TCACGACCCTGACTTAGAGG	31	103
412383	Intron 3	10	2160	GAGAATCACGACCCTGACTT	2	104
412384	Intron 3	10	2165	TGGGAGAGAAATCACGACCCT	31	105
412385	Intron 3	10	2170	CTCCCTGGGAGAGAATCACG	0	106
412386	Intron 3	10	2191	GGTCGGCACAGTTAGGACTC	53	107
412387	Intron 3	10	2196	CGTTCCGGTCGGCACAGTTAG	30	108
412388	Intron 3	10	2216	CCTGGATAAGGTATTTCCCC	0	109
412389	Intron 3	10	2235	ACAAACCCATGTAAAACGC	11	110

(続く)



【表 1 - 3】

(続き)

ISIS 番号	領域	標的 配列番号	標的部位	配列	阻害%	配列 番号
412390	Intron 3	10	2241	GAGCACACAAACACCATGTA	0	111
412391	Intron 3	10	2251	TGCGAGAGCAGAGCACACAA	0	112
412392	Intron 3	10	2256	TAAGCTGCGAGAGCAGAGCA	2	113
412393	Intron 3	10	2261	GTCGGTAAGCTGCGAGAGCA	23	114
412394	Intron 3	10	2266	TTCCAGTCGGTAAGCTGCGA	15	115
412395	Intron 4	10	2472	ACATGTACCTTAATGTTCTC	0	116
412396	Intron 4	10	2477	GCAGAACATGTACCTTAATG	0	117
412397	Intron 4	10	2482	TAGGAGCAGAACATGTACCT	9	118
412398	Intron 4	10	2487	GTTAATAGGAGCAGAACATG	19	119
412399	Intron 4	10	2496	TGAAAAATAGTTAATAGGAG	0	120
412400	Intron 4	10	2511	CCACTGTTTTTCTGTGAAA	10	121
412401	Intron 4	10	2525	AAGTTGGGTCTATCCACTG	28	122
412402	Intron 4	10	2530	GCCCTAAGTTGGGTCTATC	20	123
412403	Intron 4	10	2535	CAAGAGCCCTAAGTTGGGTC	0	124
412404	Intron 4	10	2540	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT	64	125
412405	Intron 4	10	2558	CGGGCTTATACTAACAAGCG	6	126
412406	Intron 4	10	2563	GATAACGGGCTTATACTAAC	33	127
412407	Intron 4	10	2568	TTGGAGATAACGGGCTTATA	73	128
412408	Intron 4	10	2573	TAGTTTTGGAGATAACGGGC	51	129
412409	Intron 4	10	2578	TTAGTAGTTTTGGAGATAA	24	130
412410	Intron 4	10	2584	CAATGGTTAGATAGTTTTGG	36	131
412411	Intron 4	10	2589	CAGCTCAATGGTTAGATAGT	53	132
412412	Intron 4	10	2594	CAAAACAGCTCAATGGTTAG	34	133
412413	Intron 4	10	2599	TCCAGCAAAACAGCTCAATG	59	134
412414	Intron 4	10	2604	CTCATTCCAGCAAAACAGCT	42	135
412415	Intron 4	10	2609	AAGCTCTCATTCCAGCAAAA	57	136
412416	Intron 4	10	2614	TACACAAGCTCTCATTCCAG	44	137
412417	Intron 4	10	2623	GGTTGCTATTACACAAGCTC	72	138
412418	Intron 4	10	2628	CTGGTGGTTGCTATTACACA	61	139
412419	Intron 4	10	2633	GAAAACGGTGGTTGCTATT	29	140
412420	Intron 4	10	2638	TAGTGGAAAACGGTGGTTG	5	141
412421	Intron 4	10	2663	TTAACTAACCTGTGGAAGA	15	142
412422	Intron 4	10	2672	TGTCTGAATTAACCTAACCC	4	143
412423	Intron 4	10	2677	TGGAATGTCTGAATTAACCT	0	144
412424	Intron 4	10	2691	GCCAGAGCCTCTCTTGAAT	36	145
412425	Intron 4	10	2698	AAAAATAGCCAGAGCCTCTC	59	146
412426	Intron 4	10	2703	TGTCCAAAAATAGCCAGAGC	28	147
412427	Intron 4	10	2708	TGCTATGTCCAAAAATAGCC	15	148
412428	Intron 4	10	2713	TCATTTGCTATGTCCAAAAA	28	149
412429	Intron 4	10	2718	GAGTCTCATTTGCTATGTCC	20	150
412430	Intron 4	10	2723	AGTTTGAGTCTCATTTGCTA	30	151
412431	Intron 4	10	2728	GAGGAAGTTTGAGTCTCATT	55	152
412432	Intron 4	10	2763	CCTCTGTTGCTGACTCTG	55	153
412433	Intron 4	10	2778	CCTCTGTGTTTGTAGTCTTCT	56	154
412434	Intron 4	10	2788	TTTCTTCAACCTCTGTGTT	15	155
412435	Intron 4	10	2796	GGAGTGGCTTTCTTCAACCC	43	156
412436	Intron 4	10	2849	AGGAAGACAAGGGAAAAGAG	20	157
412437	Intron 4	10	2854	TTCTAAGGAAGACAAGGGAA	0	158
412438	Intron 4	10	2859	TGCCCTTCTAAGGAAGACAA	31	159
412439	Intron 2	10	1791	GGATGCGAGTTGGGATCTGG	0	160
412440	CDS	9	380	CCAGCTGCTTGGCGCAGACG	64	161
412441	CDS	9	1003	GCCAGAAAGCTCAAACCTTGA	37	162
412442	3'-UTR	9	1783	CCACAAGCTGTCCAGTCTAA	32	163
412443	3'-UTR	9	2267	GGTCACACTCTCAACAAATA	59	164
412444	3'-UTR	9	2282	AAACATGTAACCTTTTGGTCA	55	165
418899	3'-UTR	9	1391	TGACATGGCACAATGTTTTG	ND*	166

\*ND-即ち、実験で決定されていないが、別のアッセイでは高い活性があった。

【0259】

表 1 に示される通り、配列番号 11 - 15、17 - 20、24、26 - 34、36 - 5

10

20

30

40

50

7、59、61、63 - 82、84 - 86、88、95、97、99、102、103、105、107、108、122、125、127 - 140、145、146、149、151 - 154、156、159、161 - 165は、このアッセイにおいて少なくとも24%のヒト結合組織成長因子の発現阻害を示し、それ故好ましい。これらの好ましい配列に相補的な標的部位は、ここにおいて「活性部位」と称し、それゆえ本発明の化合物より標的とされるための好ましい部位である。

