

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5213723号  
(P5213723)

(45) 発行日 平成25年6月19日 (2013.6.19)

(24) 登録日 平成25年3月8日 (2013.3.8)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 H 21/04 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/712 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/7125 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 3/06 (2006.01)

C O 7 H 21/04 C S P Z  
 A 6 1 K 31/712  
 A 6 1 K 31/7125  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 3/06

請求項の数 17 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-552606 (P2008-552606)  
 (86) (22) 出願日 平成19年1月27日 (2007.1.27)  
 (65) 公表番号 特表2009-524696 (P2009-524696A)  
 (43) 公表日 平成21年7月2日 (2009.7.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/061186  
 (87) 国際公開番号 W02007/090073  
 (87) 国際公開日 平成19年8月9日 (2007.8.9)  
 審査請求日 平成22年1月9日 (2010.1.9)  
 (31) 優先権主張番号 60/762, 721  
 (32) 優先日 平成18年1月27日 (2006.1.27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/805, 204  
 (32) 優先日 平成18年6月19日 (2006.6.19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロRNAの調節に使用するためのオリゴマー化合物及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の化学式 I を有する結合したヌクレオシドの連続配列を含むオリゴマー化合物：

$$T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$$

式中、

$Nu_1$ 、 $Nu_3$ 、及び  $Nu_5$  は、2'-修飾ヌクレオシドであり、該2'-修飾ヌクレオシドの各々は、2'-置換基  $O(CH_2)_2OCH_3$  を含み、

$Nu_2$  及び  $Nu_4$  は、-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、

$n_1$  及び  $n_5$  の各々は、2であり、

$n_2 + n_4$  の合計は10～25であり、

$n_3$  は2または3であり、

各  $T_1$  及び  $T_2$  は、独立して、H、ヒドロキシル保護基、任意に結合した抱合基、或いはキャッピング基である。

【請求項2】

$n_2 + n_4$  の合計が16或いは17である、請求項1記載のオリゴマー化合物。

【請求項3】

前記化学式 I が、下記から選択される、請求項1記載のオリゴマー化合物：

a) 化学式 I :  $n_1 = 2$  ,  $n_2 = 2$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 14$  ,  $n_5 = 2$ 、

- b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、  
 f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、  
 n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、  
 o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は  
 aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

10

20

## 【請求項 4】

$Nu_1$ 、 $Nu_3$ 、及び  $Nu_5$  は、2'-置換基  $O(CH_2)_2OCH_3$  を有するヌクレオシドであり、 $T_1$  は H であり、 $T_2$  は H であり、化学式 I は、下記から選択される、請求項 1 記載のオリゴマー化合物：

30

- a) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、  
 f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、  
 n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、  
 o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、

40

50

- u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は  
 aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

## 【請求項 5】

前記オリゴマー化合物は、少なくとも 1 つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

10

## 【請求項 6】

各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を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

## 【請求項 7】

$T_1$  は H であり、 $T_2$  は H である、請求項 1 ~ 3、5 或いは 6 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

## 【請求項 8】

配列 ID 番号 1 ~ 470 から選択された核酸塩基配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

## 【請求項 9】

20

配列 ID 番号 113 の核酸塩基配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

## 【請求項 10】

$Nu_1$ 、 $Nu_3$ 、及び  $Nu_5$  は、2'-置換基  $O(CH_2)_2OCH_3$  を有するヌクレオシドであり、 $T_1$  は H であり、 $T_2$  は H であり、化学式 I は、下記から選択される、請求項 9 記載のオリゴマー化合物：

- a) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、  
 h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、  
 m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は

30

40

50

y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

【請求項 11】

配列 ID 番号 19 の核酸塩基配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のオリゴマー化合物。

【請求項 12】

$Nu_1$ 、 $Nu_3$ 、及び  $Nu_5$  は、2'-置換基  $O(CH_2)_2OCH_3$  を有するヌクレオシドであり、 $T_1$  は H であり、 $T_2$  は H であり、化学式 I は、下記から選択される、請求項 11 記載のオリゴマー化合物：

- a) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、
- b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、
- c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、
- d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、
- f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、
- g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、
- h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、
- i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、
- j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、
- k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、
- l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、
- m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、
- n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、
- o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、
- p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、
- q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、
- r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、
- s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、
- t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、
- u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、
- v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、
- w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、
- x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、
- z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は
- aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

【請求項 13】

miRNA 活性を阻害するための薬剤組成物であって、請求項 1 記載のオリゴマー化合物を含み、前記オリゴマー化合物が、miRNA に対して実質的に相補的な核酸塩基配列を含む、薬剤組成物。

【請求項 14】

miRNA 活性をインビボで阻害するための薬剤組成物であって、請求項 1 記載のオリゴマー化合物を含み、前記オリゴマー化合物が、配列 ID 番号 1 ~ 470 から選択された核酸塩基配列を含む、薬剤組成物。

【請求項 15】

miR-122 活性を阻害するための薬剤組成物であって、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のオリゴマー化合物を含む、薬剤組成物。

【請求項 16】

ALDO mRNA レベルを増加させる、請求項 15 記載の薬剤組成物。

【請求項 17】

コレステロールレベルを減少させる、請求項 15 記載の薬剤組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連文献の相互参照

本明細書は、2006年1月27日に出願された米国仮出願第60/762,721号、及び2006年1月19日に出願された米国仮出願第60/805,204号に対して優先権を主張するものであり、それぞれはこの参照によってその全体が本明細書に組み込まれるものである。

## 【0002】

## 技術分野

本発明は、マイクロRNAを含む、短い非コード(non-coding)RNAを調節するための組成物及び方法を提供するものである。特に、本発明は、オリゴマー化合物、特に化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドに関連しており、これはいくつかの実施形態において、マイクロRNAを含む短い非コードRNA標的を有する或いはコード化している核酸分子とハイブリダイズする、或いは立体的に干渉するものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

「成熟」miRNAとしても知られているマイクロRNA(miRNAs)は、植物及び動物のゲノム内にコード化された短い(約21~24ヌクレオチド長)非コードRNAである。これら高度に保存され内因的に発現したRNAは、特異的mRNAの3'UTR領域(3'UTR)へ結合することによって遺伝子の発現を調節している。500以上の異なるmiRNAは、植物及び動物において同定されていた。成熟miRNAsは、しばしば数千長のヌクレオチドである、長い内因性前駆体miRNA転写産物(pri-miRNAs、pri-mirs、pri-mirs、或いはpri-pre-miRNAsとしても知られている)から派生すると見られている(Lee, et al., EMBO J., 2002, 21(17), 4663-4670)。

## 【0004】

miRNAsの機能解析によって、これら短い非コードRNAは、発生タイミング、器官形成、分化、パターン形成、胚形成、増殖調節及びプログラム細胞死を含む、動物における異なる生理学的過程に貢献していることが明らかになった。miRNAsが関与する特定の過程の例としては、幹細胞分化、神経発生、血管新生、造血発生、及びエキソサイトーシスを含む(Alvarez-Garcia and Miska, Development, 2005, 132, 4653-4662を参照のこと)。

## 【0005】

miRNAファミリー及びクラスターを含むmiRNAと、ヒト疾患との間の関連も同定されてきた。多くのmiRNAは原発性ヒト腫瘍において調節解除される(Calin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, 99, 15524-15529; Calin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, 101, 11755-11760; He et al., Nature, 2005, 435, 828-833; Lu et al., Nature, 2005, 435, 834)。さらに、多くのヒトmiRNAは癌に関連したゲノム領域に位置している(Calin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2004, 101, 2999-3004; McManus, 2003, Semin. Cancer Biol., 13, 252-258; He et al., Nature, 2005, 435, 828-833)。ポリシストロニックmiRNA由来であるMir-15a及びmiR-16-1は、染色体13q14の30kb領域内に位置しており、これは半分以上のB細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)において欠損する領域である。miR-15a及びmiR-16-1の両者は、ほとんどのCLLケースにおいて欠損している或いはダウンレギュレーション(down-regulation)されている(Calin et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 2002, 99, 15524-15529

10

20

30

40

50

)。

【0006】

miRNAsのファミリーは、シード配列として知られる領域である、miRNAの2～8位でのヌクレオチド同定によって特徴付けされ得る。Lewisらは、いくつかのmiRNAファミリー、さらには関連シード配列で特徴付けされているmiRNAスーパーファミリーを記載している(Lewis et al. 2005)。

【0007】

miRNAは、ほとんどの真核生物において転写後調節を行うと考えられており、植物、動物さらには特定のウイルスにおいて検出されていた。多くのmiRNAsはいくつかの種から同定されており(例えばPCR公開公報第WO03/029459号及び公開米国特許第20050222399号、第20050227934号、第20050059005号、及び第20050221293号を参照のこと、それぞれはこの参照によってその全体が本明細書に組み込まれるものである)、より多くはバイオインフォマティクス的に予測されていた。これらmiRNAの多くは種を超えて保存されているが、種特異的miRNAも同定されていた(Pillai, RNA, 2005, 11, 1753-1761)。

【0008】

短い非コードRNAによって仲介されるメカニズムを介して遺伝子発現を調節する薬剤に対するニーズが存在する。

【発明の開示】

【発明の効果】

【0009】

本発明はとりわけ、アンチセンス及び非アンチセンスメカニズムに依存するものを含む、miRNAのレベル、活性或いは機能を修飾するのに有用な化学的に修飾されたオリゴマー化合物及び方法を提供するものである。

【0010】

本発明はとりわけ、短い非コードRNAを有する或いはコード化する核酸を標的とし、短い非コードRNAのレベルを修飾する或いはそれらの機能を干渉するように作用する、オリゴマー化合物、特に核酸及び核酸様オリゴマー化合物を提供する。

【0011】

本発明はさらに、miRNAを標的とし、miRNAのレベルを修飾する或いはそれらのプロセッシング或いは機能を干渉するように作用する、オリゴマー化合物、好ましくは核酸及び核酸様オリゴマー化合物も提供する。

【0012】

本発明は、ヌクレオシド間(internucleoside)結合基によって結合した約17～約29個のヌクレオシドの連続配列を有するオリゴマー化合物を提供し、前記相列は2つの外部領域間に位置した内部領域を有し、各外部領域は独立して1～約3個のヌクレオシドを有し、各外部領域は安定化ヌクレオシドを有し、前記内部領域は少なくとも10個の -D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有し、前記安定化ヌクレオシドのそれぞれは -D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドに関連した増強されたヌクレアーゼ安定性を提供するものである。

【0013】

本発明はさらに、ヌクレオシド間結合基によって結合した約17～約29個のヌクレオシドの連続配列を有するオリゴマー化合物を提供し、前記相列は2つの外部領域間に位置した内部領域を有し、各外部領域は独立して1～約3個のヌクレオシドを有し、各外部領域は安定化ヌクレオシドを有し、及び前記内部領域は少なくとも10個の -D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有するものである。

【0014】

特定の実施形態において、前記オリゴマー化合物は、前記内部領域に -D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドのみを有するギャップオリゴマー化

10

20

30

40

50

化合物を定義する、結合ヌクレオシドの連続配列を有する。別の実施形態において、前記オリゴマー化合物は、前記内部領域に2～6個の安定化ヌクレオシドを有する部分的に修飾されたヌクレオシド化合物も定義できる、結合ヌクレオシドの連続配列を有する。

#### 【0015】

いくつかの実施形態において、前記安定化修飾は、安定化ヌクレオシド、安定化ヌクレオシド間結合基、或いはそれらの組み合わせを有する。更なる実施形態において、各安定化ヌクレオシドは、 $-D-2'-\text{デオキシ}-2'-\text{フルオロリボフラノシルヌクレオシド}$ に関連した増強されたヌクレアーゼ安定性を提供するものである。

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、前記内部領域における各ヌクレオシドは、独立して、安定化ヌクレオシド或いは $-D-2'-\text{デオキシ}-2'-\text{フルオロリボフラノシルヌクレオシド}$ であり、ここにおいて少なくとも一つの $-D-2'-\text{デオキシ}-2'-\text{フルオロリボフラノシルヌクレオシド}$ は前記内部領域における各安定化ヌクレオシドを各外部領域から分離するものである。

10

#### 【0017】

特定の実施形態において、各安定化ヌクレオシドは、独立して、 $2'$ ?修飾ヌクレオシドである。

#### 【0018】

1実施形態において、前記 $2'$ ?修飾ヌクレオシドは、二環性糖修飾ヌクレオシドである。別の実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドは独立して、アルファ或いは立

20

#### 【0019】

いくつかの実施形態において、前記 $2'$ ?修飾ヌクレオシドのそれぞれは独立して、 $O-C_1-C_{12}$ アルキル、置換 $O-C_1-C_{12}$ アルキル、 $O-C_2-C_{12}$ アルケニル、置換 $O-C_2-C_{12}$ アルケニル、 $O-C_2-C_{12}$ アルキニル、置換 $O-C_2-C_{12}$ アルキニル、アミノ、置換アミノ、アミド、置換アミド、アラルキル、置換アラルキル、 $O$ -アラルキル、置換 $O$ -アラルキル、 $N_3$ 、 $SH$ 、 $CN$ 、 $OCN$ 、 $CF_3$ 、 $OCF_3$ 、 $SOCH_3$ 、 $-SO_2CH_3$ 、複素環?アルキル、複素環アルカリル、アミノ?アルキルアミノ及びポリアルキルアミノから選択された $2'$ ?置換基を有し；各置換基は独立して、ハロゲン、 $C_1-C_{12}$ アルキル、置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、 $C_2-C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2-C_{12}$ アルケニル、 $C_2-C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2-C_{12}$ アルキニル、 $O-C_1-C_{12}$ アルキル、置換 $O-C_1-C_{12}$ アルキル、 $S-C_1-C_{12}$ アルキル、置換 $S-C_1-C_{12}$ アルキル、アシル( $C(=O)-H$ )、置換アシル、アミノ、置換アミノ、アミド、置換アミド、 $C_1-C_{12}$ アルキルアミノ、置換 $C_1-C_{12}$ アルキルアミノ、 $C_1-C_{12}$ アミノアルコキシ、置換 $C_1-C_{12}$ アミノアルコキシ、 $C_1-C_{12}$ アルキルアミノオキシ、置換 $C_1-C_{12}$ アルキルアミノオキシ、グアニジニル、置換グアニジニル、或いは保護基である。

30

#### 【0020】

別の実施形態において、前記 $2'$ ?修飾ヌクレオシドは独立して、 $O(CH_2)_0-2CH_3$ 、 $O(CH_2)_2OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $OCH_2C(H)CH_2$ 、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 及び $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ から選択される $2'$ ?置換基を有する。

40

#### 【0021】

特定の実施形態において、前記二環性糖修飾ヌクレオシドのそれぞれは独立して、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R_1)-$ 、 $-C(R_1)(R_2)-$ 、 $-C(R_1)=C(R_1)-$ 、 $-C(R_1)=N-$ 、 $-C(=NR_1)-$ 、 $-Si(R_1)(R_2)-$ 、 $-S(=O)_2-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 及び $-C(=S)-$ から独立して選択される1～8結合バイラジカル基を有する $2'$ 及び $4'$ -炭素原子の間の架橋基を有するものであり；各 $R_1$ 及び $R_2$ は独立して、 $H$ 、ヒドロキシル、 $C_1-C_{12}$ アルキル、置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、 $C_2-C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2-C_{12}$ アルケニル、 $C_2-C_{12}$ アルキ

50

ニル、置換  $C_2 - C_{12}$  アルキニル、 $C_5 - C_{20}$  アリール、置換  $C_5 - C_{20}$  アリール、複素環ラジカル（遊離基）、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 $C_5 - C_7$  脂環ラジカル、置換  $C_5 - C_7$  脂環ラジカル、ハロゲン、置換オキシ（ $-O-$ ）、アミノ、置換アミノ、アジド、カルボキシル、置換カルボキシル、アシル、置換アシル、 $CN$ 、チオール、置換チオール、スルホニル（ $S(=O)_2 - H$ ）、置換スルホニル、スルホキシル（ $S(=O) - H$ ）或いは置換スルホキシルであり；ここにおいて、各置換基は独立して、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$  アルキル、置換  $C_1 - C_{12}$  アルキル、 $C_2 - C_{12}$  アルケニル、置換  $C_2 - C_{12}$  アルケニル、 $C_2 - C_{12}$  アルキニル、置換  $C_2 - C_{12}$  アルキニル、アミノ、置換アミノ、アシル、置換アシル、 $C_1 - C_{12}$  アミノアルキル、 $C_1 - C_{12}$  アミノアルコキシ、置換  $C_1 - C_{12}$  アミノアルキル、置換  $C_1 - C_{12}$  アミノアルコキシ或いは保護基である。

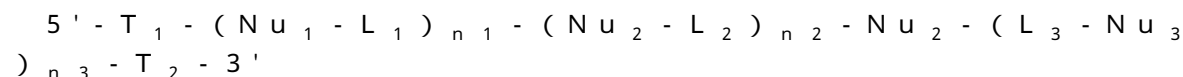
10

#### 【0022】

いくつかの実施形態において、各安定化ヌクレオシド間結合基は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合基である。

#### 【0023】

本発明は、結合ヌクレオシドの連続配列を持つ、及び以下の化学式：



であって、ここにおいて：

各  $Nu_1$  及び  $Nu_3$  は独立して、安定化ヌクレオシドであり；

20

少なくとも10個の  $Nu_2$  は、 $-D-2'-$ デオキシ- $2'-$ フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり；

各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は独立して、ヌクレオシド間結合基であり；

各  $T_1$  及び  $T_2$  は独立して、 $H$ 、ヒドロキシル保護基、任意に結合した共役基或いはキャップ（capping）基であり；

$n_1$  は0～約3であり；

$n_2$  は約14～約22であり；

$n_3$  は0～約3であり；

$n_1$  が0である場合  $T_1$  は $H$ 或いはヒドロキシル保護基ではなく、 $n_3$  が0の場合  $T_2$  は $H$ 或いはヒドロキシル保護基ではないという条件である；

30

を持つオリゴマー化合物を提供するものである。

#### 【0024】

いくつかの実施形態において、各安定化ヌクレオシドは、 $-D-2'-$ デオキシ- $2'-$ フルオロリボフラノシルヌクレオシドに関連した増強されたヌクレアーゼ安定性を提供するものである。

#### 【0025】

別の実施形態において、各  $Nu_2$  は、 $-D-2'-$ デオキシ- $2'-$ フルオロリボフラノシルヌクレオシドである。

#### 【0026】

特定の実施形態において、各  $Nu_2$  は独立して、安定化ヌクレオシド或いは  $-D-2'-$ デオキシ- $2'-$ フルオロリボフラノシルヌクレオシドである。

40

#### 【0027】

更なる実施形態において、 $3'Nu_1$  安定化ヌクレオシドへ結合した前記  $Nu_2$  ヌクレオシド、及び  $5'Nu_3$  安定化ヌクレオシドへ結合した前記  $Nu_2$  ヌクレオシドはそれぞれ独立して、 $-D-2'-$ デオキシ- $2'-$ フルオロリボフラノシルヌクレオシドである。

#### 【0028】

他の実施形態において、安定化ヌクレオシドは独立して、 $2'$ 修飾ヌクレオシドである。更なる実施形態において、前記  $2'$ 修飾ヌクレオシドは二環性糖修飾ヌクレオシドである。付加的な実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドは独立して、アルファ或いは

50



はベータ立体配置におけるD或いはL糖を有する。

【0029】

特定の実施形態において、各安定化ヌクレオシドは、 - D - リボフラノシルヌクレオシド

に関連したオリゴマー化合物の結合親和性を増加するものである。

【0030】

更なる実施形態において、各2'置換基は独立して、 $O - C_1 - C_{1-2}$ アルキル、 $O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NH_2$ 、 $O - (CH_2)_2 - O - N(R_6)_2$ 、 $O - CH_2 C(=O) - N(R_6)_2$ 、 $O - (CH_2)_2 - O - (CH_2)_2 - N(R_6)_2$ 、 $O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NHR_6$ 、 $N_3$ 、 $O - CH_2 - CH = CH_2$ 、 $NHCOR_6$  或いは  $O - CH_2 - N(H) - C(=NR_6) [N(R_6)_2]$  から選択され；ここにおいて各  $R_6$  は独立して、H、 $C_1 - C_{1-2}$ アルキル、置換  $C_1 - C_{1-2}$ アルキル、 $C_2 - C_1$ アルケニル、置換  $C_2 - C_1$ アルケニル、 $C_2 - C_1$ アルキニル、置換  $C_2 - C_1$ アルキニル、或いは保護基であり、ここにおいて前記置換基は、ハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、アジド、シアノ、ハロアルキル、アルケニル、アルコキシ、チオアルコキシ、ハロアルコキシ、或いはアリールである。

10

【0031】

1実施形態において、各2'置換基は独立して、 $O(CH_2)_0-2CH_3$ 、 $O(CH_2)_2?OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $OCH_2C(H)CH_2$ 、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$  或いは  $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$  である。別の実施形態において、各2'置換基は独立して、 $OCH_3$  或いは  $O?(CH_2)_2?OCH_3$  である。更なる実施形態において、各2'置換基は  $O?(CH_2)_2?OCH_3$  である。

20

【0032】

1実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドは独立して、1～5個の結合バイラジカル基を有する。別の実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドは独立して、2或いは3個の結合バイラジカル基を有する。別の実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドは2個の結合バイラジカルを有する。

【0033】

1実施形態において、二環性糖修飾ヌクレオシドの各架橋基は独立して、 $?CH_2 -$ 、 $-(CH_2)_2 -$ 、 $-CH_2 - O -$ 、 $-(CH_2)_2 - O -$  或いは  $-CH_2 - N(R_3) - O -$  であり、ここにおいて  $R_3$  はH或いは  $C_1 - C_{1-2}$ アルキルである。別の実施形態において、各架橋基は独立して、 $-CH_2 - O -$  或いは  $-(CH_2)_2 - O -$  である。