#### 【0260】

アンチセンス化合物は、CTGF配列のヌクレオチドの範囲内、即ち、配列番号9のヌクレオチド718 - 751、1388 - 1423、1457 - 1689、2040 - 2069、2120 - 2147または2267 - 2301の範囲内で相補的である。ある実施形態において、アンチセンス化合物は配列番号10のヌクレオチド2728 - 2797の範囲内で相補的である。これらの範囲を標的とする化合物は、少なくとも50%の阻害を示す（即ち、配列番号15、29、31、42、46 - 49、53、72、81、82、152 - 154、164および165）。さらに、表1に示された一定の標的部位もまた、少なくとも50%の阻害を示す（即ち、配列番号12、20、33、34、76、107、129、132、134、136および146）。

10

#### 【0261】

ある実施形態においてアンチセンス化合物は、ヌクレオチド553 - 611、1394 - 1423、1469 - 1508、1559 - 1605、1659 - 1689または2100 - 2129の範囲内で相補的である。そこに標的とする化合物は、少なくとも60%の阻害を示す（即ち、配列番号27、38、43、50、52、54、55、77、79および86）。さらに、表1に示される一定の標的部位もまた、少なくとも60%の阻害を示す（即ち、配列番号24、61、63、67、69、73、125および161）。

20

#### 【0262】

さらに、アンチセンス化合物はヌクレオチド1399 - 1423の範囲内で相補的である。そこを標的とする化合物は、少なくとも70%の阻害を示す（即ち、配列番号39および40）。さらに、表1に示される一定の標的部位は、少なくとも70%の阻害を示す（即ち、配列番号28、30、45、51、56、78、128および138）。さらに、表1に示された1つの標的部位は、少なくとも80%の阻害を示す（即ち、配列番号44）。ある実施形態において、アンチセンス化合物が50nmの濃度でHuVEC細胞へ送達される場合、パーセント阻害が達成される。

30

#### 【0263】

これまでのASOリード配列（配列番号15（ISIS 124238））よりも大きな見かけ上の活性を示す複数のリードが、エキソンおよびイントロンの両方の配列において同定された。

#### 【0264】

高活性な9つの配列（配列番号28、30、39、40、45、52、56、78、125）における用量応答研究が完了した（図8参照）。配列番号13および15（ISIS 124212および124238）は、これまでに設計されたオリゴヌクレオチドであり、配列番号167（ISIS 141923、配列CCTTCCCTGA AGGTTCCTCC）はネガティブコントロールである。

40

#### 【0265】

##### 材料および方法

オリゴヌクレオチドは、リポフェクチンによるトランスフェクションを用い、ヒト臍静脈内皮細胞（HuVEC）において、濃度50nMでスクリーニングおよび確認された。Low Serum Growth Supplement（Cascade Biologics）が添加されたMedium 200中で維持されたHuVEC細胞（Cascade Biologics, Portland, OR）を、1ウェル当たり5,000個の細胞にて96-ウェルプレートに播種し、5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で一晩インキュベートした。翌日、培地を吸引し、Oligo-Lipofectamine 2000（Invitrogen）混合物を含む予め温めたOpti-M

50

EM I (Invitrogen) (1 ml の Opti-MEM I 培地当り、3 mg の Lipofectamine 2000) と交換した。4 時間後、トランスフェクション混合物を、Low Serum Growth Supplement を添加した新鮮な Medium 200 と交換し、5% の CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C でインキュベートした。16 ~ 24 時間後、約 80% の集密度において、細胞をリン酸緩衝液食塩水 (PBS) で洗浄し、Qiagen RNeasy Kit により RNA 精製のために溶解した。CTGF メッセージを、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) (下に示されるプライマー/プローブセット) により測定し、結果を全 RNA に対して標準化した。

#### 【0266】

##### 統計的分析

それぞれのサンプルは二重に分析し、垂直のバーは 2 つの測定値間の広がりを表わす。

10

#### 【0267】

##### 結果および考察

合成し、細胞培養における CTGF に対する活性について評価した、標的当たり約 150 の新規配列のうち、新規の CTGF オリゴヌクレオチド (配列番号 28、30、39、40、45、52、56、78、125 および 166) が、ヒト CTGF の mRNA 発現の優れた阻害を示す。同定された高活性のオリゴヌクレオチドが、図 7 に提供される。

#### 【0268】

多数の新規イントロン (図 4、5 および 6) およびエキソン (図 1、2 および 3) のオリゴヌクレオチドは、驚いたことに、ISIS 124238 を含む、これまでにスクリーニングされた化合物よりも顕著に高い活性を示した。

20

#### 【0269】

エキソンを標的とするアンチセンスの効率は一般に、イントロンを標的とするそれよりも高い (図 7A)。これらのエキソンのヌクレオチド配列のリストは図 7B に提供される。

#### 【0270】

最も有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドの上位 10 個を、上記方法を使用して HUVEC 細胞の用量応答実験で確認した。

#### 【0271】

##### 実施例 9 : 結合組織成長因子タンパク質濃度のウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析 (免疫ブロット分析) は標準的方法を使用して行なわれる。細胞をオリゴヌクレオチド処理の 16 ~ 20 時間後に収集し、PBS で一度洗浄し、Laemmli 緩衝液 (100 μl / ウェル) に懸濁し、5 分間沸騰し、16% SDS-PAGE ゲルにロードする。ゲルは 150 V で 1.5 時間行い、ウェスタンブロットのために膜に転写する。結合組織成長因子に対する適切な一次抗体が使用され、一次抗体種に対する、放射性同位体ラベルまたは蛍光ラベルした二次抗体が使用される。バンドは PHOSPHORIMAGER (商標) (Molecular Dynamics, Sunnyvale Calif.) を使用して視覚化される。

30

#### 【0272】

##### 実施例 10 : CTGF アンチセンスオリゴヌクレオチドのパイロットマウス毒性学研究 研究目的

このパイロット毒性学研究の目的は、正常なオス BALB/c マウスにおける潜在的毒性について、ヒト CTGF を標的とする 3 つのオリゴヌクレオチドを評価することであった。試験したオリゴヌクレオチドは、ISIS 配列 412294 (配列番号 39)、412295 (配列番号 40) および 418899 (配列番号 166) であった。

40

#### 【0273】

##### 方法

重さ約 25 グラムのオスの BALB/c マウス (約 8 週齢) に、研究の全体にわたって通常の研究用食を与えた。マウスに 4 週間、25 または 50 mg / kg のアンチセンスオリゴヌクレオチドを皮下に (SQ) 1 週当たり 2 度投与した (n = 6)。