30

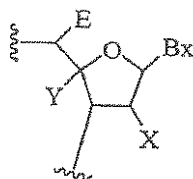
【0034】

1実施形態において、各二環性糖修飾ヌクレオシドの糖立体配置は独立して、ベータ?D或いはアルファ?Lである。

【0035】

特定の実施形態において、前記安定化ヌクレオシドのそれぞれは独立して、以下の化学式：

【化2】



I

40

【0036】

を有し、ここにおいて：

$Bx$  は複素環塩基部位であり；

$E$  は、H、 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニル、置換  $C_1 - C_6$ アルキル、置換  $C_2 - C_6$ アルケニル或いは置換  $C_2 - C_6$ アルキニルであり

50

YはHであり、XはO - C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキル、O - C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルケニル、O - C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルキニル、置換O - C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキル、置換O - C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルケニル、置換O - C<sub>2</sub> - C<sub>10</sub> アルキニル、アミノ、置換アミノ或いはアジドである、或いはXはHであり、YはC<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキル、置換C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub> アルキル、アミノ、或いは置換アミノである；若しくは、

Y及びXは共に、-O-、-S-、-N(R<sub>4</sub>)-、-C(R<sub>4</sub>)(R<sub>5</sub>)-、-C(R<sub>4</sub>)=C(R<sub>4</sub>)-、-C(R<sub>4</sub>)=N-、-C(=NR<sub>4</sub>)-、-Si(R<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-、-S(=O)<sub>2</sub>-、-SO-、-C(=O)-及び-C(=S)-から独立して選択された1～8個の結合バイラジカル基を有する架橋基を有し；

各R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>は独立して、H、ヒドロキシル、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アルキル、置換C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルケニル、置換C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルキニル、置換C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルキニル、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> アリール、置換C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 脂環ラジカル、置換C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> 脂環ラジカル、ハロゲン、置換オキシ(-O-)、アミノ、置換アミノ、アジド、カルボキシル、置換カルボキシル、アシル、置換アシル、CN、チオール、置換チオール、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>-H)、置換スルホニル、スルホキシル(S(=O)-H)或いは置換スルホキシルであり；

各置換基は独立して、ハロゲン、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アルキル、置換C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アルキル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルケニル、置換C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルケニル、C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルキニル、置換C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> アルキニル、アミノ、置換アミノ、アシル、置換アシル、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アミノアルキル、C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アミノアルコキシ、置換C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アミノアルキル、置換C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> アミノアルコキシ、或いは保護基である。

#### 【0037】

1実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>はそれぞれ独立して、1～約3である。別の実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>はそれぞれ独立して2～約3である。更なる実施形態において、n<sub>1</sub>は1或いは2であり、n<sub>3</sub>は2若しくは3である。別の実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>はそれぞれ2である。

#### 【0038】

1実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>の少なくとも一つはゼロより大きい。別の実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>はそれぞれゼロより大きい。他の実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>の一つはゼロより大きい。更なる実施形態において、n<sub>1</sub>及びn<sub>3</sub>の一つは1より大きい。

#### 【0039】

1実施形態において、n<sub>2</sub>は16～20である。別の実施形態において、n<sub>2</sub>は17～19である。

#### 【0040】

1実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドの約2～約8個は安定化ヌクレオシドである。別の実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドの約2～約6個は安定化ヌクレオシドである。更なる実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドの約3～約4個は安定化ヌクレオシドである。更なる実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドの3個は安定化ヌクレオシドである。

#### 【0041】

1実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドのそれぞれは、2～約8個の-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドによって、前記Nu<sub>3</sub>安定化ヌクレオシドとは分離されている。他の実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドのそれぞれは、3～約8個の-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドによって、前記Nu<sub>3</sub>安定化ヌクレオシドとは分離されている。更なる実施形態において、前記Nu<sub>2</sub>ヌクレオシドのそれぞれは、5～約8個の-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドによって、前記Nu<sub>3</sub>安定化ヌクレオシドとは分離

10

20

30

40

50

されている。

【 0 0 4 2 】

1 実施形態において、オリゴマー化合物は 2 ～ 約 6 個の  $Nu_2$  安定化ヌクレオシドから成る。別の実施形態において、オリゴマー化合物は 3 個の  $Nu_2$  安定化ヌクレオシドから成る。

【 0 0 4 3 】

1 実施形態において、前記  $Nu_2$  安定化ヌクレオシドのそれぞれは、1 つの連続配列において結合している。別の実施形態において、少なくとも 2 個の前記  $Nu_2$  安定化ヌクレオシドは、少なくとも 1 個の前記 - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドによって分離されている。更なる実施形態において、前記  $Nu_2$  安定化ヌクレオシドのそれぞれは、少なくとも 1 個の前記 - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドによって分離されている。

10

【 0 0 4 4 】

1 実施形態において、前記  $Nu_2$  - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドの少なくとも 2 つの連続配列は、少なくとも 1 個の前記安定化ヌクレオシドによって分離されており、ここにおいて、前記連続配列のそれぞれは同数の - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有するものである。

【 0 0 4 5 】

1 実施形態において、前記オリゴマー化合物は、約 18 ～ 約 26 個長のヌクレオシドを有するものである。別の実施形態において、前記オリゴマー化合物は、約 19 ～ 約 24 個長のヌクレオシドを有するものである。

20

【 0 0 4 6 】

1 実施形態において、 $T_1$  及び  $T_2$  はそれぞれ独立して、H 或いはヒドロキシル保護基である。別の実施形態において、少なくとも 1 つの  $T_1$  及び  $T_2$  は 4, 4' ジメトキシトリチルである。更なる実施形態において、少なくとも 1 つの  $T_1$  及び  $T_2$  は共役基と任意に結合するものである。付加的な実施形態において、少なくとも 1 つの  $T_1$  及び  $T_2$  はキャップ基である。更なる実施形態において、前記キャップ基は逆位デオキシ脱塩基である。

【 0 0 4 7 】

1 実施形態において、各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は独立して、ホスホジエステル或いはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基である。別の実施形態において、各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合基である。更なる実施形態において、各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  の少なくとも 1 つは、ホスホジエステルヌクレオシド間結合基によって提供される安定性と比較して、ヌクレアーゼ分解に対して増強された安定性を提供する安定化ヌクレオシド間結合基である。更なる実施形態において、各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は、安定化ヌクレオシド間結合基である。付加的な実施形態において、前記安定化ヌクレオシド間結合基のそれぞれは、リン含有ヌクレオシド間結合基である。別の実施形態において、前記安定化ヌクレオシド間結合基のそれぞれは独立して、リン含有ヌクレオシド間結合基、或いは非リン含有ヌクレオシド間結合基である。

30

【 0 0 4 8 】

本発明は、ヌクレオシドの連続配列を有し、及び以下の化学式 I :

$T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$  であって、ここにおいて :

$Nu_1$  及び  $Nu_5$  は独立して、2' 安定化ヌクレオシドであり ;

$Nu_2$  及び  $Nu_4$  は - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり ;

$Nu_3$  は 2' 修飾ヌクレオシドであり ;

$n_1$  及び  $n_5$  のそれぞれは独立して、0 ～ 3 であり ;

$n_2 + n_4$  の合計は 10 ～ 25 の間であり ;

$n_3$  は 0 ～ 5 であり ;

40

50

$T_1$  及び  $T_2$  のそれぞれは独立して、H、ヒドロキシル保護基、任意に結合した共役基、  
 、或いはキャップ基である、

を有するオリゴマー化合物を提供するものである。

【0049】

1実施形態において、 $n_2$  及び  $n_4$  の合計は16 或いは17 である。別の実施形態において、 $n_1$  は2 であり； $n_3$  は2 であり； $n_5$  は2 である。

【0050】

特定の実施形態において、化学式 I は以下から選択されるものである。

- a) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 19, n_3 = 0, n_4 = 0, n_5 = 2$ 、
- b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、
- c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、
- d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、
- e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、
- g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、
- h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、
- i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、
- j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、
- k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、
- l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、
- m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、
- n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、
- o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 6, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、
- q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、
- r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、
- s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、
- t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、
- u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、
- v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、
- w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、
- x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、
- y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、
- z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、
- bb) 化学式 I :  $n_5 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は
- cc) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$

【0051】

いくつかの実施形態において、 $Nu_1$  及び  $Nu_5$  は独立して、2' 修飾ヌクレオシドである。

【0052】

1実施形態において、 $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $T_1$  はH であり、 $T_2$  はH であり、化学式 I は以下から選択されるものである。

- a) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 19, n_3 = 0, n_4 = 0, n_5 = 2$ 、
- b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、
- c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、
- d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、
- e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、
- f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、

- g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、  
 o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 6, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、  
 q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 bb) 化学式 I :  $n_5 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は  
 cc) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

10

20

## 【0053】

1 実施形態において、前記オリゴマー化合物は、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を有するものである。別の実施形態において、各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。

## 【0054】

1 実施形態において、 $T_1$  はHであり $T_2$  はHである。

## 【0055】

30

本発明は、miRNA活性を阻害する方法を提供し、この方法は、ヌクレオシド間結合基によって結合された約17～約29個のヌクレオシドの連続配列を有するオリゴマー化合物を細胞と接触させる工程であって、前記配列は2つの外部領域間に位置した内部領域を有し、各外部領域は独立して1～約3個のヌクレオシドを有し、各外部領域は安定化ヌクレオシドを有し、前記内部領域は少なくとも10個の - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有し、前記安定化ヌクレオシドのそれぞれは、 - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドに関連した増強されたヌクレアーゼ安定性を提供するものである、工程を有し、ここにおいて前記オリゴマー化合物は、miRNAに対して実質的に相補的な配列を有するものである。

## 【0056】

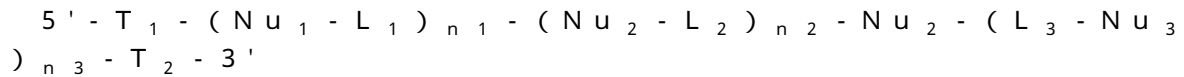
40

本発明はさらに、miRNA活性を阻害する方法を提供し、この方法は、miRNAに対して実質的に相補的な配列を有し、ヌクレオシド間結合基によって結合した約17～約29個のヌクレオシドの連続配列を有するオリゴマー化合物を細胞へ接触させる工程を有し、前記配列は2つの外部領域の間に位置した内部領域を有し、各外部領域は独立して1～約3個のヌクレオシドを有し、各外部領域は安定化修飾を有し、前記内部領域は少なくとも10個の - D - 2' - デオキシ - 2' - フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有するものである。

## 【0057】

本発明は付加的に、miRNA活性を阻害する方法を提供し、この方法は、miRNAに対して実質的に相補的な配列を有し、以下の化学式：

50



であって、ここにおいて：

各  $Nu_1$  及び  $Nu_3$  は独立して、安定化ヌクレオシドであり；

少なくとも 10 個の  $Nu_2$  は、 $-D-2'$ -デオキシ- $2'$ -フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり；

各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は独立して、ヌクレオシド間結合基であり；

各  $T_1$  及び  $T_2$  は独立して、H、ヒドロキシル保護基、任意に結合した共役基、或いはキャップ基であり；

$n_1$  は 0 ~ 約 3 であり；

$n_2$  は約 14 ~ 約 22 であり；

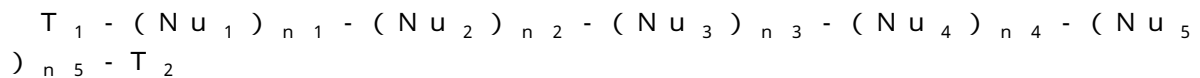
$n_3$  は 0 ~ 約 3 であり；

$n_1$  が 0 である場合  $T_1$  は H 或いはヒドロキシル保護基ではなく、 $n_3$  が 0 の場合  $T_2$  は H 或いはヒドロキシル保護基ではないという条件である；

を持つ、オリゴマー化合物を細胞へ接触させる工程を有するものである。

#### 【0058】

本発明はさらに、miRNA 活性を阻害する方法も提供し、この方法は、miRNA に対して実質的に相補的な配列を有し、以下の化学式：



であって、ここにおいて：

$Nu_1$  及び  $Nu_5$  は独立して、 $2'$ 安定化ヌクレオシドであり；

$Nu_2$  及び  $Nu_4$  は、 $-D-2'$ -デオキシ- $2'$ -フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり；

$Nu_3$  は、 $2'$ -修飾ヌクレオシドであり；

$n_1$  及び  $n_5$  はそれぞれ独立して 0 ~ 3 であり；

$n_2 + n_4$  の合計は 10 ~ 25 の間であり；

$n_3$  は 0 ~ 5 であり；

$T_1$  及び  $T_2$  のそれぞれは独立して、H、ヒドロキシル保護基、任意に連結した共役基、或いはキャップ基である；

を持つオリゴマー化合物を細胞へ接触させる工程を有するものである。

#### 【0059】

1 実施形態において、前記オリゴマー化合物は、miRNA に対して完全に相補的である。他の実施形態において、前記オリゴマー化合物は、配列 ID 番号 1 ~ 470 から選択された配列を有するものである。

#### 【0060】

1 実施形態において、前記細胞はインビトロである。別の実施形態において、前記細胞はインビボである。他の実施形態において、前記細胞へ接触させる工程は、動物へ投与する工程を有する。

#### 【0061】

1 実施形態において、前記方法は、本発明のオリゴマー化合物を動物へ接触させることによるインビボでの miRNA 活性の阻害を有するものである。

#### 【0062】

本発明は、インビボでの miR-122 活性を阻害する方法を提供し、この方法は、配列 ID 番号：19 の核酸塩基を有し、化学式  $T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$  であって、ここにおいて  $Nu_1$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_3$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $Nu_5$  は  $O - (CH_2)_2 - OCH_3$  であり、 $T_1$  は H であり、 $T_2$  は H であり、ここにおいて化学式 I は以下から選択されるものである。

a) 化学式 I： $n_1 = 2$ ， $n_2 = 19$ ， $n_3 = 0$ ， $n_4 = 0$ ， $n_5 = 2$ 、

10

20

30

40

50

- b) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 3, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 c) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 3, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 d) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 3, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 e) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 3, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 f) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 14, n_3 = 3, n_4 = 2, n_5 = 2$ 、  
 g) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 3, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 h) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 3, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 i) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 3, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 j) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 3, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 k) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 3, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 l) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 3, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 m) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 3, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 n) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 3, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、  
 o) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 6, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 p) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 2, n_3 = 2, n_4 = 15, n_5 = 2$ 、  
 q) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 3, n_3 = 2, n_4 = 14, n_5 = 2$ 、  
 r) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 4, n_3 = 2, n_4 = 13, n_5 = 2$ 、  
 s) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 5, n_3 = 2, n_4 = 12, n_5 = 2$ 、  
 t) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 6, n_3 = 2, n_4 = 11, n_5 = 2$ 、  
 u) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 7, n_3 = 2, n_4 = 10, n_5 = 2$ 、  
 v) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 8, n_3 = 2, n_4 = 9, n_5 = 2$ 、  
 w) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 9, n_3 = 2, n_4 = 8, n_5 = 2$ 、  
 x) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 10, n_3 = 2, n_4 = 7, n_5 = 2$ 、  
 y) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 11, n_3 = 2, n_4 = 6, n_5 = 2$ 、  
 z) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 12, n_3 = 2, n_4 = 5, n_5 = 2$ 、  
 aa) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 13, n_3 = 2, n_4 = 4, n_5 = 2$ 、  
 bb) 化学式 I :  $n_5 = 2, n_2 = 14, n_3 = 2, n_4 = 3, n_5 = 2$ 、又は  
 cc) 化学式 I :  $n_1 = 2, n_2 = 15, n_3 = 2, n_4 = 2, n_5 = 2$ 。

10

20

## 【0063】

化学式を持つオリゴマー化合物で動物を接触させる工程を有するものである。

30

## 【0064】

1 実施形態において、インビボで *miR-122* 活性を阻害する前記方法はさらに、肝臓 *ALDOA mRNA* レベルを増加させる工程を有するものである。別の実施形態において、インビボで *miR-122* 活性を阻害する前記方法はさらに、血漿総コレステロールレベルを減少させる工程を有するものである。

## 【0065】

1 実施形態において、オリゴマー化合物は 20 ~ 24 個の結合ヌクレオシドを有するものである。別の実施形態において、オリゴマー化合物は 21 個の結合ヌクレオシドを有するものである。更なる実施形態において、オリゴマー化合物は 22 個の結合ヌクレオシドを有するものである。付加的な実施形態において、オリゴマー化合物は 23 個の結合ヌクレオシドを有するものである。

40

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0066】

*miRNA* は病的状態において異常に発現することが見出されている。例えば、健康な細胞又は組織と比較すると、特定の *miRNA* は病的細胞又は組織においてより高いもしくは低いレベルで存在する。本発明は特に、病的状態に付随するものを含む *miRNA* 活性を調整する組成及び方法を提供するものである。本発明に係る特定の組成物は強力な活性及び/または改善された治療インデックスを有するため、インビボの方法に使用するのに特に適している。

## 【0067】

50

オリゴマー化合物中の化学的に合成されたヌクレオチドの使用は、miRNAのようなスモールノンコーディングRNAに結合/調整するオリゴマーの能力に影響を与えるということが知られている。さらにオリゴマー化合物中に化学的に修飾されたヌクレオチドを配置すると、オリゴマー化合物の治療インデックスが影響を受けることが見出されている。本発明は特に、miRNAのようなスモールノンコーディングRNAの調整に使用する、強い活性及び改善された治療インデックスを有するオリゴマー化合物を提供する。

#### 【0068】

二つの2'-MOE安定化ヌクレオシドによって5'及び3'各末端の側方に配置された19'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドを有するオリゴマー化合物のインビボ試験において、前記オリゴマー化合物は、2'-均一(uniform)MOEオリゴマー化合物のT<sub>m</sub>と同じT<sub>m</sub>を有するが、インビボでmiRNAを抑制する大幅に増強された能力を示していた。したがって、本発明は、とりわけ、各々がヌクレオシド間結合基によって結合したヌクレオシドの近接した配列を含む、化学的に合成されたオリゴマー化合物を提供する。各オリゴマー化合物は約10の'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドを含み、さらに、安定化ヌクレオシドを含む1もしくはそれ以上の外部領域を含む。一つの態様では、オリゴマー化合物の各ヌクレオシドは'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、3'及び5'末端ヌクレオシドの一方または両方が抱合基またはキャッピング基に結合している。さらなる態様では、前記オリゴマー化合物の少なくとも10のヌクレオシドが'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、1もしくはそれ以上の付加的な安定化ヌクレオシドが3'及び5'末端の一方または両方に結合している。

#### 【0069】

さらなる試験によって、前記オリゴマー化合物の治療係数はオリゴマー化合物の内部領域にあるヌクレオチドまたはヌクレオシドを取り入れることによって改善されうることが証明された。2'-MOE安定化ヌクレオシドによって5'及び3'各末端の側方に配置された'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドの内部領域を含み、さらに内部領域に2'-MOEヌクレオシドを含むオリゴマー化合物が、内部2'MOEヌクレオシドなしのオリゴマー化合物に比べて、減少した免疫刺激活性を有することが示された。したがって、本発明はとりわけ、オリゴマー化合物であって、このオリゴマー化合物の少なくとも10のヌクレオシドが'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであって、1もしくはそれ以上の付加的な安定化ヌクレオシドが3'及び5'末端の一方または両方に結合しており、更に2'MOEヌクレオシドが前記オリゴマー化合物の一もしくはそれ以上の内部の位置に含まれているオリゴマー化合物を提供する。特定の実施形態においては、前記オリゴマー化合物の少なくとも10のヌクレオシドが'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、1もしくはそれ以上の付加的な安定化ヌクレオシドが3'及び5'末端の一方または両方に結合しており、更に2'-修飾ヌクレオシドがオリゴマー化合物の1もしくはそれ以上の内部の位置に含まれる。他の実施形態においては、前記オリゴマー化合物の少なくとも10のヌクレオシドが'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、1もしくはそれ以上の付加的な安定化修飾が3'及び5'末端の一方または両方に結合しており、安定化ヌクレオシドが前記オリゴマー化合物の1もしくはそれ以上の内部位置に含まれる。一般的に、前記3'及び5'末端における安定化修飾は'-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドだけを有するオリゴマー化合物に比較して、増強した安定性を提供する。特定の実施形態においては、安定化修飾は安定化ヌクレオシド及び/または安定化ヌクレオシド間結合基である。

#### 【0070】

強い活性と改善された治療係数を有するオリゴマー化合物は以下の化学式で説明することが可能であり、 $T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$ 、式中、 $Nu_1$  及び  $Nu_5$  は独立して2'安定化ヌクレオシ



ドであり、 $Nu_2$  及び  $Nu_4$  は -D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシドであり、 $Nu_3$  は 2'-修飾ヌクレオシドであり、 $n_1$  及び  $n_5$  の各々は独立して 0 ~ 3 であり、 $n_2$  及び  $n_4$  の和は 10 ~ 25 の間であり、 $n_3$  は 0 ~ 5 であり、 $T_1$  は  $T_2$  の各々は独立して H、ヒドロキシル保護基、任意に結合した抱合基またはキャッピング基である。

#### 【0071】

一つの実施形態において、オリゴマー化合物は、次のように、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ 、 $n_4$ 、及び  $n_5$  の構造を有するものであることがさらに説明される。

#### 【0072】

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 19$  ,  $n_3 = 0$  ,  $n_4 = 0$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 A )、

10

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 2$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 14$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 B )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 5$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 11$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 C )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 8$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 8$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 D )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 11$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 5$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 E )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 14$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 2$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 F )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 9$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 7$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 G )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 10$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 6$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 H )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 12$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 4$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 I )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 3$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 13$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 J )、

20

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 4$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 12$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 K )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 6$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 10$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 L )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 7$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 9$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 M )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 13$  ,  $n_3 = 3$  ,  $n_4 = 3$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 N )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 8$  ,  $n_3 = 6$  ,  $n_4 = 5$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 O )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 2$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 15$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 P )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 3$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 14$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 Q )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 4$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 13$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 R )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 5$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 12$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 S )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 6$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 11$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 T )、

30

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 7$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 10$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 U )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 8$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 9$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 V )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 9$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 8$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 W )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 10$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 7$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 X )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 11$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 6$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 Y )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 12$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 5$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 Z )、

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 13$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 4$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 AA )、

$n_5 = 2$  ,  $n_2 = 14$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 3$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 BB )、又は

$n_1 = 2$  ,  $n_2 = 15$  ,  $n_3 = 2$  ,  $n_4 = 2$  ,  $n_5 = 2$  ( 立体構造 CC )。

#### 【0073】

特定の実施形態においては、表 1 で示されているように、オリゴマー化合物はヌクレオチド配列及び化学式 I の次のような組み合わせを有することが可能であり、各々のヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基によって結合している。他の実施形態において、表 1 で示されている化学式 I の例は、23 個の結合ヌクレオシドを含むあらゆるオリゴマー化合物に適用される。

40

#### 【0074】

【表 1】

表 1

配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
19	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
19	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【 0 0 7 5 】

98	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
98	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

99	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
99	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
102	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40

111	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
111	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	9	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	10	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	12	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	3	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	4	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	6	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	7	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	13	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	8	6	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	2	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	3	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	4	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	5	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	6	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40

112	2	7	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	8	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	9	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	10	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	11	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	12	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	13	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	14	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
112	2	15	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

## 【 0 0 7 9 】

特定の実施形態において、表 2 で示されているように、オリゴマー化合物はヌクレオチド配列と化学式 I の次のような組み合わせを有することが可能であり、各々のヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基によって結合している。他の実施形態において、表 2 で示されている化学式 I の例は 2 2 個の結合ヌクレオシドを含むあらゆるオリゴマー化合物に適用される。

## 【 0 0 8 0 】

## 【 表 2 】

表 2

20

配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
1	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

30

40

## 【 0 0 8 1 】

1	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
1	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
2	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【 0 0 8 2 】

6	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
6	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
20	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40



45	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
45	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40

60	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
60	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
80	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【 0 0 8 5 】

100	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
100	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

10

20

30

40

103	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
103	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	18	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	2	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	5	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	8	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	11	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	9	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	10	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	12	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	3	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	4	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	6	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	7	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	13	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	8	6	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	2	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	3	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	4	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	5	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	6	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	7	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	8	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	9	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	10	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	11	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	12	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	13	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
113	2	14	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【 0 0 8 7 】

特定の実施形態において、表 3 で示されているように、オリゴマー化合物はヌクレオチド配列と化学式 I の次のような組み合わせを有することが可能であり、各々のヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基によって結合している。他の実施形態において、表 3 で示されている化学式 I の例は 2 1 個の結合ヌクレオシドを含むあらゆるオリゴマー化合物に適用される。

## 【 0 0 8 8 】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
463	2	17	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	2	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	5	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	8	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	11	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	9	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	10	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	12	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	3	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	4	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	6	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	7	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	8	6	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	2	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	3	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	4	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	5	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	6	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	7	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	8	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	9	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	10	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	11	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	12	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
463	2	13	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【 0 0 8 9 】

特定の実施形態において、表 4 で示されているように、オリゴマー化合物はヌクレオチド配列と化学式 I の次のような組み合わせを有することが可能であり、各々のヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基によって結合している。他の態様において、表 4 で示されている化学式 I の例は 20 個の結合ヌクレオシドを含むあらゆるオリゴマー化合物に適用される。

## 【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
64	2	16	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	2	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	5	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	8	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	11	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	9	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	10	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	3	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	4	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	6	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	7	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	8	6	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	2	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	3	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	4	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	5	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	6	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	7	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	8	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	9	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	10	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	11	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
64	2	12	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【 0 0 9 1 】

特定の実施形態において、表 5 で示されているように、オリゴマー化合物はヌクレオチド配列と化学式 I の次のような組み合わせを有することが可能であり、各々のヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合基によって結合している。他の態様において、表 5 で示されている化学式 I の例は 2 4 個の結合ヌクレオシドを含むあらゆるオリゴマー化合物に適用される。

## 【 0 0 9 2 】

【表 5】

表 5

配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
47	2	20	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	2	3	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	5	3	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	8	3	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	11	3	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	14	3	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	9	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	10	3	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	12	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	3	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	4	3	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	6	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	7	3	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	13	3	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	8	6	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	2	2	16	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	3	2	15	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	4	2	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	5	2	13	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	6	2	12	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	7	2	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	8	2	10	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	9	2	9	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	10	2	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	11	2	7	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	12	2	6	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	13	2	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	14	2	4	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	15	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	15	2	3	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
47	2	16	2	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

## 【 0 0 9 3 】

さらなる実施形態において、上述した構造を有することに加えて、前記オリゴマー化合物は安定化ヌクレオチドとしてNu<sub>1</sub>、Nu<sub>3</sub>、及びNu<sub>5</sub>の各々を有するように記載される。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は上述したモチーフを有することが可能であり、Nu<sub>1</sub>、Nu<sub>3</sub>、及びNu<sub>5</sub>の各々は2'-MOEである。さらなる実施形態において、各ヌクレオチド間結合はホスホロチオエートヌクレオチド間結合である。

## 【 0 0 9 4 】

本発明のオリゴマー化合物は結合ヌクレオチドの連続配列を有し、以下の化学式によっ

10

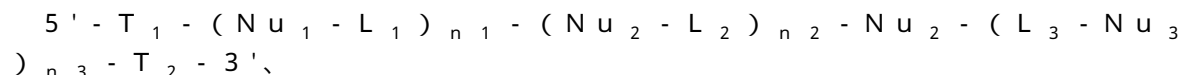
20

30

40

50

ても記載することが可能であり、



式中、

各  $Nu_1$  及び  $Nu_3$  は独立して安定化ヌクレオシドであり、

少なくとも 10 個の  $Nu_2$  は  $-D-2'-デオキシ-2'-フルオロリボフラノシルヌクレオシド$  であり、

各  $L_1$ 、 $L_2$  及び  $L_3$  は独立してヌクレオシド間結合基であり、

各  $T_1$  及び  $T_2$  は独立して H、ヒドロキシ保護基、選択的に結合した抱合基またはキャッピング基であり、

$n_1$  は 0 ~ 約 3 であり、

$n_2$  は 14 ~ 約 22 であり、

$n_3$  は 0 ~ 約 3 であり、及び

但し、 $n_1$  が 0 でない場合は、 $T_1$  は H またはヒドロキシ保護基でなく、 $n_3$  が 0 の場合、 $T_2$  は H またはヒドロキシ保護基ではないものである。

オリゴマー化合物は、配列 ID 番号 1 ~ 470 から選択された近接ヌクレオチド配列に適用される本願明細書に記載された化学式を有するものであっても良い。

#### 【0095】

「安定化修飾」は、ヌクレアーゼの存在下において、ホスホジエステルヌクレオシド間結合によって結合した 2'-デオキシヌクレオシドによって提供されるものと比較して、増強した安定性を提供することを意味する。このように、そのような修飾がオリゴマー化合物に「増強したヌクレアーゼ安定性」を提供する。安定化修飾は少なくとも安定化ヌクレオシド及び安定化ヌクレオシド間結合基を含む。

#### 【0096】

「安定性増強ヌクレオシド」又は「安定化ヌクレオシド」という用語は、オリゴマー化合物の増強したヌクレアーゼの安定性を提供するための、当業者に周知のヌクレオシドの全ての様式を含むことを意味する。一つの実施形態において、安定化ヌクレオシドは 2'-修飾ヌクレオシドであっても良い。そのような安定性を増強する 2'-修飾ヌクレオシドの例は、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)、2環糖修飾ヌクレオシド、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、メトキシ(-O-CH<sub>3</sub>)、アミノプロポキシ(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)、アリル(-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、-O-アリル(-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>)、及び 2'-アセトアミド(2'-O-CH<sub>2</sub>C(=O)NR<sub>1</sub>R<sub>1</sub>)であって、各 R<sub>1</sub> は独立して、H 又は C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>アルキルであるものを含むが、これらに限定されない。

#### 【0097】

そのような 2'-修飾ヌクレオシドの調製を教示する代表する米国特許は米国特許第 4, 第 981, 957 号、第 5, 118, 800 号、第 5, 319, 080 号、第 5, 359, 044 号、第 5, 393, 878 号、第 5, 446, 137 号、第 5, 466, 786; 5, 第 514, 785 号、第 5, 519, 134 号、第 5, 567, 811 号、第 5, 576, 427 号、第 5, 591, 722 号、第 5, 597, 909 号、第 5, 610, 300、第 5, 627, 053 号、第 5, 639, 873 号、第 5, 646, 265 号、第 5, 658, 873 号、第 5, 670, 633 号、第 5, 792, 747 号、及び第 5, 700, 920 号明細書を含むが、これらに限定されるものではなく、それらのうちのあるものは本出願と共に所有されており、その各々は本参照により本願明細書に組み込まれるものである。

#### 【0098】

一つの態様において、本発明は少なくとも一つの安定性増強ヌクレオシド間結合を有す

10

20

30

40

50



るオリゴマー化合物を提供する。「安定性増強ヌクレオシド間結合」又は「安定化ヌクレオシド間結合基」という用語は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合によって提供されるものと比較して、オリゴマー化合物に増強したヌクレアーゼの安定性を提供する、ヌクレオシド間結合基の全ての様式を含むことを意味する。このように安定性増強ヌクレオシド間結合はホスホジエステルヌクレオシド間結合以外の結合である。そのような安定化増強ヌクレオシド間結合の例はホスホチオエートヌクレオシド間結合を含むが、これらに限定されるものではない。

#### 【0099】

安定性増強ヌクレオシド間結合の調製を教示する代表する米国特許は米国特許第3,687,808号、第5,286,717号、第5,587,361号、第5,672,697号、第5,489,677号、第5,663,312号、第5,646,269号、及び第5,677,439号明細書を含むが、これらに限定されるものではなく、その各々は本参照により本願明細書に組み込まれる。

#### 【0100】

本願明細書において提供されるオリゴマー化合物の例は、スモールノンコーディングRNAに対して100%の相補性を含む、実質的に相補的である核酸塩基配列を含む。そのようなオリゴマー化合物例はスモールノンコーディングRNAにハイブリダイズでき、更に活性を調節することが可能である。一つの実施形態において、オリゴマー化合物がハイブリダイズするスモールノンコーディングRNAはmiRNAである。

#### 【0101】

さらに、スモールノンコーディングRNAのレベル、発現、処理、又は機能を調節するための方法が提供されている。本発明のオリゴマー化合物は、スモールノンコーディングRNA核酸標的物を含む又はコードした核酸にハイブリダイズすることによって、スモールノンコーディングRNAのレベル、発現、機能を調節し、その結果正常機能を変化させることができる。一つの実施形態において、正常機能の変化は、切断を通して、隔離によって、または立体的に閉塞させることによって、スモールノンコーディングRNAの破壊を促進するオリゴマー化合物の能力による。他の実施形態において、前記オリゴマー化合物はスモールノンコーディングRNAに安定してハイブリダイズし、スモールノンコーディングRNAが正常細胞標的にハイブリダイズすること、及び正常細胞標的の活性を制御することを抑制する。一つの実施形態において、前記調節はmiRNAの機能を抑制することを含む。

#### 【0102】

本願明細書において提供される方法は、動物においてmiRNA活性を抑制する方法を含み、この方法は、強い活性及び改善された治療係数を有するオリゴマー化合物を動物に接触させる工程を含む。一部の実施形態において、前記オリゴマー化合物は配列ID番号1~470から選択される配列の、少なくとも18の近接ヌクレオチドを含む。他の実施形態において、オリゴマー化合物は配列ID番号1~470から選択される配列の、少なくとも20の近接ヌクレオチドを含む。他の実施形態において、オリゴマー化合物は配列ID番号1~470から選択される配列から成る。

#### 【0103】

本願明細書において提供される実施形態は、動物でコレステロールを減少させる方法を含み、この方法は、動物、特にヒトで強い活性及び改善された治療係数を有するオリゴマー化合物を投与する工程を含む。一つの実施形態において、miR-122aは本発明のオリゴマー化合物で標的化されている。

#### 【0104】

本願明細書において、オリゴマー化合物及びオリゴマー化合物を含む組成物が提供され、前記オリゴマー化合物は、分解又は切断メカニズムによってスモールノンコーディングRNAのレベル、発現、または機能の調節をサポートすることができる化合物になる1もしくはそれ以上の修飾を含む。

#### 【0105】

更に、本願明細書は、オリゴマー化合物及びオリゴマー化合物を含む組成物が提供され、前記オリゴマー化合物は立体的な閉鎖によって、１もしくはそれ以上のスモールノンコーディングRNAのレベル、発現、または機能を阻害する又は妨げることができる化合物になる１もしくはそれ以上の修飾を含む。

【0106】

「治療係数」は所望の効果を引き起こす用量に対する望ましくない効果をもたらすオリゴマー化合物の用量の比を意味する。本開示の本脈において、オリゴマー化合物は、活性は保持されているが、望ましくない効果が減少又ははない場合、「改善した治療係数」を示す。例えば、改善された治療係数を有するオリゴマー化合物は、免疫刺激活性のような望ましくない効果をもたらすことなく、又は少なくとも化合物の投与を禁止させる程度の望ましくない効果をもたらすことなく、miRNA活性を抑制する能力を保持する。

10

【0107】

本願明細書で使用される「スモールノンコーディングRNA」という用語は、これらに限定されることはないが、長さが17から29ヌクレオチドの範囲のポリヌクレオチドを包含するために使用される。一つの実施形態では、スモールノンコーディングRNAはmiRNAである(microRNAs、Mirs、miRs、mirs、及び成熟したmiRNAsとしても知られている)。

【0108】

本願明細書で使用される「miRNA前駆物質」という用語は、miRNAに由来とされ、尚且つ、これらに限定されないが、一次RNA転写産物(primary RNA transcripts)、一次miRNA転写産物(pri-miRNAs)、及びmiRNA前駆体(pre-miRNAs)を含む任意のより長い核酸配列を包含するために使用される。

20

【0109】

本願明細書で使用される「miRNAファミリー」という用語は、ヌクレオチド配列によって関連している複数のmiRNAを指す。このように、miRNAファミリーのメンバーは本願明細書において「関連miRNA(related miRNA)」と名づけられている。miRNAファミリーの各メンバーは同一のシード配列(seed sequence)を共有している。本願明細書で使用される「シード配列(seed sequence)」という用語は成熟したmiRNA配列の5'末端からの2~6又は2~7ヌクレオチドを指す。miRNAファミリーの例は従来技術において周知であり、let-7ファミリー(9個のmiRNAsを有する)、miR-15ファミリー(miR-15a、miR-15b、miR-16-1、及びmiR-195を含む)、及びmiR-181ファミリー(miR-181a、miR-181b、及びmiR-181c)を含むが、これらに限定されない。

30

【0110】

本願明細書で使用されている「標的核酸」、「標的RNA」、「標的RNA転写産物」、又は「核酸標的物」という用語は、これらに限定されないが、RNAを含む標的にされ得るあらゆる核酸を包含するために使用される。一実施形態において、前記標的核酸は、これらに限定されないが、miRNA及びmiRNA前駆物質を含む非コード配列である。好ましい実施形態では、前記標的核酸はmiRNAであり、これはまたmiRNA標的物を指す場合もある。オリゴマー化合物は、オリゴマー化合物が実質的にmiRNAと100%相補性を含む配列を含む場合、「miRNA標的」である。

40

【0111】

本開示の文脈において、「機能調節」はスモールノンコーディングRNAの機能又は活性の変化、又はスモールノンコーディングRNAが関連し、又は下流の効果がもたらされるあらゆる細胞内成分の機能の変化を意味する。一つの実施形態において、機能調節はスモールノンコーディングRNAの活性の抑制である。

【0112】

本願明細書において使用される「調節」及び「発現の調節」は、スモールノンコーディ

50

ングRNA、核酸標的物、RNA又はスモールノンコーディングRNAに関連したタンパク質、又はスモールノンコーディングRNAの下流標的物（例えば、スモールノンコーディングRNAによって制御されたタンパク質をコードした核酸を表しているmRNA）の量又はレベルの増強（刺激）又は減少（抑制）のいずれかを意味する。抑制は調節の適切な形態であり、スモールノンコーディングRNAは適切な核酸標的物である。レベルが調節されたスモールノンコーディングRNAは、miRNA及びmiRNA前駆物質を含む。

#### 【0113】

##### オリゴマー化合物

本発明の文脈において「オリゴマー化合物」という用語は、少なくとも核酸標的物の領域にハイブリダイズすることができるポリマー構造を指す。一実施形態において、核酸標的物はmiRNAである。「オリゴマー化合物」という用語は、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣体、及びそれらの組み合わせを含む化合物を含むが、これらに限定されない。オリゴマー化合物はまたアンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、選択的スプライサー、プライマー、プローブ、及び標的核酸の少なくとも一部分をハイブリダイズする他の化合物を含むが、これらに限定されない。オリゴマー化合物又はオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に読み込まれたその核酸塩基配列が標的核酸の対応する領域の逆相補体を含む場合に、アンチセンスである。

#### 【0114】

一般的に、オリゴマー化合物は結合した単量体サブユニットの骨格を含み、ここで各々の結合した単量体サブユニットは直接又は間接的にヘテロ環塩基部分に結合している。単量体サブユニット、糖部分、又は糖代替物及びヘテロ環塩基部分に連結している結合は、独立して修飾することが可能であり、これらに限定されないが、均一物、ヘミマー、ギャップマー、位置的に修飾されたオリゴマー化合物を含む得られたオリゴマー化合物に対する複数のモチーフをもたらす。

#### 【0115】

例えば、修飾されたオリゴマー化合物は、増強した細胞内の取り込み、核酸標的物に対する増強した親和性、ヌクレアーゼ存在下において増加した安定性、及びスモールノンコーディングRNAの機能を修飾する増強された能力などの所望の特性のために、しばしば天然型よりも好ましい。本願明細書で使用されている「修飾」という用語は、オリゴヌクレオチドなどの出発又は天然のオリゴマー化合物から、置換及び/又はあらゆる変化を含む。オリゴマー化合物の修飾は、例えば以下に記載した、ヌクレオチド間の結合、糖部分、塩基部分の置換または変化を包含する。

#### 【0116】

オリゴマー化合物は通常、直鎖状に調製されるが、つなぎ合わせるか又は環状に調製することも可能であり、及び分岐したものも含む。分離したオリゴマー化合物はハイブリダイズされ、一端または両端において、平滑末端或いは突出端を含む、二本鎖化合物を形成する。

#### 【0117】

本発明に従ったオリゴマー化合物は、約12から約50単量体サブユニットを含む（例えば、約12から約50の結合したヌクレオシド）。当業者であれば、本発明が、長さが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、又は50サブユニットのオリゴマー化合物を具体化しているものであることが予想される。

#### 【0118】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は上記に例示したように、長さが15から30の単量体サブユニットである。

#### 【0119】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は本願明細書において例示したように、長さが17から29の単量体サブユニットである。

【0120】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は上記に例示したように、長さが18から26の単量体サブユニットである。

【0121】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は、長さが19、20、21、22、23、又は24サブユニットであるか、又は代わりに本発明のオリゴマー化合物は長さが19から24のサブユニットの範囲である。

【0122】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は、長さが21、22、23、又は24サブユニットであるか、又は代わりに当該発明のオリゴマー化合物は長さが21から24のサブユニットの範囲である。

【0123】

本願明細書において使用される「約」という用語は、その後の変数の $\pm 5\%$ の意味である。

【0124】

ハイブリダイゼーション

本発明の文脈において「ハイブリダイゼーション」はオリゴマー化合物の相補鎖の対形成を意味する。本発明において、対形成のメカニズムは、オリゴマー化合物の鎖の相補的なヌクレオシド又はヌクレオチド基（核酸塩基）の間の、ワトソン-クリック、フーグステーン、又は逆フーグステーン水素結合である水素結合を含む。例えば、アデニンとチミンは、水素結合の形成を通して対形成する相補的な核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは様々な状況下で生じる。

【0125】

オリゴマー化合物は、例えば、インビボアッセイまたは治療的処置の場合において生理学的な条件下、及びインビトロアッセイの場合において標準的なアッセイ条件下など、特異的なハイブリダイゼーションが望まれている条件下で、オリゴマー化合物の非標的核酸配列に対する非特異的な結合を避けるのに十分な程度の相補性がある時、「特異的にハイブリダイズすることができる」ものである。核酸標的物に特異的にハイブリダイズするオリゴマー化合物は、核酸標的物の正常機能を妨げ、結果的に活性を変え、機能を破壊し、又は標的核酸のレベルを調節する。

【0126】

「厳密なハイブリダイゼーションの条件」又は「厳密な条件」という表現は、本発明のオリゴマー化合物が特異的にその核酸標的物にハイブリダイズする条件を指す。厳密な条件は配列に依存しており、異なる環境で変化し、本文脈中では、オリゴマー化合物が核酸標的物にハイブリダイズする「厳密な条件」下は、オリゴマー化合物の性質及び組成、及びそれらを研究するアッセイによって決定される。当業者であれば実験的なプロトコールに変動性があることを理解し、最小の非特異的ハイブリダイゼーション現象のある厳密なハイブリダイゼーションに対して、条件が適切である時を決定できる。

【0127】

本願明細書で使用される「相補性」は、1つの核酸塩基がもう1つと正しく対形成する能力を言う。例えば、オリゴマー化合物の特定の位置にある単量体サブユニットが、核酸標的物の特定の位置にある単量体サブユニットと水素結合が可能である場合、前記位置は相補的な位置であると考えられる。逆に、単量体サブユニットが水素結合できない場合、その位置は「非相補的」とみなされる。各分子における十分な数の相補的な位置が、互いに水素結合可能な単量体のサブユニットによって占められている場合、オリゴマー化合物及び標的核酸はお互いに「実質的に相補的である」ものである。従って、「実質的に相補的」という用語は、安定且つ特異的な結合がオリゴマー化合物と標的核酸との間で生じるように、単量体サブユニットの十分な数を上回る正しい対形成の十分な程度を示すのに使