50

## 【0274】

以下の指標を測定した：

- ・週ごとの体重；
- ・4週目における血漿化学；
- ・検死時の臓器重量、体重；および
- ・肝臓および腎臓のH & E染色。

## 【0275】

結果

25 mg / kg または 50 mg / kg のアンチセンスオリゴヌクレオチド ISIS 412294 (配列番号39)、ISIS 412295 (配列番号40) または ISIS 418899 (配列番号166) を4週間投与した後の結果は、食塩水で処理したマウスの対照群とは著しく異なる指標を多数示した。これらには以下が含まれる：

1) 25 mg / kg もしくは 50 mg / kg の ISIS 412294 (配列番号39) または ISIS 412295 (配列番号40) または 25 mg / kg の ISIS 418899 (配列番号166) で4週間処理した後の血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の濃度は、食塩水 (ビヒクル) コントロールにおける濃度と同等であるが、50 mg / kg の ISIS 418899 (配列番号166) を投与されたマウスは、対照群において観察された値よりも顕著に高い ALT / AST 濃度を示している (図9A および 9B 参照)。これは、以前の研究においてまたは細胞ベースのアッセイによって予測されなかった驚くべき結果であった。

## 【0276】

2) 50 mg / kg の 412295 で処理した群の体重増加は、対照群における体重増加より著しく低かった (図10参照)。

## 【0277】

結論

配列番号39 (ISIS 412294) は、配列番号40 (ISIS 412295) および配列番号166 (ISIS 418899) と同様に、多くの望ましくない毒性学上の特徴を示さなかった。この結果は全く予想できなかったことであり、これらのオリゴヌクレオチド配列の細胞培養における挙動からは予測できなかったことである。

## 【0278】

実施例11：創傷を有するラットにおけるコラーゲンおよびCTGF mRNA 発現に対するラットCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号163) の効果

目的

CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号163 (ISIS 412442) を使用し、癒傷のラット動物モデルにおいてCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドがCTGF および Col1A2 (癒傷のバイオマーカー) の両方の発現を低下させる能力を試験した。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは配列番号39 (ISIS 412294) と同一の化学構造を有するが、配列をわずかに改変して、ラットCTGF mRNA 配列と100%相補的にした。

## 【0279】

創傷の形成

全厚さ0.8センチメートルの4つの生検パンチを、10週齢の無毛ラットの背中の脊柱正中線の両側の2箇所を導入した (研究初日)。傷は開いたままとしたが、無菌閉塞性包帯で覆った。

## 【0280】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与

動物の右側の2つの生検部位を、生検後1日、5日、9日および13日に、3.0、1.0、0.3または0.1 mg のアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかで、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドで皮内治療した。動物の左側の生検部位は、リン酸緩

衝液食塩水 ( P B S ) で皮内治療した。動物は生検後 15 日に屠殺した。全量 200  $\mu$  l のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは P B S をそれぞれのパンチ生検部位に送達した。この 200  $\mu$  l の量は 4 つの 50  $\mu$  l 分割量に分け、傷の周囲約 0.25 cm から 0.5 cm の左、右、上および下側に注入した。

#### 【0281】

##### サンプル収集 / 屠殺

屠殺の日に動物を安楽死させ、傷の中心から皮膚のサンプルを 0.5 cm の生検パンチにて採取し、標準的手法を用いてこれらのサンプルから mRNA を抽出した。ラット C T G F および C o l 1 A 2 の R T - P C R m R N A 分析は、データ分析のための標準曲線方法およびハウスキーピング / 標準化遺伝子として R i b o G r e e n を用いて行った。

10

#### 【0282】

##### 結果

全ての用量でのラットの治療は、C T G F および C o l 1 A 2 の両方の mRNA 発現の統計的に有意な減少をもたらした ( 図 1 1 を参照 ) 。これらの結果は、2' M O E 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによる C T G F 発現の阻害が皮膚におけるコラーゲン堆積を減少させ、皮膚の瘢痕形成の重症度の軽減をもたらすことを明確に実証している。

#### 【0283】

実施例 1 2 : ウサギにおける C T G F アンチセンスオリゴヌクレオチドの単回投与皮内薬物動態学研究

##### 研究目的

ウサギにおけるこの薬物動態学研究の目的は、単回の皮内注射後の異なる時間において、ウサギ皮膚中の C T G F アンチセンスオリゴヌクレオチド ( 配列番号 3 9 、 I S I S 4 1 2 2 9 4 / E X C 0 0 1 ) の濃度を評価することである。

20

#### 【0284】

##### 研究設計

研究の 0 日目、全ての動物に対し、C T G F アンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号 3 9 を、50 mg / mL の濃度の単回の 100  $\mu$  L 注射 ( 全用量 5 mg ) で皮内 ( I D ) に投与した。脊柱正中線の左側の部位 ( ウサギの肩と大体平行な部位 ) にアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した。試験物質が動物の身体底面 ( base ) に向けて注入されるように針を挿入した。1、3、7 または 14 日、ウサギを安楽死させ、全厚さが 1.0 cm の 2 つのパンチ生検を取得した。一方は最初の注射部位の中央からのものとし、他方はそれから 0.5 cm 垂直に下がった位置からのものとした。アンチセンスオリゴヌクレオチド薬剤濃度の分析に先立って、サンプルを素早く冷凍し、- 80 で貯蔵した。結果は、示された時間における両生検からのアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度の平均値として示す。

30

#### 【0285】

##### 結果および結論

皮内投与後少なくとも 14 日まで、有意な濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドが存在する ( 図 1 2 を参照 ) 。薬剤の治療濃度は 1 ~ 100  $\mu$  g / グラム組織である。これらの結果は、この化学的構成を有する 2' M O E アンチセンスオリゴヌクレオチドが皮膚に長期間滞留することを初めて実証し、これらの結果は、この種の化合物の皮膚における治療の可能性をはっきりと示す。

40

#### 【0286】

##### 実施例 1 3 : ゲノム探索

配列番号 3 9 ヌクレオチド配列との間で完全または部分的に相同性または相補性を有する配列についてヒトゲノムデータベースの探索を行うことにより、配列番号 3 9 が望まれないアンチセンスの効果 ( 「 オフターゲット ( o f f - t a r g e t ) 」 毒性と言い換えられる ) を誘導する可能性を評価した。