10

20

30

40

50

用される。「実質的に相補的」と「十分に相補的」という用語は、本願明細書においてほとんど同じ意味として使用されている。

【0128】

オリゴマー化合物は、特異的にハイブリダイズできるように、その標的核酸に対して100%相補的である必要はない。さらに、オリゴマー化合物は、介在する又は近接するセグメントがハイブリダイゼーションに関与しないように1もしくはそれ以上のセグメントにハイブリダイズすることが可能である(例えば、バルジ、ループ構造、ヘアピン構造)。「非相補性核酸塩基」は、標的核酸の中に対応する位置において、核酸塩基と正しい塩基の対を形成できないアンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基を意味する。一部の実施形態において、オリゴマー化合物が標的核酸に実質的に相補的であれば、オリゴマー化合物と標的核酸との間において「ミスマッチ(mismatch)」としても知られている非相補的な位置があり、そのような非相補的な位置はオリゴマー化合物と標的核酸の間で耐容性であっても良い。本願明細書において使用される「非相補性」、及び「ミスマッチ」という用語はほとんど同じ意味として使用される。3つまでのミスマッチはしばしば、オリゴマー化合物が標的核酸の活性を調節する能力を有意に減少させることなく、そのオリゴマー化合物の中で耐容性を示す。一部の実施形態において、ミスマッチは標的miRNAのシード配列に対して相補性のあるオリゴマー化合物の領域の外にあることが好ましい。好ましい実施形態において、前記オリゴマー化合物は標的miRNAに対して、0、1、又は2個のミスマッチを含む。より好ましい実施形態では、オリゴマー化合物は、標的miRNAに対して多くても1個のミスマッチを含む。

10

20

【0129】

オリゴマー化合物の各核酸塩基が核酸標的物に対応する位置において対形成を行うことができる場合、オリゴマー化合物及び核酸標的物は互いに「十分相補性がある」ものである。本願明細書において使用される「十分相補性がある」という用語は、オリゴマー化合物が標的miRNAと同じ長さのヌクレオチドの連続配列を含み、更に標的miRNAに対して十分に相補性があるということを意味する(例えば、miRNAの長さが22ヌクレオチドある場合、全長相補性オリゴマー化合物を有するオリゴマー化合物長さもまた22ヌクレオチドである)。一部の実施形態において、オリゴマー化合物が標的miRNAに対して全長相補性を有する。

【0130】

本願明細書において使用される「本質的に全長相補性がある」という用語は、二本鎖間の全長相補性を有し、さらにオリゴマー化合物と標的miRNAとの間において3つまでのミスマッチを含み、前記オリゴマー化合物はそれでもなお標的miRNAとハイブリダイズできるようになっており、更に前記オリゴマー化合物の機能は実質的に損なわれないとことを意図している。前記の用語はまた、標的miRNAの長さに関して6ヌクレオチドまでの切断又は延長を有するオリゴマー化合物を含み、前記切断または延長はオリゴマー化合物の3'または5'末端のいずれか、又はオリゴマー化合物の3'及び5'両末端に対する欠失又は追加であることを意味している。特定の実施形態において、前記オリゴマー化合物は、標的miRNAの長さ比べて、1又は2ヌクレオチドまで切断されている。限定されない例として、標的miRNAが22ヌクレオチドの長さであるならば、本質的に全長相補性のある当該オリゴマー化合物は長さが20又は21ヌクレオチドであっても良い。好ましい実施形態において、当該オリゴマー化合物は、オリゴマー化合物の3'または5'末端のいずれかにおいて、1ヌクレオチドまで切断されている。

30

40

【0131】

一部の実施形態において、当該オリゴマー化合物は、標的核酸の中の標的領域に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、或いは少なくとも95%配列相補性を有する。別の実施形態において、当該オリゴマー化合物は核酸標的物に対して100%相補性がある。

【0132】

オリゴマー化合物またはその一部は、オリゴマー化合物に対する定義された割合の同一

50

性を有するものであっても良い。この同一性はオリゴマー化合物の全長以上、或いはオリゴマー化合物の一部であっても良い（例えばオリゴヌクレオチドに対して、オリゴマー化合物の同一性の割合を決定するために、27塩基長の1～20核酸塩基が20塩基長と比較される）。オリゴマー化合物は、本願明細書において説明されているオリゴマー化合物と類似した機能をもたらすために、本願明細書において説明されているものと同じの配列を有する必要はない。本願明細書において教示されたオリゴヌクレオチドの短いバージョン（例えば欠失があるため同一ではない）、又は本願明細書において教示されたオリゴヌクレオチドと同じではない変形体（例えば一つの塩基が別のもので置換されている）は本発明の範囲内である。同一性の割合は、比較しているオリゴマー化合物と同じの塩基数によって計算される。同一でない塩基はお互いに隣接しているか、当該オリゴヌクレオチドに分散しているか、又はその両方である。

10

#### 【0133】

「標的領域」は少なくとも一つの同定できる配列、構造、機能、または特徴を有する、標的核酸の部分として定義されている。「標的セグメント」は、標的核酸の中にある特異的な標的領域のより小型又は副次的な部分として定義される。本発明で使用される「部位」は、標的核酸の中の特異的な位置として定義される。「5'標的部位」はオリゴマー化合物に相補性のある一番5'側のヌクレオチドである。「3'標的部位」はオリゴマー化合物に相補性のある一番3'側のヌクレオチドである。一部の実施形態において、標的セグメントは全長miRNAである。他の態様においては、標的セグメントは標的miRNAのシード配列である。本願明細書において使用される「シード配列」という用語はmiRNAの5'末端のヌクレオチド2から7として定義される。

20

#### 【0134】

本発明の化合物及び組成物がハイブリダイズする標的核酸の場所は、本願名所において「適切な標的セグメント」と呼ぶ。本願明細書で使用される「適切な標的セグメント」という用語は、オリゴマー化合物が標的とする標的領域の少なくとも6核酸塩基部分として定義される。一実施形態において、標的miRNAの適切な標的セグメントはmiRNAのシード配列である。

#### 【0135】

本発明のオリゴマー化合物は一本鎖、二本鎖、環状またはヘアピン状のオリゴマー化合物の形状であっても良く、内部又は末端のバルジ又はループのような構造的要素を含むものであっても良い。一旦システムに入ると、本発明のオリゴマー化合物は一つもしくはそれ以上の酵素、又はタンパク質の作用を誘発し、標的核酸のレベル、発現、機能の修飾に影響する場合がある。

30

#### 【0136】

そのようなタンパク質の限定されない例は、Drosophila RNA分解酵素IIIである。Drosophilaは長い一次RNA転写物（pri-miRNA）を長さ約70から450ヌクレオチドから、核から輸出されるmiRNA前駆体（長さ約50から約80ヌクレオチド）に処理する核内酵素であり、ヒトDicer酵素に接触し、miRNA前駆体をmiRNAに処理する。

#### 【0137】

さらなる限定されない例は、RISC複合体の酵素を含む。RNA標的物の分解に影響を与えるRISC複合体の使用は、それによってオリゴヌクレオチドを介した遺伝子発現の抑制の効能を大幅に増強する。同様の役割が、例えばRNA分解酵素III及び酵素のリボヌクレアーゼLファミリーにおけるものなどのように、他のリボヌクレアーゼに対して想定されている。

40

#### 【0138】

##### オリゴマー化合物修飾

従来技術で周知のように、ヌクレオシドは塩基と糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基（又は核酸塩基）部分は通常はヘテロ環塩基部分である。二つのもっとも一般的なそのようなヘテロ環塩基の種類は、プリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレ

50

オシドの糖部分に共有結合によって結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。これらのヌクレオシドがペントフラノシル糖を含むものであるため、リン酸基は前記糖の2'、3'又は5'ヒドロキシ基部分に結合することができる。オリゴヌクレオチドを形成する場合、前記リン酸基は隣接したヌクレオシドにお互いに共有結合によって結合し、直鎖ポリマー化合物を形成する。この直鎖ポリマー構造の各々の末端は結合し、ハイブリダイゼーションによって、又は共有結合の形成によって、環状構造を形成する。さらに、直鎖化合物は内部の核酸塩基相補性を有するものであっても良く、したがって、完全にな又は部分的に二本鎖構造を形成する方法で折りたたまれているものであっても良い。修飾されていないオリゴヌクレオチドの構造内で、リン酸基は通常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言われる。RNA及びDNAの修飾されていない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。

10

#### 【0139】

本発明の文脈では、「修飾されていないオリゴヌクレオチド」という用語は一般的にリボ核酸(RNA)又はデオキシリボ核酸(DNA)のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語は天然の核酸塩基、糖、共有ヌクレオシド間結合から構成されるオリゴヌクレオチドを含む。「オリゴヌクレオチド類似体」という用語はオリゴヌクレオチドに類似した方法で機能する1もしくはそれ以上の非天然部分を有するオリゴヌクレオチドを指す。そのような非天然オリゴヌクレオチドは、例えば、増強した細胞の取り込み、増強した他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的物に対する増強した親和性、ヌクレアーゼ存在下での増強した安定性などの望ましい特性のために、しばしば天然の形態よりも選択される。「オリゴヌクレオチド」という用語は、修飾されていないオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を指すのに使用される。

20

#### 【0140】

本発明の文脈で、オリゴヌクレオシドという用語は、リン原子を持たないヌクレオシド間結合によって連結しているヌクレオシドを指す。この種類のヌクレオシド間結合はアルキル、シクロアルキル、混合したヘテロ原子アルキル、混合したヘテロ原子シクロアルキル短鎖、1もしくはそれ以上のヘテロ原子の短鎖、及び1もしくはそれ以上のヘテロ環の短鎖を含む。ヌクレオシド間結合はシロキサン、スルフィド、スルホキシド、スルホン、アセチル、ホルムアセチル、チオホルムアセチル、メチレンホルムアセチル、チオホルムアセチル、アルケニル、スルファミン酸、メチレンイミノ、メチレンヒドラジン、スルホン酸、スルホンアミド、アミド及び混合したN、O、S、及びCH<sub>2</sub>組成部分を有する他のものを含むが、これらに限定されない。さらに上記修飾に加えて本発明のオリゴマー化合物のヌクレオシドは様々な他の修飾を有することが可能である。

30

#### 【0141】

##### 修飾されたヌクレオシド間結合基

オリゴマー化合物の具体的例は、例えば、非天然ヌクレオシド間結合などの修飾を有するオリゴヌクレオチドを含む。そのような非天然ヌクレオシド間の結合は、例えば、増強した細胞の取り込み、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸標的物に対する増強した親和性、及びヌクレアーゼ存在下での増強した安定性のような望ましい特性のために、しばしば天然形態より多く選択される。

40

#### 【0142】

本発明のオリゴマー化合物は1もしくはそれ以上の修飾されたヌクレオシド間の結合を有していても良い。本願明細書で定義されているように、修飾したヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を含むヌクレオシド間結合、及びリン原子を含まないヌクレオシド間結合を含む。本明細書の目的のため、及び従来技術で頻繁に参照されているように、修飾オリゴヌクレオチドは、そのヌクレオシド間骨格においてリン原子を有しておらず、またオリゴヌクレオシドとしてもみなされる場合がある。

#### 【0143】

1つの適切なリンを含む修飾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。他の修飾されたオリゴヌクレオチド骨格の多くは(ヌクレオシド間結合)、

50

従来技術で周知であり、本発明の文脈において有用である。

【0144】

リンを含むヌクレオシド間結合の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第3, 687, 808号、第4, 469, 863号、第4, 476, 301号、第5, 023, 243号、第5, 177, 196号、5, 第188, 897号、第5, 264, 423号、第5, 276, 019号、第5, 278, 302号、第5, 286, 717号、第5, 321, 131号、第5, 399, 676号、第5, 405, 939号、第5, 453, 496号、5, 455, 233号、5, 466, 677号、5, 476, 925号、5, 519, 126号、第5, 536, 821号、第5, 541, 306号、第5, 550, 111号、第5, 563, 253号、第5, 571, 799号、第5, 587, 361号、第5, 194, 599号、第5, 565, 555号、第5, 527, 899号、第5, 721, 218号、第5, 672, 697号、第5, 625, 050号、第5, 489, 677号及び第5, 602, 240号明細書を含むが、これらに限定されず、この各々はこの参照により本願明細書に組み込まれる。

10

【0145】

ここでリン原子を含まない修飾されたオリゴヌクレオチドの骨格は(ヌクレオシド間結合)、短鎖アルキル、またはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合したヘテロ原子及びアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1もしくはそれ以上の短鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオシド間結合によって形成されるヌクレオシド間結合を有する。これらはアミド骨格を有するものを含み、更に混合したN、O、S、及びCH<sub>2</sub>組成部分を有する他のものを含む。

20

【0146】

上記のリンを含まないオリゴヌクレオチドの調整を教示する代表的な米国特許は、米国特許第5, 034, 506号、第5, 166, 315号、第5, 185, 444号、第5, 214, 134号、第5, 216, 141号、第5, 235, 033号、第5, 264, 562号、第5, 264, 564号、第5, 405, 938号、第5, 434, 257号、第5, 466, 677号、第5, 470, 967号、第5, 489, 677号、第5, 541, 307号、第5, 561, 225号、第5, 596, 086号、第5, 602, 240号、第5, 610, 289号、第5, 602, 240号、第5, 608, 046号、第5, 610, 289号、第5, 618, 704号、第5, 623, 070号、第5, 663, 312号、第5, 633, 360号、第5, 677, 437号、第5, 792, 608号、第5, 646, 269号及び第5, 677, 439号明細書を含むが、これらに限定されず、この各々は本参照により本願明細書に組み込まれる。

30

【0147】

オリゴマー化合物はまたオリゴヌクレオチド模倣体を含むことも可能である。オリゴヌクレオチドに適用される模倣体という用語は、オリゴマー化合物を含むことが意図されており、フラノース環又はフラノース環及びヌクレオシド間結合の両方が新規な基によって置換されているか、或いはフラノース環だけが例えばモルフォリノ環で置換されることが、糖の代替物として従来技術でもまた参照されている。ヘテロ環塩基又は修飾されたヘテロ環塩基部分は適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために保持される。オリゴヌクレオチド模倣体がペプチド核酸(peptide nucleic acids: PNA)及びシクロヘキセニル(cyclohexenyl)核酸(CeNAとして知られる。Wang et al, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602を参照)のようなオリゴマー化合物を含むことができる。オリゴヌクレオチド模倣体の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第5, 539, 082号、第5, 714, 331号、及び第5, 719, 262号明細書を含むが、これらに限定されず、この各々は本参照により本願明細書に組み込まれる。オリゴヌクレオチド模倣体の別の種類はホスホモノエステル核酸と呼ばれており、骨格にリン基を取り込む。オリゴヌクレオチド模倣体のこの種類は、核酸の検出のためのプローブとして、及び、分子生物学での使用のための補助として、遺伝子発現を抑制する領域(アンチセンスオリゴヌクレオチ

40

50



ド、リボザイム、センスオリゴヌクレオチド、及び三本鎖形成オリゴヌクレオチド)の有用な生理学的、生物学的、及び薬理学的特性を有するという報告がされている。フラノシル環がシクロブチル部分によって置き換えられている別のオリゴヌクレオチド模倣体が報告されている。

#### 【0148】

##### 修飾された糖鎖

本発明のオリゴマー化合物もまた、1もしくはそれ以上の修飾されたまたは置換された糖鎖を含むことが可能である。塩基部分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保持されている。糖修飾はオリゴマー化合物に対して、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、他の有益な生物学的特性を与えることができる。代表的な修飾された糖は炭素環又は非環式糖、2'、3'、または4'位の1もしくはそれ以上位置において置換基を有する糖、糖の1もしくはそれ以上の水素基の位置に置換物を有する糖、糖のいずれの2つの他の原子の結合間の結合を有する糖を含む。多くの糖修飾は従来技術で周知であり、2'位置に修飾された糖及び糖の任意の2原子の間に架橋を有する糖(糖が2環式となるように)は特に本発明で有用である。本発明で有用な糖の修飾の例は、これらに限定されないが、OH、F、O-アルキル、S-アルキル、またはN-アルキル、或いはO-アルキル-O-アルキルから選択される糖置換基を含む化合物を含み、前記アルキル、アルケニル、及びアルキニルは置換または未置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキルまたは $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルであっても良い。特に適切であるのは、2'-メトキシエトキシ(2'-O-メトキシエチル、2'-MOE、又は2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>としても知られている)、2'-O-メチル(2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-フルオロ(2'-F)、又は4'炭素原子から2'炭素原子に連結する架橋基を有する2環式糖修飾ヌクレオシドであり、架橋基の例は-CH<sub>2</sub>-O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-、又は-CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-を含み、R<sub>3</sub>はH又は $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである。

#### 【0149】

一実施形態において、オリゴマー化合物は2'位で置換基を有する1もしくはそれ以上のヌクレオシドを含む。本発明で有用な2'-糖置換基の例は、これらに限定されないが、OH、F、O-アルキル、S-アルキル、又はN-アルキル、O-アルケニル、S-アルケニル、又はN-アルケニル、O-アルキニル、S-アルキニル又はN-アルキニル、或いはO-アルキニル-O-アルキニルを含み、前記アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換又は未置換 $C_1 \sim C_{10}$ アルキル又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルである。O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<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>、OCH<sub>2</sub>C(=O)N(H)CH<sub>3</sub>、及びO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>は特に望ましく、式中、n及びmは1から約10である。他の2'-糖置換基は $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、或いはO-アルカリル又は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分解基、レポーター基、インターカレーター、薬理学的特性を改善するための基、又はオリゴマー化合物の薬力学的特性を改善するための基、及び同様な特性を有する他の置換基を含む。

#### 【0150】

増加したヌクレアーゼ抵抗性、及びヌクレオチドに対する非常に高い結合親和性を与える修飾の1つは2'-MOE側鎖である(Bakerら、J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000)。2'-MOE置換の目下の利点の1つは、O-メチル、O-プロピル、及びO-アミノプロピルのような多くの類似した2'修飾よりも高い結合親和性に改善されている点である。2'-MOE置換を有するオリゴヌクレオチドはまたインビボ使用における有望な特色を有する、遺伝子発現のアンチセンス抑制剤となることが示されている(Martin, P. Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504, Altmann et al., Chimia, 1996,

10

20

30

40

50

50、168-176、Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637及びAltmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

#### 【0151】

2'-糖置換基はアラビノ(arabino、上向き)又はリボ(ribo、下向き)の位置にあっても良い。2'-アラビノ修飾の1つは2'-Fである。同様の修飾がオリゴマー化合物の他の位置に作成することが可能であり、特に3'末端のヌクレオシド又は2'-5'に結合したオリゴヌクレオチド中での糖の3'位置、及び5'末端ヌクレオチド中の5'位置で作成可能である。オリゴマー化合物は、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖模倣部分を有していても良い。修飾した糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、米国特許第4,981,957号、第5,118,800号、第5,319,080号、第5,359,044号、第5,393,878号、第5,446,137号、第5,466,786号、第5,514,785号、第5,519,134号、第5,567,811号、第5,576,427号、第5,591,722号、第5,597,909号、第5,610,300号、第5,627,053号、第5,639,873号、第5,646,265号、第5,658,873号、第5,670,633号、第5,792,747号、及び第5,700,920号明細書を含むが、これらに限定されず、この各々はこの参照により本願明細書で完全に組み込まれる。

10

#### 【0152】

代表的な糖置換基は「キャップされた2'-オキシエトキシオリゴヌクレオチド」という標題の米国特許第6,172,209号明細書に開示されており、本願明細書で完全に引用文献によって組み込まれている。

20

#### 【0153】

代表的な環状糖置換基は「立体構造的に前有機化されたRNAを標的とした2'-オリゴマー化合物」という標題の米国特許第6,271,358号明細書に「開示されており、これはこの参照により本願明細書に組み込まれる。

#### 【0154】

代表的なグアニジノ置換基は「機能的なオリゴマー」という標題の米国特許第6,593,466号明細書で開示されており、これはこの参照により本願明細書に組み込まれる。

30

#### 【0155】

代表的なアセトアミド置換基は米国特許第6,147,200号明細書で開示されており、これはこの参照により本願明細書に組み込まれる。

#### 【0156】

別の修飾基は2環式になっており、そのため糖の立体構造配置を固定している糖部分を有するヌクレオシドを含む。そのような修飾はヌクレゼ安定性、結合親和性、又はある他の有益な生物学的特性をオリゴマー化合物に与える可能性がある。これらのヌクレオシドの中でもっとも研究されているものは4'-CH<sub>2</sub>-O-2'架橋を有する2環式糖によって修飾されたヌクレオシドである。この架橋は糖の下についており、固定された3'-エンド(endo)立体構造配置の中へ糖環を押し込んでいるように示される。アルファ- $\alpha$ -Lヌクレオシドもまた報告されており、この結合は前記環よりも上で、複素環塩基はベータ立体構造というよりはアルファ立体構造である(米国特許出願第2003/0087230号参照)。キシロ類似体もまた調製されている(米国特許出願第2003/0082807号参照)。4'-CH<sub>2</sub>-O-2'架橋されたヌクレオシドと類似した特性を有する別の2環式糖によって修飾されたヌクレオシドは4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'架橋にメチレン基を追加したものを有する(Kanekoら、米国特許出願第2002/0147332号、Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456、米国特許第6,268,490号及び第6,670,461号明細書及び米国特許出願第2003/0207841号参照)。これらの2環式糖によって修飾されたヌクレオシド(4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>(cor<sub>2</sub>)-O-2')を取り込むオリゴマー化合物は

40

50

、相補的なDNA及びRNA ( $T_m = +3 \sim +10^\circ\text{C}$ ) との非常に高い二本鎖熱安定性、 $3'$ -エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、及び良好な溶解特性を示す。

【0157】

オリゴマー化とともに2環式糖によって修飾された単量体アデニン、シトシン、グアニン、5-メチル-シトシン、チミン、及びウラシルの合成及び調製、並びに核酸認識特性が記載されている(Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630、国際出願第WO98/39352号及び第WO99/14226号)。

【0158】

$4'$ -CH<sub>2</sub>-S-2'類似体などの他の2環式糖によって修飾されたヌクレオシド類似体が調製されている(Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett, 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼのための基質としてのオリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖を含む、他の2環式糖類似体の調製もまた記載されている(Wengelら、国際出願第WO98-DK393 第19980914号)。

【0159】

#### 核酸修飾

本発明のオリゴマー化合物はまた1もしくはそれ以上の核酸塩基(しばしば従来技術では単に「塩基」と言われる)を含むことができ、それらの核酸塩基は天然発生又は合成非修飾核酸塩基から構造的に区別することができるが、機能的には交換可能である。そのような核酸塩基の修飾はオリゴマー化合物にヌクレアーゼ安定性、結合親和性、又は他の有益な生物学的特性を与えることができる。本願明細書で使用される「非修飾」又は「天然」核酸塩基はプリン塩基であるアデニン(A)及びグアニン(G)、及びピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を含む。本願明細書において複素環塩基部分とも呼ばれている修飾核酸塩基はまた他の合成及び天然核酸塩基を含み、それらの多くの例は、特に、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン等である。

【0160】

複素環塩基部分はまだ例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンのような、他のヘテロ環と置換されるプリン又はピリミジン塩基を含む。一部の核酸塩基は米国特許第3,687,808号明細書、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. 及び Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993において開示されているものを含む。これらの核酸塩基の特定のものは本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるのに特に有用である。これらは、2アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6、及びO-6置換プリンを含む。

【0161】

本発明の一つの態様において、オリゴマー化合物は1もしくはそれ以上の複素環塩基部分の代わりに、多環式複素環化合物を有するように調製される。多数の三環式複素環化合物がこれまでに報告されている。これらの化合物は、標的鎖への修飾鎖結合特性を増加させるために、アンチセンス用途において日常的に使用されている。もっともよく研究されている修飾はグアニンを標的としており、したがってそれらはG-クランプ(G-clamps)又はシチジン類似体と称する。

## 【0162】

第二鎖においてグアノシンと3個の水素結合を作る代表的なシトシン類似体は1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン( $R_{10} = O$ ,  $R_{11} \sim R_{14} = H$ ) (Kurchavov et al, Nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, 1837-1846) 1,3-ジアザフェノチアジン-2-オン( $R_{10} = S$ ,  $R_{11} \sim R_{14} = H$ ) (Lin, K.-Y.; Jones, R.J.; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3873-3874) 及び6,7,8,9-テトラフルオロ-1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン( $R_{10} = O$ ,  $R_{11} \sim R_{14} = F$ ) (Wang, J.; Lin, K.-Y.; Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385-8388) を含む。オリゴヌクレオチドに組み込まれている場合、これらの塩基修飾は相補的なグアニンにハイブリダイズすることが示されており、グアニンはまたアデニンとハイブリダイズし、延長したスタッキング相互作用によってらせん状の熱安定性を増強することが示されている(米国特許出願第20030207804号及び米国特許出願第20030175906号、これらはいずれもこの参照により本願明細書に組み込まれる)。

10

## 【0163】

シトシン類似体/置換が強固な1,3-ジアザフェノキサジン-2-オン骨格( $R_{10} = O$ ,  $R_{11} = -O-(CH_2)_2-NH_2$ ,  $R_{12} \sim R_{14} = H$ )に結合するアミノエトキシ部分を有する場合、らせん安定化特性が観察されている(Lin, K.-Y.; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532)。結合研究によって、単一修飾によるもっとも高いことが知られている親和性を増強する5-メチルシトシン? $dC5^m$ ?と比べて、単一取り込みが18°までの $T_m$ の増加とともに、その相補的な標的DNA又はRNAに対するモデルオリゴヌクレオチドの結合親和性を増強することが可能であることが示された。一方、前記らせん安定性の獲得によってオリゴヌクレオチドの特異性は損なわれない。 $T_m$ データは $dC5^m$ と比較して完全にマッチしている配列とミスマッチ配列との間のより大きな差異を示す。繋ぎ止められたアミノ基は付加的な水素結合供与体として作用し、相補的なグアニンのフーグスティーン表面、すなわちO6と相互作用しそのため4つの水素結合を形成することが示唆された。これは、G-クランプの増強した親和性が延長した塩基のスタッキング及び付加的な特定の水素結合の組み合わせによって調製されているということを意味している。

20

30

## 【0164】

本発明に従った三環式複素環化合物及びそれらを使用する方法は、米国特許第6,028,183号明細書及び米国特許第6,007,992号明細書に開示されており、どちらの内容も本願明細書に完全に組み込まれる。

## 【0165】

配列特異性ととともに、フェノキサジン誘導体の結合親和性が増強すると、その誘導体はより強力なアンチセンスを基礎とした薬剤開発における価値のある核酸塩基類似体となる。単一置換基が20塩基長2'-デオキシホスホロチオエートオリゴヌクレオチドのインビトロの作用強度を有意に改善することが示されているように、活性増強はG-クランプの場合により明確であった。(Flanagan, W.M.; Wolf, J.J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R.W.; Matteucci M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 3513-3518)。

40

## 【0166】

複素環基として有用である修飾多環式複素環化合物は、これらに限定されないが、上述の米国特許第3,687,808号、及び米国特許第4,845,205号、第5,130,302号、第5,134,066号、第5,175,273号、第5,367,066号、第5,432,272号、第5,434,257号、第5,457,187号、第5,459,255号、第5,484,908号、第5,502,177号、第5,525,711号、第5,552,540号、第5,587,469号、第5,594,12

50

1号、第5,596,091号、第5,614,617号、第5,645,985号、第5,646,269号、第5,750,692号、第5,830,653号、第5,763,588号、第6,005,096号、及び第5,681,941号明細書及び米国特許出願第20030158403号で開示されており、これらはこの参照により本願明細書に完全に組み込まれる。

#### 【0167】

5-メチルシトシンの置換を含む特定の核酸塩基の置換は、本発明のオリゴヌクレオチドの結合親和性を増加させるのに特に有用である。例えば、5-メチルシトシン置換が0.6-1.2?Cまで核酸二本鎖安定性を増加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)、現時点においては塩基置換が好ましく、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合に特に好ましい。

#### 【0168】

##### 抱合オリゴマー化合物

本発明のオリゴマー化合物に付与される置換基の1つは、得られるオリゴマー化合物の活性、細胞内分布、又は細胞内取り込みを増強する1もしくはそれ以上の部分又は抱合の結合を含む。一実施形態において、そのような修飾オリゴマー化合物は、ヒドロキシル基又はアミノ基のような官能基に、共有結合的に抱合基が結合することによって調製される。本発明の抱合基は、オリゴマーの薬力学的特性を増強し、薬物動態学的特性を増強する挿入物、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、オリゴマー基、及びオリゴマー基を含む。典型的な抱合基はコレステロール、炭水化物、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び色素を含む。本発明の文脈において、薬力学的特性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抵抗性を増強し、及び/又はRNAとの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、薬物動態学的な特長を増強する基はオリゴマー取り込み、分配、代謝、又は排出を改善する基を含む。代表的な抱合基は、1992年10月23日付特許出願の国際特許出願第PCT/US92/09196号で開示されている。その全体の開示はこの参照により本願明細書に組み込まれる。抱合部分はコレステロール部分及び従来技術で周知の様々な他の脂質部分を含むが、これらに限定されない。

#### 【0169】

さらに、本発明のオリゴマー化合物はオリゴマー化合物の能動又は受動輸送、局在、又はコンパートメント化を促進する、1もしくはそれ以上の部分、結合、又は抱合を有する。細胞内局在は核内、核小体内、または細胞質内局在を含むが、これらに限定されない。コンパートメント化は、核、核小体、ミトコンドリアを含む又は細胞膜内に包埋される細胞内分画への本発明のオリゴヌクレオチドのあらゆる方向性をもった動きを含むが、これらに限定されない。さらに、本発明のオリゴマー化合物は転写後修飾を促進する1もしくはそれ以上の抱合部分を含む。

#### 【0170】

抱合基は直接的に又は任意の結合基を介して、オリゴマー化合物の様々な位置に結合することが可能である。結合基という用語は、オリゴマー化合物に抱合基が結合するのを受け入れる全ての基を含むことを意図している。結合基は、例えばオリゴマー化合物のような親化合物の選択的な部位に、化学官能基、抱合基、レポーター基、および他の基が結合するのに有用である二価の基である。一般的に、2機能性結合部分は2つの官能基を有するハイドロカルボニル部分を含む。前記官能基の1つは親分子又は目的化合物に結合させるために選択され、あるいは他は化学官能基又は抱合基のようなあらゆる選択された基に実質的に結合するために選択される。一部の実施形態において、リンカーはエチレングリコール又はアミノ酸単位のような繰り返し単位の鎖構造又はオリゴマーを含む。2機能性

結合性部分に日常的に使用される官能基の例は、求核試薬基に反応する求電子試薬、及び求電子試薬に反応するための求核試薬が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、2機能性結合鎖はアミノ、ヒドロキシル、カルボン酸、チオール、不飽和（例えば、2重又は3重結合）及びその同類のものを含む。2機能性結合部分のいくつかの限定されない例は、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid: ADO）、サクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸（succinimidy 4-(N-maleinidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate: SMCC）及び6-アミノヘキサン酸（6-aminohehexanoic acid: AHEX又はAHA）を含む。他の結合基は置換されたC1~C10アルキル、置換又は未置換C2~C10アルケニル、或いは置換又は未置換C2~C10アルキニルが含まれるが、これらに限定されず、望ましい置換基の限定されないリストはヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリル、アルケニル及びアルキニルを含む。さらなる代表的な結合基は国際出願第WO94/01550号及びWO94/01550号の例で開示されている。

#### 【0171】

本発明の組成物において使用されるオリゴマー化合物は、一般的に例えばヌクレアーゼ安定性のような特性を増強するためにオリゴマー化合物の一端又は両端に結合し、1もしくはそれ以上の安定化基を有するように修飾されていても良い。キャップ構造は安定化基に含まれる。化学的修飾は、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に組み込まれた「キャップ構造又は末端キャップ鎖」を意味する（例えばWincottら、国際出願第WO97/26270号を参照。これはこの参照により本願明細書組み込まれる）。これらの末端の修飾は、エキソヌクレアーゼ分解から末端の核酸分子を有するオリゴマー化合物を保護し、さらに細胞内の運搬及び/又は局在を助ける。前記キャップは5'末端（5'-cap）又は3'-末端（3'-cap）又は両端にあっても良い。2重鎖オリゴマー化合物において、キャップは各鎖にいずれかの鎖のいずれかの末端又は両端にあっても良い。限定されない例では、前記5'-キャップは、逆位塩基脱落残基（部分）、4',5'-メチレンヌクレオチド、1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド又は4'-チオヌクレオチド又は炭素環式ヌクレオチド、1,5-,L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾された塩基のヌクレオチド、ホスホロジチオエート結合、トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、非環式3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、非環式3,5-ジヒドロキシペンチルリウクレオチド、3'-3'-逆位ヌクレオチド鎖、3'-3'-逆位塩基脱落鎖、3'-2'-逆位ヌクレオチド鎖；3'-2'-逆位塩基脱落鎖、1,4-ブタンジオールリン酸、3'-ホスホロアミデート、ヘキシルリン酸、アミノヘキシルリン酸、3'-リン酸、3'-ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、又は架橋の又は非架橋のメチルリン酸部分（Wincottら、国際出願第WO97/26270号。これはこの参照により本願明細書に組み込まれる）。

#### 【0172】

本発明の特に好ましい3'-キャップ構造は、例えば4',5'-メチレンヌクレオチド、1-(ベータ-D-エリスロフラノシル)ヌクレオチド、4'-チオ-ヌクレオチド、炭素環式ヌクレオチド、5'-アミノ-アルキル-リン酸、1,3-ジアミノ-2-プロピルリン酸、3-アミノプロピルリン酸、6-アミノヘキシルリン酸、1,2-アミノデシルリン酸、ヒドロキシプロピルリン酸、1,5-無水ヘキシトールヌクレオチド、L-ヌクレオチド、アルファ-ヌクレオチド、修飾された塩基のヌクレオチド、ホスホロジチオエート、トレオ-ペントフラノシルヌクレオチド、非環式3',4'-セコヌクレオチド、3,4-ジヒドロキシブチルヌクレオチド、3,5-ジヒドロキシペンチルヌクレオチド、5'-5'-逆位ヌクレオチド鎖、5'-5'-逆位塩基脱落鎖、5'-ホスホラミデート、5'-ホスホロチオエート、1,4-ブタンジオールリン酸、5'-アミノ、架橋の

10

20

30

40

50

又は非架橋の 5' - ホスホラミデート、ホスホロチオエート及び / 又はホスホロジチオエート、架橋の又は非架橋のメチルリン酸及び 5' - メルカプト部分を含む（詳細は Beaucage and Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925 を参照。これはこの参照により本願明細書に組み込まれる）。

【0173】

オリゴマー化合物の一端又は両端をキャップしてヌクレオゼ安定性を与えるために使用可能なさらなる 3' 及び 5' - 安定化基は、2003 年 1 月 16 日付願の国際出願第 WO 03/004602 号で開示されたものを含む。

【0174】

オリゴマー化合物化学的モチーフ

10

オリゴマー化合物はその長さに沿って特定の方向性で配置された化学修飾サブユニットを有することが可能である。「化学的なモチーフ」はオリゴマー化合物全体の化学修飾の配置として定義される。

【0175】

特定の実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は均一に修飾される。本願明細書において使用される「均一に修飾される」オリゴマー化合物における、糖、塩基、ヌクレオシド間結合、又はそれらの組み合わせの化学的修飾がオリゴマー化合物の各単位に適用される。一実施形態において、均一に修飾されたオリゴマー化合物の各糖部分が修飾される。他の実施形態では、均一に修飾されたオリゴマー化合物の各ヌクレオシド間結合が修飾される。さらなる実施形態において、均一に修飾されたオリゴマー化合物の各糖及び各ヌクレオシド間結合が修飾を有する。均一に修飾されたオリゴマー化合物の例は、均一な 2' - MOE 糖鎖、均一な 2' - MOE 及び均一なホスホロチオエート骨格、均一な 2' - OMe、均一な 2' - OMe 及び均一なホスホロチオエート骨格、均一な 2' - F、均一な 2' - F 及び均一なホスホロチオエート骨格、均一なホスホロチオエート骨格、均一なデオキシヌクレオチド、均一なリボヌクレオチド、均一なホスホロチオエート骨格、及びそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

20

【0176】

本願明細書において使用される「位置的に修飾されたモチーフ」という用語は、均一な糖修飾ヌクレオシド配列を含むことを意味し、前記配列は、1 ~ 約 8 の糖修飾ヌクレオシドを含む 2 もしくはそれ以上の領域によって中断されており、内部領域は一般的に 1 から約 6 又は 1 から約 4 である。位置的に修飾されたモチーフは、糖修飾のヌクレオシドの内部領域を含み、一端又は両端を含まれていても良い。糖修飾ヌクレオシドの領域中の各々の特定の糖修飾は本質的に均一である。異なる糖修飾によって、ヌクレオチドの領域の区別が可能である。位置的に修飾されたモチーフは核酸塩基又はヌクレオシド間結合の位置又は種類によって決定されない。前記位置的に修飾されたオリゴマー化合物という用語は多くの異なる特異的な置換形態を含む。多数のこれらの置換形態を組成物中で調製して試験を行った。一実施形態において、位置的に修飾されたオリゴマー化合物は、ホスホジエステルヌクレオチド間結合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、又はホスホジエステル及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合の組み合わせを含むものであっても良い。

30

40

【0177】

一部の実施形態において、位置的に修飾されたオリゴマー化合物は、5' - M M m m M m M M M m m m m M M M m m m m m - 3' 及び 5' - M M m M M m M M m M M m M M m M M m M m M M m M M - 3' などの、第 1 の修飾に第 2 の修飾が散在したクラスターを有するオリゴマー化合物を含み、ここで「M」は第 1 の修飾、及び「m」は第 2 の修飾を表す。一実施形態において、「M」は 2' - MOE 及び「m」は 4' - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - O - 2' を有する二環式糖修飾ヌクレオシドであり、n は 1 又は 2 である。別の実施形態において、「M」は 2' - MOE 及び「m」は 2' - F である。別の実施形態において「M」は 2' - OMe 及び「m」は 2' - F である。

【0178】

50

一部の実施形態において、オリゴマー化合物はキメラオリゴマー化合物である。「キメラオリゴマー化合物」又は「キメラ」は、核酸を基礎としたオリゴマー化合物の場合、例えばヌクレオチド又はヌクレオシドなどの少なくとも一つの単量体の単位によって各々作製された少なくとも2つの化学的に異なる領域を有するオリゴマー化合物である。キメラオリゴヌクレオチド合成方法は当業者に周知である。

#### 【0179】

特定の実施形態において、キメラオリゴマー化合物はギャップマーオリゴマー化合物である。「ギャップマー」は、二つの外部領域（「ウィング（wing）」又は「ウィングセグメント（wing segment）」と呼ばれる）に隣接した、内部領域（「ギャップ（gap）」又は「ギャップセグメント（gap segment）」と呼ばれる）という3領域に分割されるヌクレオシドの連続配列を有するオリゴマー化合物を意味する。内部及び外部領域は糖部分、ヌクレオシド間結合、それらの組み合わせによって区別される。ギャップマーオリゴマー化合物の領域を区別するために使用される糖部分の種類は、2'-MOE、2'-フルオロ、2'-O-CH<sub>3</sub>、及び二環糖修飾ヌクレオシドを限定せずを含む、本願明細書に開示される -D-リボヌクレオシド、 -D-デオキシリボヌクレオシド、又は2'-修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態において、各領域は均一に修飾されている。別の実施形態において、内部領域のヌクレオシドは外部領域の糖部分とは異なる糖部分を均一化する。一つの限定されない例において、ギャップは、第1の2'-修飾ヌクレオシドを均一に含み、各ウィングは第2の2'-修飾ヌクレオシドを均一に含む。

#### 【0180】

ギャップマーオリゴマー化合物は「対称性」又は「非対称性」のいずれかであることでさらに定義されている。各ウィングに同じ均一な糖修飾を有するギャップマーは「対称性ギャップマーオリゴマー化合物」と称する。各ウィングに異なる均一な修飾を有するギャップマーは「非対称性ギャップマーオリゴマー化合物」と称する。一実施形態において、このようなギャップマーオリゴマー化合物は、例えば、2'-MOE修飾ヌクレオシド（対称性ギャップマー）を含むウィング、及び -D-リボヌクレオシド又は -D-デオキシヌクレオシドを含むギャップの両方を有することが可能である。別の実施形態において、対称性ギャップマーは、2'-MOE修飾ヌクレオシドを含むウィング及び2'-MOE修飾ヌクレオシドとは別の2'-修飾ヌクレオシドを含むギャップの両方を有することが可能である。非対称性ギャップマーオリゴマー化合物は例えば、 -D-リボヌクレオシド、 -D-デオキシリボヌクレオシド又は2'-MOE又は2'-OCH<sub>3</sub>修飾ヌクレオシドとは別の2'-修飾ヌクレオシドを含む内部領域（ギャップ）を有する2'-OCH<sub>3</sub>修飾ヌクレオシドを含む一つのウィング及び2'-MOE修飾ヌクレオシドを含む他方のウィングを有することが可能である。これらのギャップマーオリゴヌクレオチド化合物はホスホジエステルヌクレオチド間結合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、又はホスホジエステル及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合の組み合わせを含むものであっても良い。

#### 【0181】

一部の実施形態において、ギャップマーオリゴマー化合物の各ウィングは同じ数のサブユニットを含む。別の実施形態において、ギャップマーオリゴマー化合物の一つのウィングは、ギャップマーオリゴマー化合物の他方のウィングとは異なる数のサブユニットを含む。一実施形態では、ギャップマーオリゴマー化合物のウィングは、独立して、1から約3のヌクレオシドを有する。適切なウィングは2から約3のヌクレオシドを有する。一実施形態において、ウィングは2ヌクレオシドを含むことが可能である。別の実施形態において、5'-ウィングは1つ又は2つのヌクレオシドを含むことが可能であり、3'-ウィングは2つ又は3つのヌクレオシドを含むことが可能である。本発明はしたがって、ギャップオリゴマー化合物を含み、各ウィングは独立して、1、2、又は3つの糖修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態において、内部又はギャップ領域は15から23ヌクレオシドを含み、それは、15、16、17、18、19、20、21、22及び23ヌクレオチ



ドを含むと理解されている。さらなる実施形態において内部又はギャップ領域は17から21のヌクレオシドを含むことが理解され、それはつまり、17、18、19、20、又は21のヌクレオシドを含むと理解される。別の実施形態において、内部又はギャップ領域は18から20ヌクレオシドを含むと理解され、それはつまり、18、19、又は20ヌクレオシドを含むと理解されている。好ましい一実施形態において、ギャップ領域は19ヌクレオシドを含む。一実施形態において、オリゴマー化合物はその標的miRNAに全長相補性を有するギャップマーオリゴヌクレオチドである。さらなる実施形態では、ウィングは2'-MOE修飾ヌクレオシドであり、ギャップは2'-フルオロ修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態では、一つのウィングは長さが2ヌクレオシドであり、他のウィングは長さ3ヌクレオシドである。付加的な実施形態では、ウィングは長さが各2ヌクレオシドであり、ギャップ領域は長さが19ヌクレオチドである。

10

#### 【0182】

キメラオリゴマー化合物の例は、第1の修飾を含む中心領域及び第2の修飾を含むウィング領域(5'MMmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmMM3')を有する23の核酸塩基をもつオリゴマー化合物、第1の修飾を含む中心領域及び第2の修飾を含むウィング領域(5'MMmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmMM3')を有する22の核酸塩基をもつオリゴマー化合物、及び第1の修飾を含む中心領域及び第2の修飾を含むウィング領域(5'MMmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmMM3')を有する21の核酸塩基をもつオリゴマー化合物を含むが、これらに限定されず、「M」は一番目の修飾を表し、「m」は2番目の修飾を表す。一つの限定されない例において、「M」は2'-O-メトキシエチル、及び「m」は2'-フルオロであっても良い。

20

#### 【0183】

一実施形態において、キメラオリゴマー化合物は「ヘミマーオリゴマー化合物」であり、糖部分及び/又はヌクレオシド結合の化学的修飾はオリゴマー化合物の5'末端のサブユニット領域を3'末端のサブユニット領域から区別する。