#### 【0287】

公表されたヒト DNA 塩基配列データベースの包括的な探索を行って、配列番号 3 9 を

50

含む配列がヒト遺伝子の既知のアレイと十分な相同性があるか評価し、望まれないアンチセンスまたはその他の阻害活性が標的CTGF（結合組織成長因子）以外のヒト遺伝子産物の発現に影響を与え、それによって「オフターゲット」効果を誘導するかを評価した。探索には、20のヌクレオチド（すなわち配列番号39の全長）から12ヌクレオチドまでの相同的配列のスクリーニングを含んでいた。

【0288】

配列番号39と相同的な20、19または18塩基を有するヒトゲノムでは、オフターゲット部位は発見されなかった。18、19または20塩基を有するオフターゲット部位の完全な欠如は、任意の重大なオフターゲット活性の可能性が最小であることを示す。配列番号39との間で、3つの17塩基の相同性が同定された。これらの1つはLRFN2遺伝子のイントロン内に存在する。イントロンは典型的に、配列番号39が機能する部位である細胞質にmRNAが達する前に、スプライシングにより転写物から排除される。このため、配列番号39はLRFN2発現に影響しないと予想される。2つの他の17塩基の相同性は遺伝子間スペース領域内に存在する。遺伝子間スペースは一般に転写されないが、配列番号39の機能部位と離れて、核コンパートメント中に二本鎖DNAとして存在する。従って、問題となる17塩基の相同性は存在しなかった。

10

【0289】

見出だされた16塩基、15塩基および14塩基相同性の中で、1つのみが既知のまたは可能性のある転写物内に存在した（即ち、FRMD5：肝臓において有効な脂質合成トランスフェラーゼをコードする）。しかしながら、mRNAセンス転写物との14塩基の配列番号39相同性はアンチセンスの活性の助けとならないだろう（即ち、配列番号39配列の一部がmRNA転写物配列と相同的ではなく相補的である場合にのみハイブリダイゼーションが可能だろう）。したがって、配列番号39はこの転写物に影響を与えないだろう。他の全ての16塩基から14塩基の相同性は、イントロンまたは遺伝子間スペースに対応し、転写物、予測される転写物または発現配列タグとはオーバーラップしなかった。13塩基の相同性は存在しなかった。わずか12ヌクレオチドまたはそれより短いヌクレオチドの相同性に基づく任意の転写物は、配列番号39のような20塩基オリゴヌクレオチドとその意図された標的との結合と比較して、熱力学的に不利な標的を示すだろう。したがって、12塩基以下の相同性は、オフターゲットのアンチセンス活性について有意な可能性を示さない。

20

30

【0290】

従って、ヒトゲノムデータベースの探索により、配列番号39はオフターゲット効果の可能性を最小に抑えつつ、意図した標的に対して高度の特異性を有することが示された。

【0291】

実施例14：CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号39）の安全性および耐容性の評価のためのフェーズ1単回投与皮内臨床研究

研究目的

ヒトCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号39（ISIS No. 412294）を、フェーズ1研究プロトコルの一部として皮内投与（全用量80mg）により6人の患者に投与し、薬剤の1回量の安全性および耐容性を評価した。

40

【0292】

結果

紅斑、炎症、かゆみおよび硬化などの局所的な注射部位の反応以外に、有害事象は報告されなかった。列記した有害事象は、「最小」の重症度レベルで対象の約50%において報告された。血清化学、血液学、尿検査、ECG、生命徴候、健康診断および補体活性化における変化は見られなかった。

【0293】

結論

治療範囲内にあると予想された用量でのCTGFアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与は、ヒトにおいて十分許容され、この化合物の皮膚瘢痕を治療するための安全性が実証

50

された。

【0294】

実施例15：皮内投与後のヒト皮膚におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号39薬剤の濃度

最初の臨床研究において、皮膚薬剤の濃度を患者集団にて評価した。5人の患者にそれぞれ40mgのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を投与した(それぞれ1回分を4mgとして10回投与した)。初日にASOを一回量投与し、21日後、擬似的な外科的傷の部位にて皮膚生検を得た(投与位置の参考として皮膚に線を引いた)。パンチ生検は組織サンプルの4mmの円筒状のコアから成った。キャピラリー電気泳動および蛍光ラベル配列特異的プローブを使用してASOの濃度を決定した結果、84.2μg/グラム組織であった。ASO薬剤の計画される治療濃度は、1~100μg/グラム組織であると予想される。

10

【0295】

この結果により、この化学的構成を有する2'MOEアンチセンスオリゴヌクレオチドが皮内投与後、ヒトの皮膚に長期間滞留することが初めて実証され、この種の化合物の皮膚における治療の可能性を明確に示している。

【0296】

実施例16：待機的腹部形成を行う対象における瘢痕重症度の軽減についての、配列番号39のフェーズ2ランダム化二重盲検対象内比較臨床効果および安全試験

この研究は、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号39(即ち、製剤)の効果および安全性を評価するランダム化二重盲検対象内比較研究である。待機的腹部形成を行う対象において、皮内注射によって腹部形成切開の両側付近に製剤を投与した。

20

【0297】

外科的切開の閉鎖後、正中線の一方の側(陰毛のちょうど側面)における腹部形成切開の部分を、製剤またはプラセボで治療する。

【0298】

研究期間は約24週である。対象は最初に腹部形成術を受け、10週間にわたり製剤およびプラセボを投与された。瘢痕の観察および評価を、12週目まで4週おきに行い、24週目に再度行う。

【0299】

有効性は、切開のそれぞれの対応する対の評価によって決定される。

30

【0300】

切開性瘢痕の重症度を評価する以下の2つの方法を使用して、腹部形成手術後12週目および24週目において有効性を評価した：・視覚的アナログスケール(VAS)を使用した盲検写真の専門家のパネル評価；・調査者瘢痕評価スケール対象瘢痕評価スケール。

【0301】

これらの基準に基づき、配列番号39は有効である。

【0302】

実施例17：前乳房縮小または乳房固定手術に起因する内側瘢痕の待機的修復を受けた対象における皮膚瘢痕の減少における、配列番号39のフェーズ2ランダム化二重盲検対象内比較臨床効果および安全試験

40

この研究は、CTGFアンチセンスオリゴヌクレオチド配列番号39(すなわち製剤)の有効性および安全性を評価するランダム化二重盲検対象内比較研究である。製剤を、修復した乳房縮小瘢痕の内側部分に皮内注射により投与する。外科的切開の閉鎖後、修復された乳房傷/瘢痕の内側部分の一方の側の部分を、製剤またはプラセボで治療する。