#### 【0184】

キメラオリゴマー化合物は一般的にはヌクレアーゼ分解に対する増加した抵抗性、増加した細胞の取り込み、及び/又は標的核酸に対する増加した結合親和性を与えるために、少なくとも一つの修飾された領域を含む。オリゴマー化合物の付加領域は、例えば、異なる修飾を含むことができ、ある場合では、RNA対DNA又はRNA対RNAハイブリッド分解可能な酵素のための基質として働く可能性がある。例えば、オリゴマー化合物はRNase Hに対する基質として働く領域を含むように設計される。RNase HはRNA対DNA二本鎖のRNA鎖を分解する細胞内エンドヌクレアーゼである。したがって、分解領域を有するオリゴマー化合物によってRNase Hの活性化されると、結果としてRNA標的物の分解が起こり、このため、オリゴマー化合物の効果が増強する。あるいは、他の領域に比べて増加した又は減少した親和性のいずれかを示す化学修飾ヌクレオシドの領域を含むオリゴマー化合物の長さによって、標的核酸に対するオリゴマー化合物の結合親和性が変化する。この結果、キメラ使用時、例えば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と比較し、基質領域を有するより短いオリゴマー化合物によって一致する結果がしばしば得られる可能性がある。

30

40

#### 【0185】

本発明のキメラのオリゴマー化合物は、上述したように、2もしくはそれ以上のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド模倣体、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオシド及び/又はオリゴヌクレオシド模倣体の複合体構造として形成されることが可能である。そのオリゴマー化合物は、従来技術において、ハイブリッド、ヘミマー、ギャップマー、逆位ギャップマーと呼ばれる。そのハイブリッド構造の調製を教示する代表的米国特許は、米国特許第5,013,830号、第5,149,797号、第5,220,007号、第5,256,775号、第5,366,878号、第5,403,711号、第5,491,133号、第5,565,350号、第5,623,065号、第5,652,355号、第5,652,356号、及び第5,700,922号明細書を含むが、

50

【 0 1 8 6 】

10

## 20

## 30

## 40

## 50

ドを有する、 $\beta$ -D-リボヌクレオシド又は $\beta$ -D-デオキシヌクレオシドの配列を含む。別のヘミマーモチーフは、一方の末端に位置する2~6糖修飾ヌクレオシドを有する $\beta$ -D-リボヌクレオシド又は $\beta$ -D-デオキシリボヌクレオシドの配列を含み、2~4糖修飾ヌクレオシドが適切である。本発明の好ましい実施形態において、当該オリゴマー化合物は2'-MOE修飾ヌクレオチドの領域、及び $\beta$ -D-デオキシリボヌクレオシドの領域を含む。一実施形態において、 $\beta$ -D-デオキシリボヌクレオシドはオリゴマー化合物中の13以下の連続ヌクレオチドを含む。これらのヘミマーオリゴマー化合物はホスホジエステルヌクレオチド間結合、ホスホロチオエートヌクレオチド間結合又はホスホジエステル及びホスホロチオエートヌクレオチド間結合の組み合わせを含むものであっても良い。

10

## 【0191】

本発明において使用される「ブロックマーモチーフ (blockmer motif)」という用語は、均一に修飾された糖修飾ヌクレオシドのブロックによって内部で中断された均一な糖 (修飾又は未修飾の同一な糖) を有するヌクレオシドの配列を含むことを意味し、前記修飾は他のヌクレオシドとは異なる。より一般的には、ブロックマーモチーフを有するオリゴマー化合物は、2から6又は2から4の糖修飾ヌクレオシドの1つの内部ブロックを有する $\beta$ -D-リボヌクレオシド又は $\beta$ -D-デオキシリボヌクレオシドの配列を含む。内部ブロック領域がヘミマーとなる末端の1つにない限り、内部ブロック領域はオリゴマー化合物中のいかなる位置にあっても良い。塩基配列及びヌクレオシド間結合はブロックマーモチーフ内のあらゆる位置で変化し得る。

20

## 【0192】

天然及び修飾されたヌクレオチドはいずれも、それらのハイブリダイゼーション及び親和特性に影響する特定の立体的配置を有する。ホモ二本鎖核酸の立体的配置を記載するために使用される用語はRNAに対しては「A Form」及びDNAに対しては「B Form」である。RNA及びDNA二本鎖に対する各立体配置は核酸繊維のX線回折分析から決定した (Arnot and Hukins, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 47, 1504.)。一般的にRNA対RNA二本鎖はDNA対DNA二本鎖より安定であり、より高い融解温度 ( $T_m$ 's) を有する (Sanger et al, Principles of Nucleic Acid Structure, 1984, Springer-Verlag; New York, NY.; Lesnik et al, Biochemistry, 1995, 34, 10807-10815; Conte et al, Nucleic Acids Res., 1997, 25, 2627-2634)。RNAの増強された安定性は、幾つかの構造的特徴に起因しており、特にA-Formの配置から得られる改善された塩基のスタッキング相互作用からもたらされる (Searle et al, Nucleic Acids Res., 1993, 21, 2051-2056)。RNAにおける2'水酸基の存在はノーザンパッカー (Northern pucker) としても示されるC3'エンドパッカー (C3' endo pucker) の方向へ糖を偏らせ、A-Formの配置を好む二本鎖もたらす。さらに、RNAの2'水酸基はRNA二本鎖を安定化させる、水が介在する水素結合のネットワークを形成することができる (Egli et al, Biochemistry, 1996, 35, 8489-8494)。一方、デオキシ核酸は、サザンパッカー (Southern pucker) としても知られるC2'エンド糖パッカー (C2' endo sugar pucker) を好み、より不安定なB-form配置を与えると考えられている (Sanger, W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York, NY)。本願明細書で使用されるB-form配置は、C2'-エンドパッカー及びO4'-エンドパッカーの両方が含まれる。これは、B-form二本鎖をもたらずフラノース (furanose) 立体構造を考える上で、O4'-エンドパッカーの寄与も考慮に入れるべきであると指摘した、Berger et al, Nucleic Acids Research, 1998年, 26, 2473-24

30

40

50

80と一致する。

#### 【0193】

しかしながら、DNA対RNAハイブリッド二本鎖は、通常、純粋なRNA対RNA二本鎖よりも不安定であり、それらの配列に依存していることは、DNA対DNA二本鎖よりも多かれ少なかれ不安定である可能性がある (Searle et al, Nucleic Acids Res., 1993, 21, 2051-2056)。ハイブリッド二本鎖構造は、A-及びB-form配置の間の中間であり、その配置は弱いスタッキング相互作用をもたらす可能性がある (Lane et al, Eur. J. Biochem., 1993, 215, 297-306; Fedoroffら, J. Mol. Biol., 1993, 233, 509-523; Gonzalez et al, Biochemistry, 1995, 34, 4969-4982; Horton et al, J. Mol. Biol., 1996年, 264, 521-533)。標的RNAと合成配列の間に形成される二本鎖の安定性は、これらに限定されないが、RNase H-介在及びRNA干渉メカニズムを含むアンチセンスメカニズムなどの治療の中心をなすものであり、これらのメカニズムはRNA標的鎖に対する合成配列鎖のハイブリダイゼーションに関連する。RNase Hの場合、mRNAを効果的に抑制するには、前記アンチセンス配列が少なくともハイブリダイゼーションの閾値に達することが必要である。

#### 【0194】

定常的に使用されている糖バックリングを修飾する1つの方法は、糖の配置に影響を及ぼす置換基を用いて2'位置の糖を置換することである。環の立体構造に対する影響は2'位置の置換基の性質に依存している。多くの異なる置換基がそれらの糖バックリング効果を測定するために研究されている。例えば、2'-ハロゲンは、2'-フルオロ誘導体がC3'-エンド形態のもっとも多い集団(65%)を表し、2'-ヨウ素が最も少ない集団(7%)を表すことを示す研究がなされている。アデノシン(2'-OH)対デオキシアデノシン(2'-H)の集団は各々36%及び19%である。さらに、アデノシンダイマー(2'-デオキシ-2'-フルオロアデノシン-2'-デオキシ-2'-フルオロ-アデノシン)の2'-フルオロ基の効果は、積み重なった立体構造の安定性にも関連する。

#### 【0195】

予想されるように、相対的な二本鎖の安定性は2'-OH基を2'-F基に代え、このためC3'エンド集団が増加することによって増強されることが可能である。2'-F結合のより高極性の性質、並びにC3'-エンドバックリングを極端に優位させることは、A-form二本鎖での積み重なった立体構造を安定化させることが推測されている。UV淡色効果、環状2色性、及び<sup>1</sup>H NMRからのデータはまた、ハロ(halo)置換の電気陰性が減少するにつれてスタッキングの程度が減少することを示している。さらに、糖部分の2'-位置の立体的な嵩高さは、B-form二本鎖よりもA-form二本鎖の方がより受け入れられるようになっている。従って、ジヌクレオシドリン酸の3'末端における2'置換は、立体的な反発、フラノースバックリング優位、静電的反発、疎水的引力、水素結合能力などのスタッキング立体構造に対する多くの効果を越えると考えられている。このような置換効果は置換の分子サイズ、電気陰性、及び疎水性によって決定されると考えられている。相補性のある鎖の融解温度はまた、2'置換されたアデノシンニリン酸によって上昇する。置換の立体構造又は存在の3'エンド優位は増加した結合に参与しているかどうかは明らかではない。しかしながら、近傍の塩基のより大きな重なりは(スタッキング: stacking)、3'-エンド立体構造によって達成され得る。

#### 【0196】

ヌクレオシドの立体構造は、ペントフラノシル糖の2'、3'、又は4'位置の置換を含む様々な要素に影響される。立体障害置換基は一般にエクアトリアル位を好むが、電気陰性置換基は一般的にアキシアル位を好む (Principles of Nucleic Acid Structure, Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag.)。3'エンド立体構造を好む2'位置の修飾は、認識要素 (

recognition element)として2'-OHを保持しながら達成させることが可能である(Gallo et al, Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713、Harry-O'kuru et al, J. Org. Chem., (1997), 62(6), 1754-1759、及びTang et al, J. Org. Chem. (1999), 64, 747-754.)。或いは、3'エンド立体構造が優位となることは、電気陰性フッ素原子をアキシャル位に配置させた3'エンド立体構造に適応させた2'デオキシ-2'F-ヌクレオシドによって例示したように、2'-OHの欠失によって達成することが可能である(Kawasakiら, J. Med. Chem. (1993年), 36, 831-841)。リボース環の他の修飾、例えば、4'位を置換して4'F修飾ヌクレオシドを与えること(Guillerm et al, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (1995), 5, 1455-1460及びOwenら, J. Org. Chem. (1976), 41, 3010-3017)、或いは例えばメタノカルバナクレオシド(methanocarbanucleoside)類似体を得るための修飾(Jacobsenら, J. Med. Chem. Lett. (2000), 43, 2196-2203及びLeeら, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2001), 11, 1333-1337)は、3'エンド立体構造優位をもたらす。

#### 【0197】

本発明の1つの態様では、オリゴマー化合物は3'エンド糖立体構造を生じさせるために、合成的に修飾されたヌクレオシドを含む。ヌクレオシドは、ヘテロ環塩基、糖部分、或いはその両方の合成的な修飾を取入れることにより、所望の3'エンド糖立体構造を誘導する。これらの修飾されたヌクレオシドはRNA様ヌクレオシドを模倣するために使用され、オリゴマー化合物の特別な特性は、所望の3'エンド立体構造配置を維持したまま増強される得る。より安定な3'エンドヌクレオシドを用いることにより増強された特性は、タンパク質結合、タンパク質オフレート、吸収、クリアランスの修飾を通しての薬理動態学的特性の修飾、化学的安定性と同様にヌクレアーゼ安定性の修飾、結合親和性及びオリゴマーの特異性の修飾(酵素及び相補性配列に対する親和性及び特異性)、そしてRNA分解の増加した効果を含むが、これらに限定されない。

#### 【0198】

修飾ヌクレオシド及びそれらのオリゴマーの立体構造は、例えば分子的動態計算、核磁気共鳴スペクトロスコピー、及びCD測定などの様々な方法で測定され得る。従って、RNA様立体構造を誘導することが予想される修飾(オリゴマー化合物構造でのA-form二本鎖配置)は本発明のオリゴマー化合物で有用である。本発明に受け入れられる修飾ヌクレオシドの合成は従来技術で周知である(例えばChemistry of Nucleosides and Nucleotides Vol 1-3, ed. Leroy B. Townsend, 1988, Plenum Press.を参照)。

#### 【0199】

一つの態様において、本発明は、天然のRNA又はDNAに比べて増強した特性を有するように設計されているオリゴマー化合物を対象としている。最適化された又は増強されたオリゴマー化合物を設計する1つの方法は、可能な増強修飾を詳しく調べて選択した配列の各ヌクレオシドを含む。1つの修飾は、1若しくはそれ以上のRNAヌクレオシドを同じ3'エンド立体構造配置を有するヌクレオシドを置換することである。そのような修飾は天然RNAと比較して、化学的及びヌクレアーゼ安定性を増強することが可能であり、一方同時にオリゴヌクレオチドを合成及び/又はオリゴヌクレオチドに取り込むことがより安価且つ簡便である。前記配列は、キメラ立体構造の結果となる得る修飾を増強するため評価された、領域及び各領域のヌクレオシドにさらに分けることが可能である。5'及び3'末端は、1若しくはそれ以上の末端ヌクレオシドを作製するための有利な修飾に考慮される。本発明のオリゴマー化合物は、一本鎖または二本鎖配列の一方又は両方の少なくとも5'位置に少なくとも1つの5'修飾リン酸基を含む。考慮される他の修飾は、又

クレオシド間結合、抱合基、置換糖または塩基、の1若しくはそれ以上のヌクレオシドをヌクレオシド模倣体に置換すること、及びオリゴマー化合物の所望の特性を増強することが可能であるあらゆる他の修飾である。

#### 【0200】

本願明細書で使用される「アルキル」という用語は、24個の炭素原子まで含む飽和した直鎖又は分岐鎖炭化水素ラジカル基を指す。アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、n-ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル及び同様のものを含むが、これらに限定されない。アルキル基は典型的には1から約24個の炭素原子、より典型的には1から約12個の炭素( $C_1 - C_{12}$ アルキル)、より望ましくは1から約6個の炭素原子が含まれる。本願明細書で使用される「低級アルキル(lower alkyl)」という用語は、1から約6個の炭素原子を含む。本願明細書で使用されるアルキル基は、選択的に1もしくはそれ以上置換基を含むものであっても良い(下記の置換基のリストを参照)。

10

#### 【0201】

本願明細書で使用される「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する24個までの炭素原子を含む直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖ラジカル基を指す。アルケニル基の例は、エテニル、プロベニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-yl、1,3-ブタジエンのようなジエン、及び同様のものを含むが、これらに限定されない。アルケニル基は典型的には2から約24個の炭素原子を含み、より典型的には2から約12個の炭素原子、より望ましくは2から約6個の炭素原子を含む。本願明細書で使用されているアルケニル基は選択的には一つか又はさらにより多くの置換基を含む可能性がある。

20

#### 【0202】

本願明細書で使用される「アルキニル」という用語は、24個までの炭素原子を含み、及び少なくとも一つの炭素-炭素三重結合を有する、直鎖又は分岐鎖炭化水素ラジカル基を指す。アルケニル基の例は、エチニル、1-プロピニル、1-ブチニル及び同様のものを含むが、これらに限定されない。アルキニル基は典型的には2から約24個の炭素原子、より典型的には2から約12個の炭素原子、より望ましくは、2から約6個の炭素原子を含む。本願明細書で使用されるアルキニル基は選択的に1もしくはそれ以上の置換基を含む可能性がある。

30

#### 【0203】

本願明細書で使用される「アミノアルキル」という用語は、アミノ置換アルキルラジカル基を指す。この用語はいずれの位置にアミノ基置換を有する $C_1 \sim C_{12}$ アルキル基を含むことを意味し、前記アルキル基は親分子にアミノアルキル基が結合している。アミノアルキル基の前記アルキル又はアミノ部分は置換基とともにさらに置換されることが可能である。

#### 【0204】

本願明細書で使用される「脂肪族の」という用語は、24個までの炭素原子を含む、直線状または分岐した炭化水素のラジカル基を指し、任意2つの炭素原子の間の飽和は一重、二重、又は三重結合である。脂肪族基は望ましくは1から約24個の炭素原子、より典型的には1から約12個の炭素原子、より望ましくは1から約6個の炭素原子を含む。脂肪族基の直線状又は分岐した鎖は、窒素、酸素、硫素及びリンを含む、1もしくはそれ以上のヘテロ原子によって中断される可能性がある。ヘテロ原子によって中断された、そのような脂肪族基は、例えばポリアルキレングリコール、ポリアミン、及びポリイミンのような、ポリアルコキシを含むが、これらに限定されない。本願明細書で使用されている脂肪族基は選択的にさらなる置換基を含むものであっても良い。

40

#### 【0205】

「脂環」という用語は周期性の環システムを指し、環は脂肪族である。前記環システムは1もしくはそれ以上の環を含むものであっても良く、少なくとも1つの環が脂肪族である。脂環はあらゆる程度の飽和を有する環を含む。望ましい脂環は、環内に約5から約9

50

個の炭素原子を有する環を含む。本願明細書で使用される脂環は選択的にさらなる置換基を有するものであっても良い。

【0206】

本願明細書で使用される「アルコキシ」はアルキル基と酸素原子の間に形成されたラジカル基を呼び、酸素原子は親分子にアルコキシ基をつけるのに使用される。アルコキシ基の例は、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペントキシ、ネオペントキシ、*n*-ヘキソキシ及び同様のものを含むが、これらに限定されない。本願明細書で使用されるアルコキシ基は選択的にさらなる置換基を含む可能性がある。

【0207】

本願明細書で使用される「ハロ(halo)」及び「ハロゲン(halogen)」という用語はフッ素、塩素、臭素及びヨウ素から選択される原子を言う。

【0208】

本願明細書で使用される「アリール」及び「芳香族の」という用語は、1もしくはそれ以上の芳香族環を有する単環式の又は多環式の炭素環式の環システムラジカル基を指す。アリール基の例はフェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、イデニル及び同様のものを含むが、これらに限定されない。望ましいアリール環システムは、1もしくはそれ以上の環に、約5から20個、又はさらに約6から14個の炭素原子を有する。本願明細書で使用されているアリール基は、選択的にさらなる置換基を含むものであっても良い。

【0209】

本願明細書で他に定義されていない限り、「アラルキル」及び「アリールアルキル」は、アルキル基及びアリール基の間に形成されるラジカル基を呼び、前記アルキル基は親分子にアラルキル基を結合させる場合に使用される。例は、ベンジル、フェネチル及び同様のものを含む。本願明細書で使用されているアラルキル基は選択的に、ラジカル基を形成するアルキル、アリール又は両方の基にさらなる置換基を含むものであっても良い。

【0210】

本願明細書で使用されている「ヘテロ環(heterocyclic)」又は「ヘテロ環のラジカル基」という用語は、少なくとも一つのヘテロ原子を含み、関連してヘテロアリール基を含んでいる、飽和されていない、一部飽和されている又は完全に飽和されている、ラジカル基の単環式の又は多環式の環システムを指す。ヘテロ環はまた融合した環システムを含むのを意味し、一もしくはそれ以上の融合した環システムはヘテロ原子を含まない。ヘテロ環基は典型的には硫素、窒素、又は酸素から選択される少なくとも1つの原子を含む。ヘテロ環基の例は、[1,3]ジオキサラン、ピロリジニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル1、ピペリジニル、ピペラジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、キノキサリニル、ピリダジニル、テトラヒドロフリル及び同様のものを含む。本願明細書で使用されるヘテロ環基は選択的にさらなる置換基を含むものであっても良い。ある態様では、ヘテロ環基は、例えば、約3から約50個の炭素原子、望ましくは約4から14個の炭素原子を有し、酸素、窒素、又は硫素から独立して選ばれる1から4個のヘテロ原子を有する。

【0211】

本願明細書で使用される「ヘテロアリール」及び「ヘテロ芳香族の」は単環式のまたは多環式の芳香族環、環システム又は融合した環システムを含んでいるラジカル基を呼び、少なくとも一つの環は芳香族であり、及び一つ又はより多くのヘテロ原子を含む。ヘテロアリールはまた、一つ又はより多くの融合した環がヘテロ原子を含んでいないシステムを含んでいる、融合環システムを含むのを意味する。ヘテロアリール基は典型的に、硫素、窒素、又は酸素から選ばれた一つの環原子を含む。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、チオフェニル、フラニ

10

20

30

40

50

ル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、キノキサリニル、及び同様のものを含むが、これらに限定されない。ヘテロアリールラジカル基は直接又は脂肪族基又はヘテロ原子のような結合鎖を通して親分子につくことが可能である。本願明細書で使用されるヘテロアリール基は、選択的にさらなる置換基を含む可能性がある。ある態様では、ヘテロアリール基は例えば、約3から50個の炭素原子望ましくは約4から14個の炭素原子を有し、酸素、窒素、又は硫素から独立して選ばれる1から4個のヘテロ原子を有する。

【0212】

本願明細書で使用される「ヘテロアリールアルキル」は、alkyl基を介して親分子につく、以前に定義されたヘテロアリール基を指す。例はピリジニルメチル、ピリミジニルエチル及び同様のものを含むが、これらに限定されるものではない。本願明細書で使用されるヘテロアルキル基は選択的にさらなる置換基を含むものであっても良い。

10

【0213】

本願明細書で使用される「アシル」は、有機酸から水酸基を除去することにより形成されるラジカル基を指し、一般式  $-C(O)-X$  を有し、ここでXは一般的に脂肪族、脂環又は芳香族である。例は、脂肪族カルボニル、芳香族カルボニル、脂肪族スルホニル、芳香族スルホニル、脂環スルホニル、芳香族リン酸、脂肪族リン酸及び同様のものを含む。本願明細書で使用されたアシル基は選択的にさらなる置換基を含むものであっても良い。

【0214】

本願明細書において別に定義されていない限り、アミド(amide)は  $-C(=O)NH_2$  及び置換されたアミドは  $-C(=O)NR_aR_b$  であり、少なくとも  $R_a$  及び  $R_b$  の1つはHとは異なる別の置換基である。

20

【0215】

本願明細書において別に定義されていない限り、アミノアルキルはアルキル基に結合したアミノ基を有するラジカル基を意味し、1または両方の基がさらに1若しくはそれ以上の置換基で置換されていても良い。前記ラジカル基はアルキルまたはアミノ基から親基に結合していても良い。

【0216】

本願明細書において別に定義されていない限り、アミノアルコキシはオキシ(アミノアルキル-O-)にさらにつく、アルキル基につくアミノ基を有するラジカル基を意味し、アミノ及び/又はアルキル基はさらに1若しくはそれ以上の置換基で置換されていても良い。

30

【0217】

本願明細書で使用される「保護基」という用語は、合成法の間で望ましくない反応に対して、これらに限定されないが、水酸基、アミノ基、及びチオール基を含む反応基を保護するための従来周知の不安定化学部分を指す。保護基は、一般的に、他の部位における反応の間、部位を選択的及び/又は直接的に保護するために使用され、その後除去されて更なる反応のため利用可能とするために保護されていないようにするものである。従来技術で知られている保護基は一般的に Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York (1999) で説明されている。

40

【0218】

本願明細書で説明されるオリゴマー化合物は、複数の不斉中心を含んでおり、したがって光学異性体、ジアステレオマー、及び他の立体異性体の形態をもたらす、それらは、フラノシル糖基に対して(R)-又は(S)-、(D)-又は(L)-のような絶対立体化学の観点から定義される。本発明は、そのような可能なすべての異性体、並びにラセミ体及び光学的に純粋な形態を含むことを意味する。光学異性体は、上述した方法によって、あるいはラセミ混合物を分割することによって、光学的に活性な各前駆体から調製される。前記分割は、分割剤の存在下、クロマトグラフィー、又は繰り返して行われる結晶化

50



、又は当業者に周知のこれらの技術をいくつか組み合わせることによって実施可能である。前記分割に関するさらなる詳細は、Jacquesら, Enantiomers, Racemates, and Resolutions (John Wiley & Sons, 1981) において見出される。本願明細書において説明される化合物がオルフィンの二重結合、他の不飽和、又は他の幾何学的非対称中心を含む場合、別に特定されていない限り、前記化合物はE及びZ幾何学異性体両方、又はシス-及びトランス-異性体の両方を含むのを意図する。同様に、互変異性体もまた含まれることを意図する。本願明細書に見られる任意の炭素-炭素二重結合の立体配置は、利便性のために選択されているのみであり、文脈にそう述べられていない限りは特定の立体構造を示すことを意図しているものではなく、従って、トランスとして本願明細書で任意に示した炭素-炭素二重結合又は炭素-ヘテロ原子二重結合は、シス、トランス、又はあらゆる割合における2の混合であっても良い。

10

#### 【0219】

本願明細書で使用される置換基は、そこに結合する1もしくはそれ以上の置換基を有していても良い。本願明細書で使用される「置換の」及び「置換基」は、望ましい特性を増強する又は望まれた効果を与えるために、典型的に他の基又は親化合物に付け加えられた基を含むことを意味する。置換基は保護される又は保護されていなくても良く、親化合物利用可能な部位または多くの利用可能な部位に結合させることが可能である。置換基は、さらに他の置換基で置換されていても良く、親化合物に直接結合するか又はアルキル又はヒドロカルビル基などの結合基を通して結合していても良い。そのような基は、これらに限定されないが、ハロゲン、ハイドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル(-C(O)R<sub>a</sub>)、カルボキシル(-C(O)O-R<sub>a</sub>)、脂肪族の、脂環、アルコキシ、置換されたオキソ(-O-R<sub>a</sub>)、アリール、アラルキル、複素環、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ(-NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)、イミノ(=NR<sub>b</sub>)、アミド(-C(O)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>又は-N(R<sub>b</sub>)C(O)R<sub>a</sub>)、アジド(-N<sub>3</sub>)、ニトロ(-NO<sub>2</sub>)、シアノ(-CN)、カルバミド(-OC(O)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>又は-N(R<sub>b</sub>)C(O)OR<sub>a</sub>)、ウレイド(-N(R<sub>b</sub>)C(O)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)、チオウレイド(-N(R<sub>b</sub>)C(S)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)、グアニジニル(-N(R<sub>b</sub>)C(=NR<sub>b</sub>)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>)、アミジニル(-C(=NR<sub>b</sub>)NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>又は-N(R<sub>b</sub>)C(NR<sub>b</sub>)R<sub>a</sub>)、チオール(-SR<sub>b</sub>)、スルフィニル(-S(O)R<sub>b</sub>)、スルホニル(-S(O)<sub>2</sub>R<sub>b</sub>)、スルホンアミジル(-S(O)<sub>2</sub>NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>又は-N(R<sub>b</sub>)S(O)<sub>2</sub>R<sub>b</sub>)及び抱合基を含む。各R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub>及びR<sub>c</sub>は、さらに、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式、複素環式、及びヘテロアリールアルキルを含む好ましい一覧のグループで置換される。

20

30

#### 【0220】

リン酸保護基は、米国特許第5,760,209号、第5,614,621号、第6,051,699号、第6,020,475号、第6,326,478号、第6,169,177号、第6,121,437号、第6,465,628号明細書に記載されているものを含み、これはこの参照により本願明細書で完全に組み込まれる。

40

#### 【0221】

##### オリゴマー化合物のスクリーニング

マイクロRNA等を含むスモールノンコーディングRNAに対する有効なモジュレーターを同定するスクリーニング方法もまた、本発明に包含され、それらの方法は、スモールノンコーディングRNA又はその一部を、1若しくはそれ以上のモジュレーター候補物質と接触させる工程と、スモールノンコーディングRNAの強度、発現量を減少または増加させる、又はその機能を変化させる1若しくはそれ以上の候補物質を選択する工程と、を有するものである。本願明細書に記すように、モジュレーター候補物質はマイクロRNA、またはその任意の一部を標的とするオリゴマー化合物である可能性がある。モジュレーターまたはその候補物質が、スモールノンコーディングRNAの強度、発現量を調節する

50

こと（例えば減少または増加させるなどの形で）、またはその機能を変化させることが一旦示されれば、そのモジュレーターは、本発明に従って、さらなる研究用途に使用するほか、標的のバリデーション、試験研究、検査または治療での試薬、薬剤として用いることができる。一実施形態において、特定のマイクロRNAの機能を調節する能力に対して、モジュレーター候補物質をスクリーニングする。

#### 【0222】

##### オリゴヌクレオチドの合成

オリゴマー化合物およびホスホアミダイトは、当業者にとって周知の方法で合成される。修飾型または天然型のヌクレオシドの低重合化は、DNA様化合物の合成方法に関する文献（*Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, Ed. Agrawal (1993), Humana Press）、および/またはRNA様化合物の合成方法に関する文献（*Scaringe, Methods (2001), 23, 206~217. Gait et al, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions*, Ed. Smith (1998), 1~36. Gallo et al., *Tetrahedron (2001), 57, 5707~5713*）に従って適切に行われる。あるいは、例えばDharmacon Research Inc.（コロラド州Lafayette）などの様々なオリゴヌクレオチド合成会社からオリゴマーを購入することもできる。

#### 【0223】

どのプロトコルを用いるかに関わらず、本発明に従って使われるオリゴマー化合物は周知の固相合成法によって簡便かつ規定通りに生成することができる。そうした合成のための器具は、例えばApplied Biosystems（カリフォルニア州Foster City）などのいくつかの供給メーカーによって販売されている。以上述べたような合成方法として、当該技術分野で既知である方法（液相合成法など）であれば他のどのようなものであっても、追加的に、または代替的に用いることができる。

#### 【0224】

オリゴヌクレオチドの単離および分析の方法は当該技術分野において周知のものである。オリゴヌクレオチドの小規模な合成、単離そして分析には、96穴プレートが特に便利である。

#### 【0225】

##### 二重鎖オリゴマー化合物の設計およびスクリーニング

スクリーニングおよび標的のバリデーションの研究において、本発明のオリゴマー化合物は、そのそれぞれに対応する相補鎖のオリゴマー化合物と同時に用いて、安定した二本鎖（二重鎖）のオリゴヌクレオチドを形成させて使用することができる。本発明に従い、本発明のオリゴマー化合物およびその相補鎖を含む一連の二重鎖が、スモールノンコーディングRNAを標的とするように設計することができる。前記二重鎖の末端は、1若しくはそれ以上の天然型、または修飾型核酸塩基の付加によって、オーバーハングを形成するように修飾することができる。そうすると、二重鎖RNAのセンス鎖はアンチセンス鎖に対して相補的に設計および合成され、いずれの末端にも修飾または付加を持つようにすることもまたできる。例えばいくつかの実施形態では上述のように、二重鎖のうちの両方の鎖は中央領域の核酸塩基が相補的であり、それぞれの鎖が一方または両方の末端にオーバーハングを有するようになるであろう。

#### 【0226】

一部の実施形態において、以下に示すように、CGAGAGGCGGACGGGACCG（配列ID番号：1）という配列を有するアンチセンス鎖を含む二重鎖が（一本鎖のオーバーハングが無い）非突出末端を持つように調製することができる。

#### 【0227】

## 【化 3】

cgagagggcggacgggaccg	アンチセンス鎖 (配列ID番号:1)
gctcuccgccugcccuggc	相補鎖 (配列ID番号:2)

## 【0228】

他の実施形態において、以下に示すように、CGAGAGGCGGACGGGACCG (配列ID番号:1) という配列を有し、二塩基分のデオキシチミジン (dT) のオーバーハングを有するアンチセンス鎖および、それに対して相補的なセンス鎖とを含む二重鎖がオーバーハングを持つように調製することができる。

10

## 【0229】

## 【化 4】

cgagagggcggacgggaccgTT	アンチセンス鎖 (配列ID番号:3)
TTgcucuccgccugcccuggc	相補的センス鎖 (配列ID番号:4)

## 【0230】

これらの配列はウラシル (U) を含むように図示されているが、当業者は、ウラシル (U) が、DNA配列に見られるチミンによって置換できることを理解するであろう。二重鎖を構成するRNA鎖は本発明で開示されている方法によって合成することができ、またはDharmacon Research Inc. (コロラド州Lafayette) から購入することもできる。

20

## 【0231】

診断法、薬剤探索および治療法

本発明のオリゴマー化合物および組成物はさらに、試験研究、薬剤探索、キットおよび診断法、および治療法にも用いることができる。

## 【0232】

試験研究での利用では、本発明のオリゴマー化合物は、核酸分子を標的として、その正常な機能に干渉するように用いられる。まず、本発明における1若しくはそれ以上のオリゴマー化合物または組成物によって処理された細胞または組織内での発現パターンを、化合物または組成物によって処理されていないコントロールの細胞または組織内のものと比較した。そして、その結果生成されたパターンは、例えば、試験の対象となる遺伝子の、疾患との関連性、シグナル伝達経路、細胞内局在、発現量、サイズ、構造、または機能などに関連する核酸の発現の差別的なレベルに対して分析される。これらの分析は、刺激を受けた、または受けていない細胞に対して、および発現パターンに影響する他の化合物の存在下、または非存在下で行うことができる。

30

## 【0233】

薬剤探索での利用では、スモールノンコーディングRNA、遺伝子、またはタンパク質と、病状、表現型、または健康状態との間に存在する関連性を解明するために、本発明のオリゴマー化合物が用いられる。これらの方法は、標的の検出または調節を包含するものであり、以下の工程を含む。すなわち、サンプル、組織、細胞、または微生物の、本発明のオリゴマー化合物および組成物への接触の工程、標的の強度および/またはmRNAまたはそれがコードするタンパク質など下流の遺伝子産物の強度の計測の工程、処理後のある時点での表現型または化学的な反応の結果の測定工程、および未処理のサンプル、ポジティブコントロール、またはネガティブコントロールとの計測値の選択的な比較の工程である。これらの方法は、標的のバリデーションの過程で未知の遺伝子の機能を解明するための他の実験と、または疾患の治療あるいは予防のための標的としての特定の遺伝子産物の有効性を解明するための他の実験と平行して、または組み合わせて行うことができる。

40

## 【0234】

50

キットおよび診断法としての利用では、本発明のオリゴマー化合物および組成物は、単独で、または他の化合物あるいは治療法との組合せで用いて、差分解析および/またはコンピナトリアル解析のツールとして使用することができ、それによってタンパク質をコードしていない、またはコードしている核酸の一部または全体の相補物の、細胞および組織内での発現パターンを解明することができる。

#### 【0235】

当業者は治療目的において、化合物および組成物の特異性および感度を利用することができる。アンチセンスのオリゴマー化合物は、ヒトを含む動物の疾患の治療の助けとして用いられてきている。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、ヒトに対して安全かつ効果的に投与されてきており、さらに、多数の臨床試験が現在も進行中である。従って、オリゴマー化合物が有効な治療法であることは確立されており、前記治療法を細胞、組織、および特にヒトをはじめとする動物の処理/治療のための処置において実用的であるように構成することができる。

#### 【0236】

治療法としての利用では、選択されたスモールノンコーディング核酸の発現を調節することで、治療、改善、または向上することができる症状を示す疾病または疾患を有すると疑われる動物、望ましくはヒトに対して、前記選択されたスモールノンコーディング核酸を標的とする化合物および組成物を投与する。本発明の化合物のうちの優れたものは強い活性と改善された治療指数を示し、従って、治療法への適用に適している。例えば、これに限定されるものではないが一実施形態では、治療方法は、疾病または疾患と関連付けられる症状を処理、改善、または向上させるために有効な量のモジュレーターを動物へ投与する、または接触させる工程を含むものである。本発明の化合物のうちの優れたものは、標的のスモールノンコーディングRNAの活性または機能を効果的に調節するか、または標的のスモールノンコーディングRNAの発現または強度を抑制する。望ましい実施形態では、標的のスモールノンコーディングRNAはマイクロRNA、プレマイクロRNA、またはポリシストロニックあるいはモノシストロニックプリマイクロRNAである。さらに追加的な実施形態では、標的のスモールノンコーディングRNAはマイクロRNAファミリーの一構成員である。あるいは、マイクロRNAファミリーのなかから2若しくはそれ以上の構成員が調節のために選択される。一実施形態では、動物内の標的の強度、活性、または発現量は約10%抑制される。他の実施形態では、動物内の標的の強度、活性、または発現量は約30%抑制される。さらには、動物内の標的の強度、活性、または発現量は50%またはそれ以上、60%またはそれ以上、70%またはそれ以上、80%またはそれ以上、90%またはそれ以上、95%またはそれ以上、抑制される。また他の実施形態では、マイクロRNAおよびマイクロRNAファミリーに関連付けられるありとあらゆる症状の治療に用いられる薬剤の製造における本発明の化合物の利用を、本発明は提供する。

#### 【0237】

動物において、血清、脂肪組織、肝臓、またはスモールノンコーディングRNAあるいはその前駆体を含むことが知られている他のどのような体液、組織、または器官でも、標的強度の減少を測定することができる。さらには、分析される体液、組織、または器官に含まれている細胞は、標的となるスモールノンコーディングRNAそれ自身のさらに下流の標的となる核酸分子を含む。

#### 【0238】

医薬品組成物を設計するための方法および組成物

本発明はまた、オリゴマー化合物、スモールノンコーディングRNA、および本発明の組成物を含む製剤設計および医薬品組成物を含む。医薬品組成物を設計するための方法および組成物は、例えば、これに限定されるものではないが、投与経路、病気の程度、または投与量を含む数々の基準に依存する。当業者は、そういった検討事項を良く理解している。

#### 【0239】

本発明のオリゴマー化合物および組成物は、有効な量の化合物または組成物を、適切で医薬品としての条件を満たした希釈剤または担体に添加することで、医薬品組成物において利用することができる。本発明のオリゴマー化合物および方法の使用は、疾病予防においてもまた有用である。

#### 【0240】

本発明のオリゴマー化合物および組成物は、医薬品としての条件を満たしたあらゆる塩、エステル、またはそうしたエステルの塩を包含し、また、ヒトを含む動物への投与によって（直接的に、あるいは間接的に）生物学的な活性代謝物、または残基を生じさせることができる他のあらゆる化合物を包含する。従って例えば、プロドラッグおよび本発明のオリゴマー化合物の塩として医薬品の条件を満たすもの、そのようなプロドラッグの塩で医薬品の条件を満たすもの、およびその他の生物学的な同等物もまた、この開示内容の範囲内である。

10

#### 【0241】

「プロドラッグ」という用語は、不活性な状態で準備されており、それが内在性の酵素または他の化学物質および/または条件の働きによって、生体内や細胞内で活性型（すなわち医薬品）に変換されるものを意味している。

#### 【0242】

「医薬品としての条件を満たした塩」という用語は、本発明の化合物および組成物の塩で、生理的および医薬品としての条件を満たした塩について言及している。すなわち、元の化合物に望まれる生物学的活性を保持し、さらに望ましくない毒性効果をもたらさないような塩を言う。適切な例としては、これに限定されるものではないが、ナトリウム塩やカリウム塩が挙げられる。

20

#### 【0243】

いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は被験体に対して経口投与することができる。被験体としてはマウス、ラット、イヌ、モルモットまたはヒト以外の霊長類などの哺乳類を用いることができる。またいくつかの実施形態では、ヒトまたはヒトの患者を被験体とすることができる。また、ある実施形態での被験体は、ここでさらに詳しく述べられる通り、1若しくはそれ以上のプリマイクロRNAの強度または発現量を調節する必要に迫られている可能性がある。一部の実施形態において、被験対象に投与される組成物は、ここで述べられる通り、1若しくはそれ以上の箇所を修飾されたヌクレオチドを含むであろう。

30

#### 【0244】

##### 細胞培養およびオリゴヌクレオチド処理

標的の核酸の発現または機能に対するオリゴマー化合物の効果は、標的の核酸が検出可能な強度で存在しさえすれば、いかなるタイプの細胞を用いて測定しても良い。使用する細胞の決定は、例えば、ノザンプロット法、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ法、またはリアルタイムPCR法など、当該技術分野で通常に使用されている方法によって容易に行うことができる。このような分析に用いられる様々な細胞は、民間の供給メーカー（例えば、American Type Culture Collection, ヴァージニア州Manassas; Zen-Bio, Inc, ノースカロライナ州Research Triangle Park; Clonetics Corporation, メリーランド州Walkersville）から入手可能であり、市販の試薬（例えば、Invitrogen Life Technologies, カリフォルニア州Carlsbad）を用いて供給メーカーの指示に従って細胞を培養した。実例となる細胞の種類としては、これに限定されるものではないが：T-24細胞、A549細胞、正常なヒト乳腺上皮細胞（normal human mammary epithelial cells: HMECs）、MCF7細胞、T47D細胞、BJ細胞、B16-F10細胞、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）、正常ヒト皮膚繊維芽細胞（human neonatal dermal fibroblast: NHDF）、ヒト表皮角化細胞（Hhuman embryonic keratinocytes: HEK）、

40

50

293T細胞、HepG2、ヒト前駆脂肪細胞、分化したヒト脂肪細胞（当該技術分野において既知の方法に従ってヒト前駆脂肪細胞を分化させたもの）、NT2細胞（NTERA-2 cl.D1としても知られる）、およびHeLa細胞が挙げられる。

【0245】

アンチセンスオリゴマー化合物による処理

本発明のオリゴマー化合物による細胞の処理は、細胞密度が約80%に達した時点で行われる。オリゴマー化合物の細胞への導入には、カチオン性脂質トランスフェクション試薬LIPOFECTIN（登録商標）（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）を用いる。オリゴマー化合物とLIPOFECTIN（登録商標）をOPTI-MEM（登録商標）1（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）中で混合し、オリゴマー化合物とLIPOFECTIN（登録商標）とを望みの最終濃度に到達させる。細胞に添加する前に、オリゴマー化合物、LIPOFECTIN（登録商標）、およびOPTI-MEM（登録商標）1を完全に混合させ、約0.5時間インキュベートした。細胞培地をプレートから除去し、滅菌したガーゼ上でプレートを軽くたたく。96穴プレートの各ウェルを、それぞれ150 $\mu$ Lのリン酸緩衝生理食塩水またはハンクス液で洗浄する。24穴プレートの各ウェルを、それぞれ250 $\mu$ Lのリン酸緩衝生理食塩水またはハンクス液で洗浄する。各ウェル中の洗浄緩衝液を、96穴プレートまたは24穴プレートの場合、それぞれ100 $\mu$ L、250 $\mu$ Lのオリゴマー化合物/OPTI-MEM（登録商標）/LIPOFECTIN（登録商標）の混合液と置換する。未処理のコントロール細胞には、LIPOFECTIN（登録商標）のみを与える。プレートは37 $^{\circ}$ Cで4~7時間ほどインキュベートした後、細胞培地を除去し、滅菌したガーゼ上でプレートを軽くたたく。96穴プレートまたは24穴プレートの各ウェルに、それぞれ100 $\mu$ L、1mLの成長培地をそのまま添加する。オリゴヌクレオチド処理から16~24時間後に細胞を採取し、RNAを単離して標的量の減少をリアルタイムPCRで計測するか、もしくは他の表現型のアッセイを行う。処理した細胞のデータ測定は3回繰り返して行い、3回の試行の平均値を結果とする。

【0246】

あるいは、細胞のトランスフェクションはLIPOFECTAMINE（登録商標）（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）を用いて行う。細胞密度が65~75%に達してから、それをオリゴヌクレオチドで処理する。オリゴヌクレオチドとLIPOFECTAMINE（登録商標）を、OPTI-MEM（登録商標）1血清使用量低減培地（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）中で混合し、オリゴヌクレオチドの濃度が望ましい値になるように、そしてLIPOFECTAMINE（登録商標）の濃度がオリゴヌクレオチド100nMにつき2~12 $\mu$ g/mLの間になるようにする。このトランスフェクション混合液を室温下で約0.5時間インキュベートする。96穴プレートで培養した細胞の場合、各ウェルを100 $\mu$ LのOPTI-MEM（登録商標）で一回洗浄した後、130 $\mu$ Lのトランスフェクション混合液で処理する。24穴プレート、またはその他の標準的な組織培養プレートで培養した細胞の場合も、適量の培地およびオリゴヌクレオチドを用いて同様に処理する。細胞の処理およびデータの取得は2回、または3回に渡って行う。37 $^{\circ}$ Cで約4~7時間処理した後、トランスフェクション混合液を含む培地を新鮮な培地で置換する。オリゴヌクレオチド処理を16~24時間行った後、細胞を採取する。