【0303】

最高40の対象をこの研究に採用する。研究期間は約24週である。対象は初日に瘢痕修復を受け、10週間にわたり製剤およびプラセボの投与を受ける。瘢痕の観察および評価を、12週目まで4週ごとに行い、24週目に再度行う。

【0304】

50

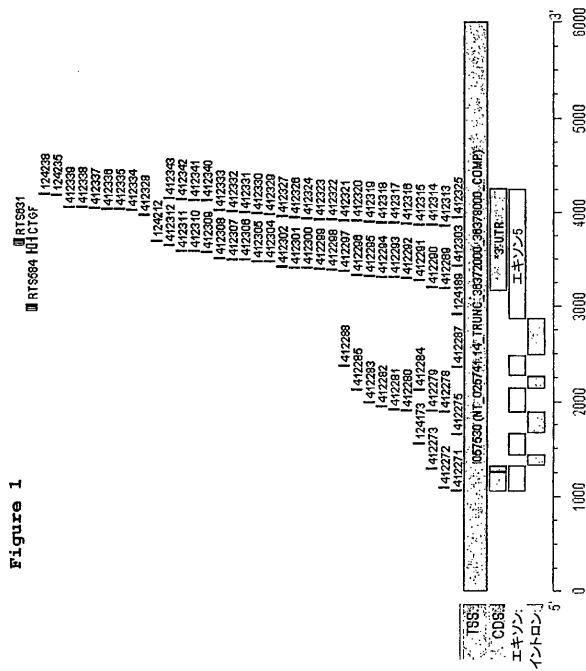
切開のそれぞれ対応する対の評価により有効性を決定する。乳房縮小痕の重症度を評価する以下の2つの方法を使用して、乳房縮小痕の内側部分の修復後12週目および24週目において有効性を評価した：・視覚的アナログスケール(VAS)を使用した盲検写真の専門家のパネル評価；・調査者瘢痕評価スケール対象瘢痕評価スケール。

【0305】

これらの基準に基づき、配列番号39は有効である。

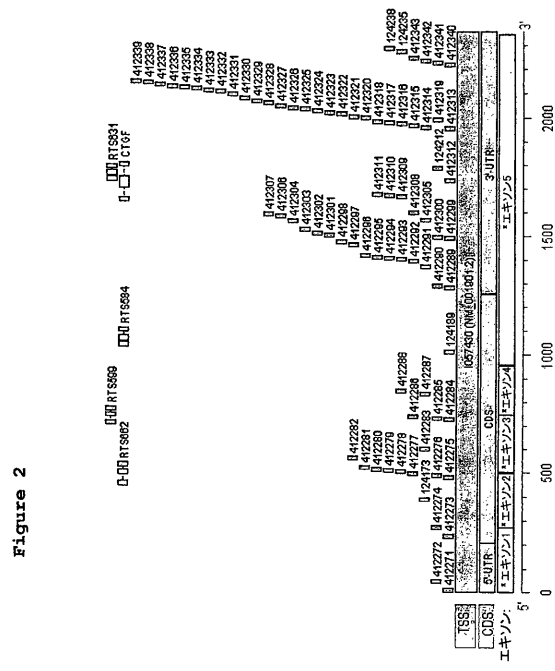
【図1】

図1



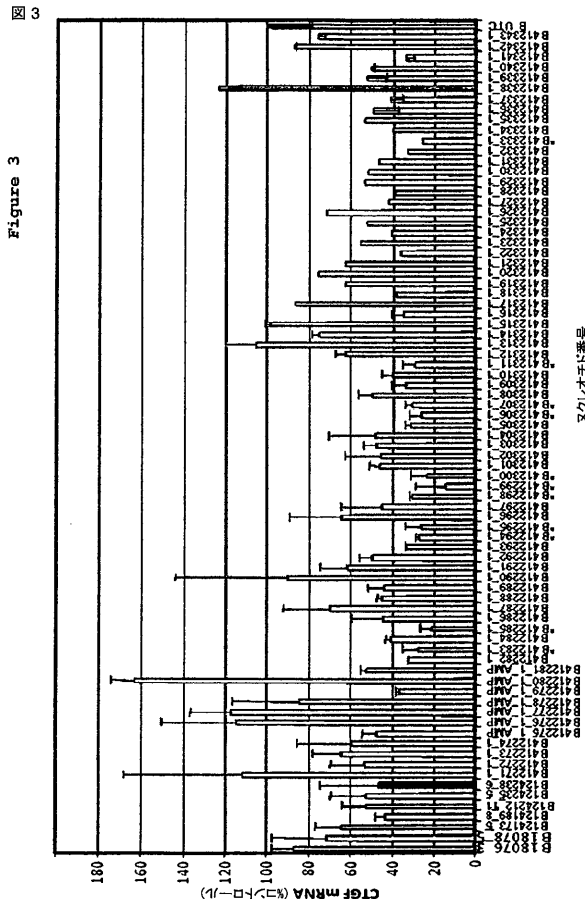
【図2】

図2

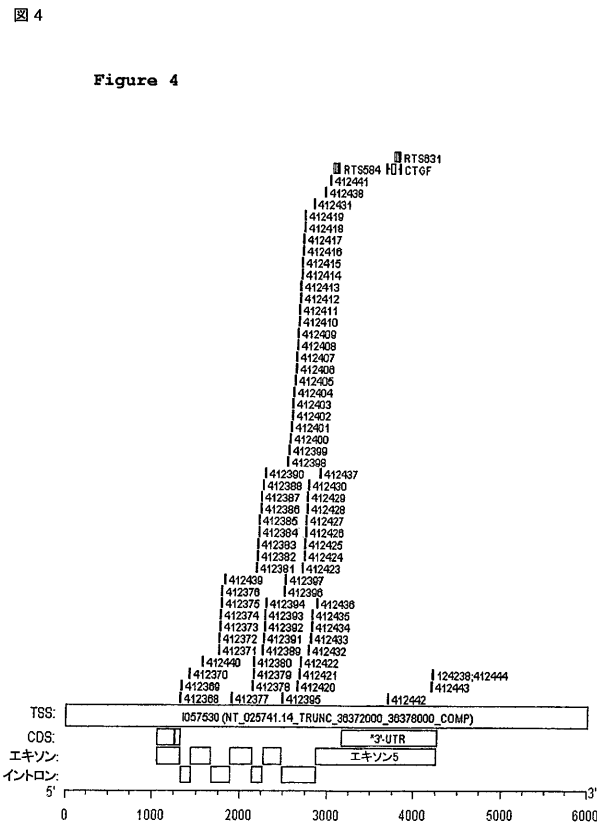




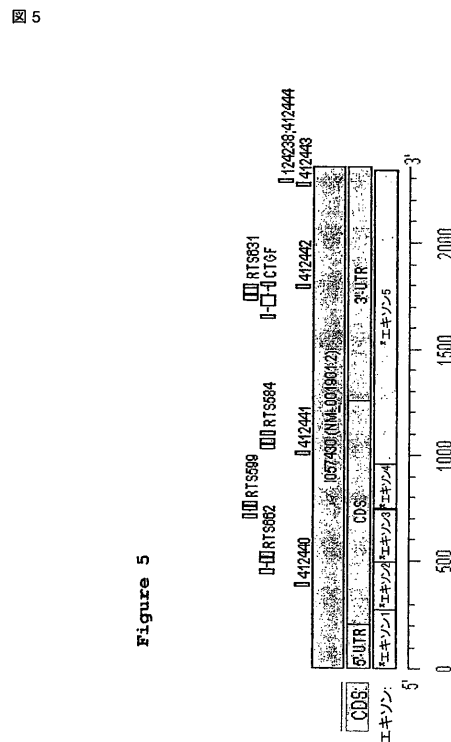
【 図 3 】



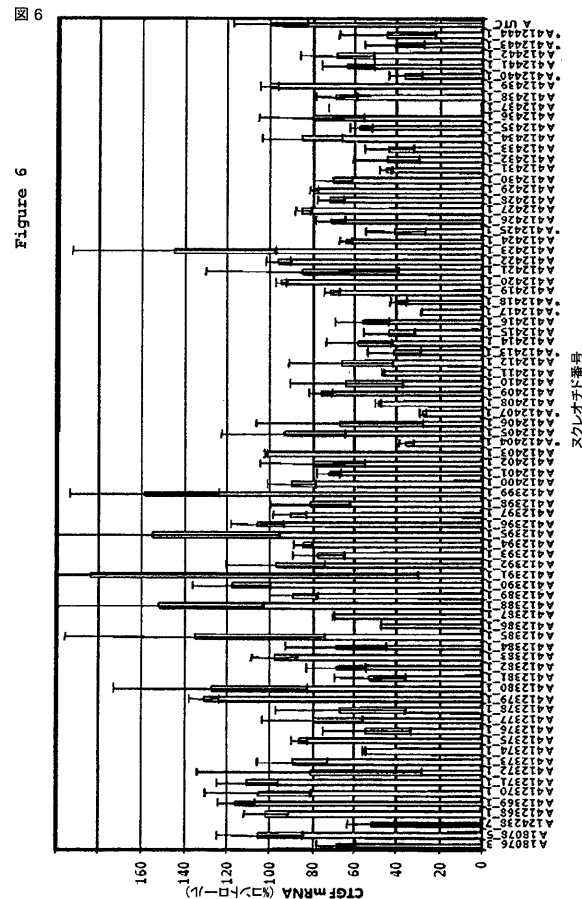
【 図 4 】



【 図 5 】



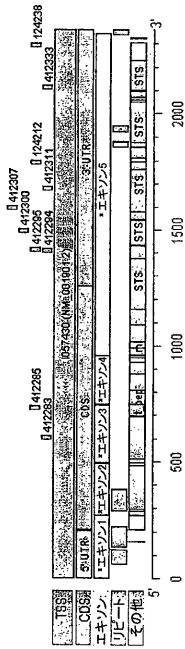
【 図 6 】



【 図 7 A 】

図 7A

Figure 7A



【 図 7 B 】

図 7B

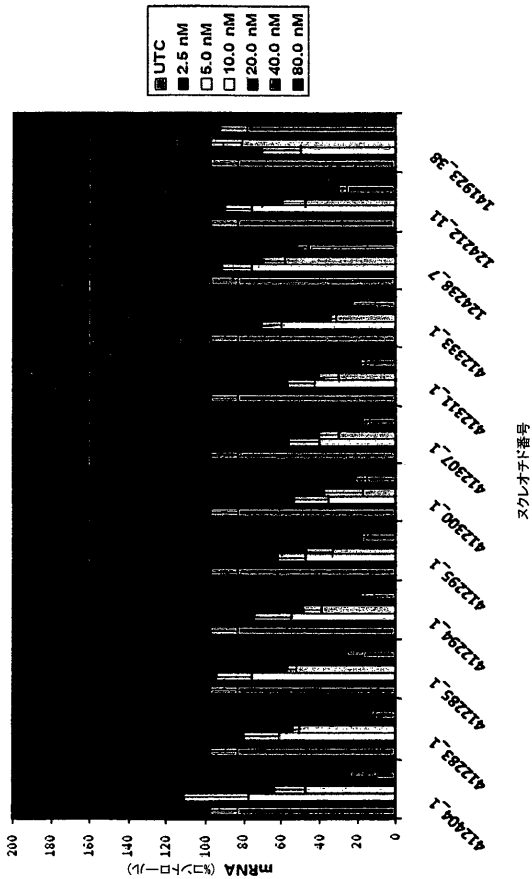
Figure 7B

オリゴヌクレオチド番号	配列
412404	CGTGGCAAGAGCCCTAAGTT (イントロン)
412283	GGGCATGCAGCCACCGCCC (エキソン3)
412285	AGGGCAGGCCCAACCAGGT (エキソン3)
412294	GTTTGACATGGACAATGTT (エキソン5)
412295	TATTTGTTGACATGGACA (エキソン5)
412300	TAATATACATTCTGGTGCTG (エキソン5)
412307	TACACTCAAATAGCAGGCA (エキソン5)
412311	TCTTGATGGCTGGAGAATGC (エキソン5)
412333	CAGCCTCCAAGGACACTGA (エキソン5)
124238	AAACATGTAACCTTTTGTCA (旧リード)
124212	CCACAAGCTGCCAGTCTAA (旧リード)

【 図 8 】

図 8

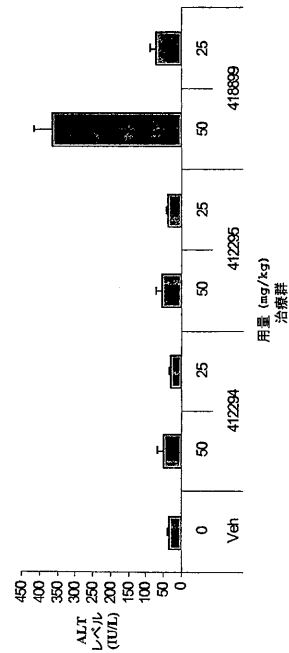
Figure 8



【 図 9 A 】

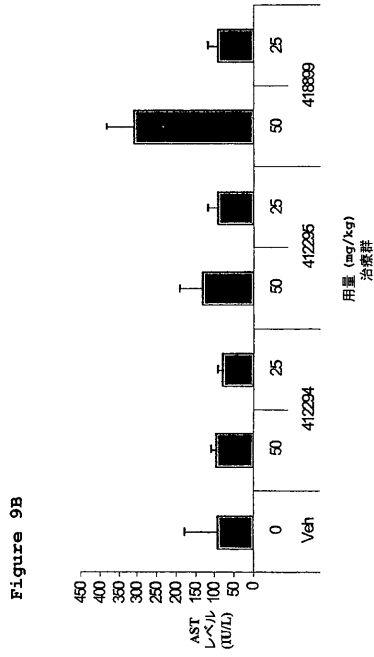
図 9A

Figure 9A



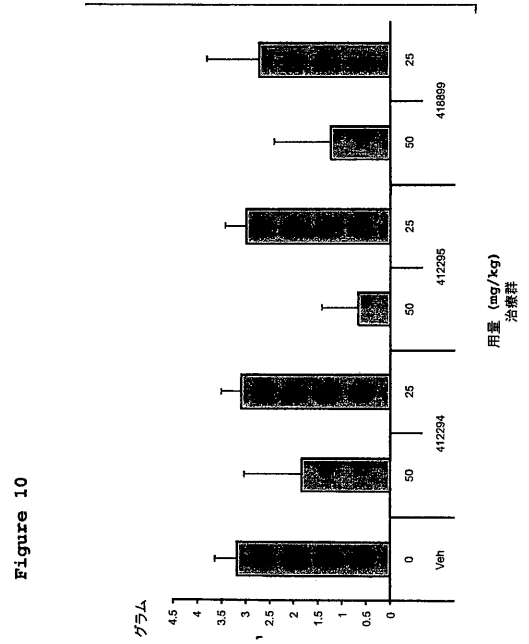
【 図 9 B 】

図 9B



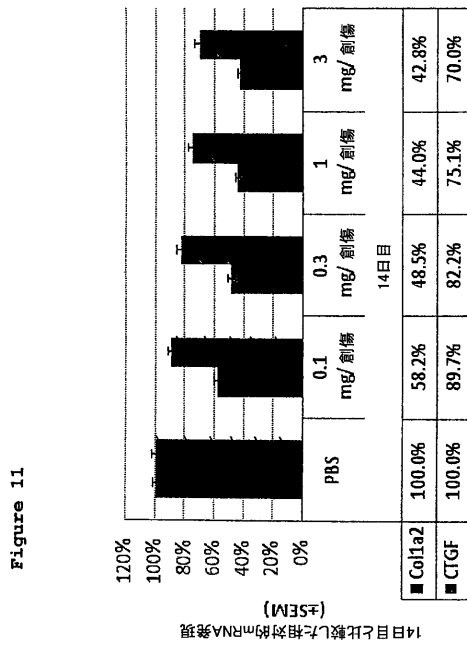
【 図 1 0 】

図 10



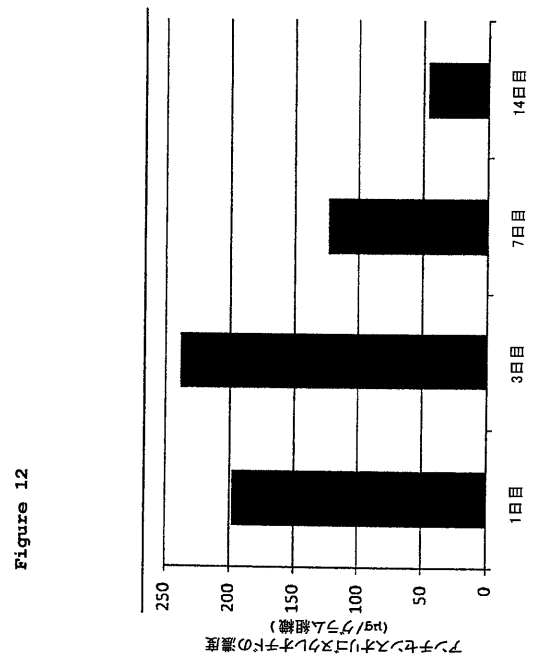
【 図 1 1 】

図 11



【 図 1 2 】

図 12



## 【配列表】

2016041067000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成27年10月29日(2015.10.29)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

連結した12～30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が、配列番号9のヌクレオチド718～751、1388～1423、1457～1689、2040～2069、2120～2147、2728～2797、2267～2301、553～611、1394～1423、1469～1508、1559～1605、1659～1689、2100～2129および1399～1423から選択される領域内に存在する化合物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0305

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0305】

これらの基準に基づき、配列番号39は有効である。

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

[1] 連結した12～30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含み、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が、配列番号9のヌクレオチド718～751、1388～1423、1457～1689、2040～2069、2120～2147、2728～2797、2267～2301、553～611、1394～1423、1469～1508、1559～1605、1659～1689、2100～2129および1399～1423から選択される領域内に存在する化合物。

[2] 連結した12～30のヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、その少なくとも12の核酸塩基からなる配列部分が、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す核酸塩基配列内に存在する、化合物。

[3] [2]に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが連結した20のヌクレオシドからなる化合物。

[4] 連結した少なくとも12のヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドを含み、その核酸塩基配列が、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す核酸塩基配列内に存在する化合物。

[5] [4]に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが、連結した少なくとも14のヌクレオシドを含む化合物。

[6] [1]～[5]のいずれか1に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが1本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

[7] [1]～[5]のいずれか1に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが2本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

[8] [1]～[7]の何れか1に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドがその全体に亘って、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166に示す配列のうちの一つの部分と100%同一である配列を有する化合物。

[ 9 ] [ 1 ] ~ [ 8 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む化合物。

[ 10 ] [ 9 ] に記載の化合物であって、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合がホスホチオエートヌクレオシド間結合である化合物。

[ 11 ] [ 10 ] に記載の化合物であって、当該ヌクレオシド間結合の全てがホスホチオエートヌクレオシド間結合である化合物。

[ 12 ] [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾された糖を含む化合物。

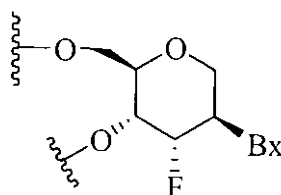
[ 13 ] [ 12 ] に記載の化合物であって、当該修飾された糖が二環式の糖である化合物。

[ 14 ] [ 12 ] に記載の化合物であって、当該修飾された糖のうちの少なくとも 1 つが 2' - O - メトキシエチルを含む化合物。

[ 15 ] [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、テトラヒドロピラン環がフラノース環を置換した、少なくとも 1 つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドを含む化合物。

[ 16 ] [ 15 ] に記載の化合物であって、当該少なくとも 1 つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドの各々が以下の構造を有する化合物：

【化 3】



式中、B x は、任意に保護されるヘテロ環塩基部分である。

[ 17 ] [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾された核酸塩基を含む化合物。

[ 18 ] [ 17 ] に記載の化合物であって、当該修飾された核酸塩基が 5' - メチルシトシンである化合物。

[ 19 ] [ 1 ] ~ [ 7 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが：

( a ) 連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント ( gap segment ) と

;

( b ) 連結した修飾ヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント ( wing segment ) と

;

( c ) 連結した修飾ヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントと ; を含み、当該ギャップセグメントが当該 5' ウィングセグメントと当該 3' ウィングセグメントとの間に位置し、各々のウィングセグメント内の各々の修飾ヌクレオチドが修飾された糖を含む化合物。

[ 20 ] [ 19 ] に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが：

( a ) 連結した 13 のデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメントと；

( b ) 連結した 2 つの修飾ヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメントと；

( c ) 連結した 5 つの修飾ヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントと ; を含み、当該ギャップセグメントが当該 5' ウィングセグメントと当該 3' ウィングセグメントとの間に位置し、各々のウィングセグメント内の各々の修飾ヌクレオシドが、2' - O - メトキシエチル糖を含み、各々のヌクレオシド間結合がホスホチオエート結合である化合物

。

[ 21 ] [ 1 ] ~ [ 20 ] のいずれか 1 に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌク

レオチドが連結した20のヌクレオシドからなる化合物。

[22] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号39に示す配列である化合物。

[23] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号40に示す配列である化合物。

[24] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号45に示す配列である化合物。

[25] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号52に示す配列である化合物。

[26] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が配列番号166に示す配列である化合物。

[27] 核酸塩基配列が、配列番号28、30、39、40、43、44、45、50、51、52、56、78、125および166のうちの1つに示す配列である連結したヌクレオシドを含む修飾オリゴヌクレオチドまたはその塩と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む組成物。

[28] [1] ~ [21]のいずれか1に記載の化合物であって、当該核酸塩基配列が、配列番号9のヌクレオチドの範囲内（例えば、1388 ~ 1423、A - B、C - DおよびE - F）で、前もって設計したオリゴヌクレオチドがその範囲に入らない限りにおいて、100%相補的である化合物。

[29] [28]に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが1本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

[30] [28]に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが2本鎖オリゴヌクレオチドである化合物。

[31] [28] ~ [30]のいずれか1に記載の化合物であって、当該修飾オリゴヌクレオチドが、連結した20のヌクレオシドからなる化合物。

[32] 結合組織成長因子の発現が阻害されるような条件下で、細胞または組織を[1] ~ [31]のいずれか1に記載の化合物と接触させることを含む、細胞または組織内で結合組織成長因子の発現を阻害する方法。

[33] 結合組織成長因子の発現を阻害し、それによって動物を治療するのに効果的な量の[1] ~ [31]の何れか1に記載の化合物を、当該動物に投与することを含む、結合組織成長因子の発現に関連した疾患または症状を有する動物を治療する方法。

[34] [33]に記載の方法であって、当該疾患が過剰増殖促進性疾患である方法。

[35] [34]に記載の方法であって、当該過剰増殖促進性疾患が癌である方法。

[36] [33]に記載の方法であって、当該疾患または症状が線維症である方法。

[37] [36]に記載の方法であって、当該線維症が肥厚性瘢痕、ケロイド、皮膚瘢痕、肝線維症、肺線維症、腎線維症、心臓線維症または再狭窄である方法。

[38] [33]に記載の方法であって、当該疾患または障害が、関節線維症（凍結肩症候群（frozen shoulder syndrome）、腱および末梢神経損傷を含む）、脊髄損傷、冠状動脈バイパス、腹部および腹膜癒着（子宮内膜症、子宮平滑筋腫および子宮筋腫を含む）、放射状角膜切除術、レーザー屈折矯正角膜切除術、網膜復位術、装置介在線維症（たとえば糖尿病における）、腱癒着、デュピュイトラン拘縮または硬皮症である方法。

[39] 患者において結合組織成長因子の発現を阻害し、それによって当該患者における創傷治癒から生じる瘢痕を減少させるのに効果的な量の[1] ~ [32]のいずれか1に記載の化合物を当該患者に投与することを含む、それを必要とする患者において創傷治癒に起因する瘢痕を減少させる方法。

[40] [39]に記載の方法であって、創傷治癒が、皮膚切断、外科的切開および火傷からなる群より選択される創傷における治癒である方法。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 41/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100124394

弁理士 佐藤 立志

(74)代理人 100112807

弁理士 岡田 貴志

(74)代理人 100111073

弁理士 堀内 美保子

(72)発明者 ニコラス・エム．・ディーン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 2 4、エンシニタス、ウィスパー・ウィンド・エルエ  
ヌ 2 1 1 0

(72)発明者 ジェイ．・ゴードン・フォークス

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 2 4、エンシニタス、ブランド・クレスト 3 7 5 6

(72)発明者 ナイオール・オードネル

アメリカ合衆国、ミズーリ州 6 3 1 0 5、セント・ルイス、リンデル・ブルバード 4 4 0 0  
、アパートメント 1 9 イー

(72)発明者 シー．・フランク・ベネット

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 0 0 9、カールスバッド、カッシンス・ストリート 1  
3 4 7

(72)発明者 スーザン・エム．・フレイアー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 2 1 2 2、サン・ディエゴ、ルノールト・ストリート 2  
9 4 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA09 CA12 HA17

4C084 AA13 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA28 MA31 MA32 MA35

MA37 MA41 MA43 MA52 MA56 MA57 MA58 MA60 MA63 MA66

	NA14	ZA361	ZA591	ZA751	ZA811	ZA891	ZA961	ZB261	ZC021	
4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01	MA04	MA13	MA17	MA22	MA23
	MA24	MA28	MA31	MA32	MA35	MA37	MA43	MA52	MA56	MA57
	MA58	MA60	MA63	MA66	NA14	ZA36	ZA59	ZA75	ZA81	ZA89
	ZA96	ZB26								



【外国語明細書】

2016041067000001.pdf