【0247】

一部の実施形態において、本発明のオリゴマー化合物を一過性に発現するように、細胞にトランスフェクトした。また他の一部の実施形態において、細胞にトランスフェクションを受けた後、本発明のオリゴマー化合物を安定的に発現するように選別される。

【0248】

オリゴヌクレオチドの濃度は使用する細胞株ごとに異なる。特定の細胞株に最適なオリゴヌクレオチド濃度を決定する方法は、当該技術分野において周知である。例えば、H-rasのような遺伝子を標的とするポジティブコントロールのヌクレオチドを用いて、一

定範囲の様々な濃度でもって細胞を処理する。コントロールは非修飾、均一に修飾された、またはキメラのオリゴマー化合物である。例えば、コントロールの標的RNAを80%抑制するポジティブコントロールのオリゴヌクレオチドの濃度が、その細胞株についてその後に行う実験での新規なオリゴヌクレオチドのスクリーニングのための濃度として用いられる。もし80%の抑制が実現できなければ、標的の発現または機能を60%抑制するのに必要なポジティブコントロールのオリゴヌクレオチドの最も低い濃度が、その細胞株についてその後に行う実験でのオリゴマー化合物のスクリーニングのための濃度として用いられる。ここで用いられるオリゴヌクレオチド濃度は1 nMから300 nMまでの範囲で変化させてよい。

【0249】

10

標的の強度または発現のヌクレオチドによる抑制の解析

標的の強度または発現の調節は、当該技術分野において既知である様々な方法で分析できる。例えば、標的の核酸の強度を定量化する方法としては、ノザンプロット法、競合ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、または定量的リアルタイムPCR法などがある。RNAの分析は、細胞のトータルRNA、またはpoly(A)+mRNAで行うことができる。RNA単離の方法は当該技術分野において周知である。ノザンプロット法もまた、当該技術分野において通常に用いられている。定量的リアルタイムPCR法は、市販のABI PRISM(登録商標)7600、7700、または7900配列検出システム(PE Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster Cityより入手可能)を、メーカーの指示に従って用いることで簡便に行うことができる。

20

【0250】

さらに、遺伝子発現解析の方法として当該技術分野において既知のものの例としては、DNAアレイ、またはマイクロアレイ(Brazma and Vilo, FEBS Lett, 2000, 480, 17~24; Celis, et al., FEBS Lett, 2000, 480, 2~16), SAGE法(serial analysis of gene expression: SAGE)(Madden, et al., Drug Discov. Today, 2000, 5, 415~425), READS法(restriction enzyme amplification of digested cDNAs: READS)(Prashar and Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258~272), TOGA法(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), ESTシーケンシング(expressed sequence tag(:EST) sequencing)(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フィンガープリント法(subtractive RNA fingerprinting: SuRF)(Fuchs, et al., Anal. Biochem., 2000, 286, 91~98; Larson, et al., Cytometry, 2000, 41, 203~208), サブトラクション法(subtractive cloning)、ディファレンシャルディスプレイ法(differential display: 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法(comparative genomic hybridization)(Carulli, et al., J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286~96), 蛍光in situハイブリダイゼーション法(fluorescent in situ hybridization: FISH)(Going and Gusterson, Eur. J. Ca

30

40

50

ncer, 1999, 35, 1895~904), およびマススペクトロメトリー法 (mass spectrometry methods) (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235~41) が挙げられる。

#### 【0251】

##### RNAの単離

HeLa、T-24、およびA549などの細胞株からのRNA試料の調製は、当該技術分野において既知の方法、例えば、TRIzol (登録商標) (Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad) を用いてメーカーの推奨するプロトコルに従って行う。簡単に説明すると、細胞の単層を冷却PBSで2回洗浄した後、培養皿の表面積10平方センチメートル当たり1mLのTRIzol (登録商標) (Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad) を用いて細胞を溶解し、TRIzol (登録商標) のプロトコルに従ってトータルRNAを調製する。

10

#### 【0252】

##### 標的RNA強度の定量的リアルタイムPCR分析

標的RNA強度の計量は、ABI PRISM (登録商標) 7600, 7700、または7900配列検出システム (PE - Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster City) を用いた定量的リアルタイムPCR法を利用し、メーカーの指示に従って行う。定量的リアルタイムPCRの方法は当該技術分野において周知のものである。

20

#### 【0253】

リアルタイムPCRを行う前に、単離されたRNA試料を逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) 処理し、次のリアルタイムPCR増幅に用いる基質とする相補的DNA (cDNA) を作製する。RTおよびリアルタイムPCR反応は、同じサンプルウェル中で続けて行う。RTおよびリアルタイムPCR用の試薬はInvitrogen (カリフォルニア州Carlsbad) より入手できる。RTおよびリアルタイムPCR反応は20μLのPCRカクテル (2.5×PCRバッファ (不含MgCl<sub>2</sub>), 6.6mMのMgCl<sub>2</sub>, それぞれ375μMのdATP, dCTP, dCTP, およびdGTP, それぞれ375μMのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、125μMのプロブ、4ユニットのRNAseインヒビター、1.25ユニットのPLATINUM (登録商標) Taq、5ユニットのMuLVリバーストランスクリプターゼ、および2.5×ROXダイ) を、30μLのトータルRNA溶液 (20~200ng) が入っている96穴プレートに加えることで行う。RT反応は48℃で30分間インキュベートすることで行う。続いて、95℃で10分間インキュベートすることでPLATINUM (登録商標) Taqを活性化し、2ステップのPCRプロトコルを40サイクル実行する。PCRプロトコルは: 95℃で15秒間 (解離) に続いて60℃で1.5分間 (アニーリング/伸長) である。

30

#### 【0254】

リアルタイムPCRによって得られた標的遺伝子 (またはRNA) の測定値の標準化は、たとえばGAPDHなど発現が一定している遺伝子の発現強度を用いて、またはRIBOGREEN (登録商標) (Molecular Probes, Inc. オレゴン州Eugene) を使用したトータルRNAの計量によって行う。GAPDHの発現は、標的と同時に、平行して、または独立して実行するリアルタイムPCRによって計量する。トータルRNAはRIBOGREEN (登録商標) RNA計量試薬 (Molecular Probes, Inc. オレゴン州Eugene) を用いて計量する。RIBOGREEN (登録商標) によるRNAの計量方法は、Jones, L. J., et al., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368~374) に詳しい。

40

#### 【0255】

このアッセイでは、170μLのRIBOGREEN (登録商標) のワーキング溶液 (

50



RIBOGREEN (登録商標) 試薬を、10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 で 1:350 に希釈したものを、30  $\mu$ L の精製された細胞RNAの入った96穴プレートにピペットで注入する。このプレートをCYTOFLUOR (登録商標) 4000 (PE Applied Biosystems) を用いて、励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm で読み取る。

#### 【0256】

プローブおよびプライマーは標的配列にハイブリダイズするよう設計する。リアルタイムPCRのプローブおよびプライマーの設計方法は当該技術分野において周知であり、これにはPRIMER EXPRESS (登録商標) (Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster City) のようなソフトウェアの利用も含まれる。そういったソフトウェアは、ALDOAおよびGYS1といったmRNAの検出に用いるプローブおよびプライマーの設計に用いることができる。

#### 【0257】

標的RNAの強度のノザンプロット法による解析

ノザンプロット法は当該技術分野においてルーティン的な手順に従って行われる。15 ~ 20  $\mu$ g のトータルRNAを、TBEバッファシステム (Invitrogen) を用いた10%アクリルアミドゲル (含尿素) 電気泳動で分画する。RNAは、Xcell SURELOCK (商標) ミニセル電気泳動槽 (Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad) 中で、ゲルからHYBOND (商標) - N+ ナイロン膜 (Amersham Pharmacia Biotech, ニュージャージー州Picataway) へエレクトロブロットする。メンブレンはSTRATALINKER (登録商標) UVクロスリンカー2400 (Stratagene, Inc, カリフォルニア州La Jolla) を用いたUV架橋を施し、その後RAPID-HYB (商標) バッファ溶液 (Amersham) を用いて、メーカーがオリゴヌクレオチドプローブ向けに推奨している方法でプローブによる検出を行う。

#### 【0258】

標的特異的なDNAオリゴヌクレオチドプローブが、目的のRNAの検出に用いられる。マイクロRNAの検出に用いるプローブは、IDT (アイオワ州Coralville) など民間業者が合成している。プローブの5'末端はT4ポリヌクレオチドキナーゼによって ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP (Promega, ウィスコンシン州Madison) で標識される。ローディングおよびプロットingの効率のばらつきを標準化するために、メンブレンのストリッピングを行い、U6 RNAに対するプローブで再度検出を行う。ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンの映像化および定量化は、STORM (登録商標) 860 PHOSPHORIMAGER (登録商標) システム、およびIMAGEQUANT (登録商標) ソフトウェアV3.3 (Molecular Dynamics, カリフォルニア州Sunnyvale) で行うことができる。

#### 【0259】

タンパク質量の解析

スモールノンコーディングRNAによって調節または制御されている下流の標的タンパク質量の評価または定量化は、当該技術分野において周知の様々な方法によって行うことができる。そのようなものとしては、免疫沈降法、ウェスタンブロット法 (イミューノブロットing)、ELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)、定量的タンパク質解析、タンパク質活性解析 (例えば、カスパーゼ活性アッセイなど)、免疫組織化学法、免疫細胞化学、またはFACS法 (fluorescence-activated cell sorting: FACS) が挙げられる。標的に対する抗体は様々な方法で同定、および入手できる。例えば、MSR抗体カタログ (Aerie Corporation, ミシガン州Birmingham)、または当該技術分野において周知であるモノクローナル、またはポリクローナル抗体の標準的な作製方法によることもできる。

#### 【0260】

## 表現型の解析

ひとたびここに開示される方法によってモジュレーターが設計、または同定できたならば、そのオリゴマー化合物は1若しくはそれ以上のさらなる表現型解析に供することができ、その解析はそれぞれが特定の病状または症状に関連する生理条件の治療、改善、または向上においての有効性を予想させる、または示唆する重要な結果を有するであろう。

### 【0261】

表現型の解析と、それに用いるキットおよび試薬は、当業者にとって周知であり、本発明においても健康および疾患の状態における標的の役割および/または関連性の調査に用いられている。表現型の解析として代表的なものとしては、細胞周期の解析、アポトーシスの解析、血管新生の解析（例えば、内皮管形成の解析、血管新生関連遺伝子の発現解析、マトリックスメタロプロテアーゼ活性の解析など）、脂肪細胞の解析（例えば、インスリンシグナルの解析、脂肪細胞の分化の解析など）、炎症の解析（サイトカインシグナリングの解析、樹状細胞によるサイトカイン生成の解析など）が挙げられる。こうした解析法の例は当該技術分野において容易に見つかる（例えばその結果、米国特許出願公表第2005/0261218号は、そのすべてが参照として組み込まれる）。さらなる表現型の解析方法には、幹細胞の分化および脱分化、例えば成人幹細胞や胚性幹細胞を評価するものも含まれる。これらの解析方法のプロトコルもまた、当該技術分野において周知のものである（例えば、Turksen, Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols, 2001, Humana Press; ニュージャージー州Totowa; Klug, Hematopoietic Stem Cell Protocols, 2001, Humana Press, ニュージャージー州Totowa; Zigova, Neural Stem Cells: Methods and Protocols, 2002, Humana Press, ニュージャージー州Totowa）。

### 【0262】

#### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

マイクロRNAsを標的とするオリゴマー化合物の活性は、DUAL-LUCIFERASE（登録商標）レポーターアッセイ（Promega, ウィスコンシン州Madison）で、ルシフェラーゼ活性が正常なマイクロRNA活性（すなわち、相補的な配列への結合）によって阻害されることを利用してインビトロで評価することができる。オリゴマー化合物は、標的とするマイクロRNAがルシフェラーゼレポーター中の相補的な配列へ結合することを阻害し、それによってルシフェラーゼの活性が促進される。ルシフェラーゼレポーターは、目的のマイクロRNAの配列を用いて作製できる。

### 【0263】

マイクロRNAルシフェラーゼセンサーコンストラクトは、目的のマイクロRNAに対して相補的な配列を、pGL3-Control（Promega, ウィスコンシン州Madison）の3'-UTRに挿入することで作製できる。アッセイの1日目に、HeLa細胞（ATCC, ヴァージニア州Manassusより入手）をT-170フラスコ（BD Biosciences, ニュージャージー州Franklin Lakes）に、 $3.5 \times 10^6$ 細胞/フラスコとなるように播種する。HeLa細胞はHigh Glucose（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）を入れたダルベッコMEM培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium）で培養する。2日目は、各フラスコ内のHeLa細胞にそれぞれ10 µgのマイクロRNAルシフェラーゼセンサーコンストラクトを導入する。各フラスコには同時に、ルシフェラーゼシグナルの標準化に用いるRenillaを発現するpRL sensor plasmid（Promega, ウィスコンシン州Madison）をそれぞれ0.5 µgずつ導入する。HeLa細胞への遺伝子導入では、1フラスコあたり20 µLのLIPOFECTAMINE（登録商標）（Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad）2000を用いる。4時間のトランスフェクションの後、細胞をPBSで洗浄し、そしてトリプシン処理を施す。遺伝子導入したHeLa細胞は、各ウェル当た

り40,000細胞となるよう、24穴プレート(BD Falcon)に再び播種してオーバーナイトで培養する。3日目には、LIPOFECTIN(登録商標)(Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad)を用いてオリゴマー化合物をHeLa細胞へ導入するが、この際には1mLのOPTI-MEM(登録商標)1血清使用量低減培地(Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad)中で100nMのASO当たりのLIPOFECTIN(登録商標)が2.5μLとなるようにし、4時間処理する。ASOによるトランスフェクションの後、オリゴマー化合物を含む培地は、High Glucose(Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad)を入れたダルベッコMEM培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium)で置換する。4日目には、HeLa細胞を溶解して、DUAL-LUCIFERASE(登録商標)レポーターアッセイ(Promega, ウィスコンシン州Madison)を用いてルシフェラーゼ活性を測定する。

10

#### 【0264】

##### インビボでの研究

実験動物モデルは、マイクロRNAsを標的とするオリゴマー化合物の効果、効能、および治療指数の評価に用いられる。

#### 【0265】

実験動物はJackson Laboratoriesなどの民間業者から入手できる。オリゴマー化合物は生理食塩水に溶解し、それを腹腔内へ投与する。実験の最後には、器官を詳細に観察し、様々な組織からRNAを単離して定量的PCRによる解析を行い、血清または血液を採取して、例えばコレステロール、トリグリセリド、およびブドウ糖などの血清マーカー量を測定する。肝組織中グリセリドの量もまた測定する。

20

#### 【0266】

そうしたインビボ実験で行われるさらなる解析には、肝臓切片の組織学的な解析による形態変化の評価も含まれる。肝臓の組織学的な解析は、当該技術分野において既知であるルーティン的な方法を用いて行われる。簡単に説明すると、肝臓を10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋する。4mmの切片を作製してスライドガラス標本に載せる。脱水の後、切片をヘマトキシリンエオジン染色する。形態の解析には、oil Red O染色を用いた肝臓脂肪症の評価も含まれ、その染色法もまた当該技術分野において既知のものである。

30

#### 【0267】

ここで開示されるものに加えて、本発明に対する様々な改良/変更等は、当業者にとってはここまでの記述からすると明らかなものである。そうした改良/変更等はまた、添付の請求項の範囲に含まれることが意図されたものである。本出願で引用されている各参考文献(これらに限定するものではないが、研究論文、米国および諸外国の特許、特許出願公表、国際特許出願公表、GENBANK(登録商標)アクセッション番号、およびそれらに類するものを含む)は、それらのすべてが参照として本発明へ特に組み込まれるものである。ここで開示される本発明がより良く理解されるために、以下に実施例を提供する。それらの実施例を通して、分子クローニング反応およびその他の標準的なDNA組換え技術は、特に断りが無い限り、例えばManiatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press(1989)にあるようなルーティン的な方法に従って、市販の試薬を用いて行われた。

40

#### 【0268】

これらの実施例は説明を目的とするためだけのものであって、いかなる方法によっても本発明を限定解釈するものではないということを理解されたい。当業者は、本発明の精神から逸脱することなく、様々な化合物を設計するために、本発明の根底にある原理をただちに採用することができる。

##### (実施例)

#### 【実施例1】

50

## 【0269】

均一に修飾されたオリゴマー化合物の *anti*-*miRNA* 活性

マイクロRNAを標的とし、均一に修飾されたオリゴマー化合物が、ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、マイクロRNAの活性を調節する能力を検定した。均一に修飾された化合物は、糖による均一な修飾、ヌクレオシド間の結合部の均一な修飾、またはそれらの組合せを含む。培養細胞のオリゴマー化合物による処理に続いて、ルシフェラーゼ活性が測定される。ここで、ルシフェラーゼ活性の上昇は、オリゴマー化合物がマイクロRNAの活性を阻害していることを示す。

*miR*-21 (TAGCTTATCAGACTGATGTTGA; 配列ID番号: 113) に相補的な22塩基のヌクレオチドを、pGL3-Control (Promega) の3'-UTRへ挿入することで、*miR*-21ルシフェラーゼセンサーコンストラクトを作製した。ここで記述している方法で、DUAL-LUCIFERASE (登録商標) レポーターアッセイ (Promega, ウィスコンシン州Madison) を実行した。

10

## 【0270】

HeLa細胞へ*anti*-*miR*-21オリゴマー化合物(以下の配列を有する: TCACATCAGTCTGATAAGCTA、配列ID番号: 113)が導入された。前記オリゴマー化合物は以下のような均一な修飾モチーフを有する: 均一な2'-MOEおよび均一なホスホロチオエート; 均一な2'-MOEおよび均一なリン酸ジエステル; 均一な2'-O-Meおよび均一なホスホロチオエート; 均一な2'-OMeおよび均一なリン酸ジエステル; 均一な2'-Fおよび均一なホスホロチオエート、である。ホスホロチオエートの骨格を持つオリゴマー化合物の中では、均一な2'-Fオリゴマー化合物が最も強い*anti*-*miR*-21活性を有しており、それに次ぐのは均一な2'-MOEおよび2'-OMeオリゴマー化合物である。全体の中で最も強い*anti*-*miR*-21活性を示すものは均一な2'-MOEおよびリン酸ジエステルを持つオリゴマー化合物である。

20

## 【0271】

均一に修飾された化合物で、*miR*-21に対してミスマッチを有するものもまた検定された。均一な2'-MOE修飾、およびヌクレオシド間に均一なホスホロチオエート結合を含む*anti*-*miR*-21オリゴマー化合物によってHeLa細胞を処理した。オリゴマー化合物には、合計1から6箇所のミスマッチを導入した。1箇所のミスマッチの導入によって、*miR*-21に対するオリゴマー化合物の阻害活性は減少した。オリゴマー化合物の3'末端、つまりマイクロRNAの5'末端のシード領域に対して相補的な場所へ1箇所のミスマッチを導入したものは、他の場所に1箇所のミスマッチを含むオリゴマー化合物と比較して、さらに大幅な阻害活性の減少を示す結果となった。2若しくはそれ以上のミスマッチは弱い活性をもたらし、3若しくはそれ以上のミスマッチはさらに活性を微弱なものとした。従って、オリゴマー化合物が標的のマイクロRNAを調節する強度は、ミスマッチの導入によって制御することができる。

30

## 【0272】

配列が一部欠失した場合のオリゴマー化合物の阻害活性への影響についてもまた実験を行った。均一な2'-MOEおよびヌクレオシド間に均一なホスホロチオエート結合を含み、5'末端または3'末端にサブユニットの欠失を導入した*anti*-*miR*-21オリゴマー化合物でHeLa細胞を処理した。5'または3'末端のいずれか一方の1サブユニットをASOsから欠失させても活性への悪影響はなかった。オリゴマー化合物の3'末端から1サブユニットを欠失させると、*anti*-*miR*-21オリゴマー化合物の阻害活性はわずかに改善した。2若しくはそれ以上のサブユニットの欠失は、*anti*-*miR*-21の活性を大きく減少させる結果となった。従って、オリゴマー化合物が標的のマイクロRNAを調節する強度は、配列の一部欠失によって制御することができる。

40

## 【0273】

均一に修飾されたオリゴマー化合物の活性の持続時間を評価した。以下の通りに修飾し

50

た *anti-miR-21* オリゴマー化合物によって *HeLa* 細胞を処理した：均一な 2'-MOE および均一なリン酸ジエステル；均一な 2'-MOE および均一なホスホロチオエート；均一な 2'-OMe および均一なリン酸ジエステル；均一な 2'-OMe および均一なホスホロチオエート、である。オリゴマー化合物によるトランスフェクションから、4, 8, 24、および 48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。短い時間の時は、均一に修飾されたオリゴマー化合物は、どれもかなりの強さの *anti-miR-21* 活性を示した。しかし、24 および 48 時間経過後では、リン酸ジエステルの骨格と均一な 2'-MOE を持つオリゴマー化合物がこの実験中では最も強い活性を示し、ホスホロチオエートの骨格を有し、均一な 2'-F および均一な 2'-MOE を持つオリゴマー化合物がそれに次いで強かった。

10

#### 【0274】

これらの結果は、均一に修飾された化合物が *miR-21* の活性を効果的に抑制することを示している。従って、一実施形態では均一に修飾されたオリゴマー化合物がマイクロRNA s を標的とする。さらなる実施形態では、マイクロRNA の活性を阻害する方法は、マイクロRNA s を標的とするオリゴマー化合物と細胞との接触を含む。

#### 【実施例2】

#### 【0275】

##### キメラのオリゴマー化合物

キメラのオリゴマー化合物とは、化学的に修飾された領域を 2 若しくはそれ以上含むオリゴマー化合物である。キメラのオリゴマー化合物の一つの例は「ギャップマー」である。ギャップマーでは、オリゴマー化合物は中央領域と、その両側に隣接する二つの「ウィング」と名付けられた領域を含むモチーフを有する。一態様では、中央領域のヌクレオチドは一種類の糖修飾を含み、一方でウィング領域のヌクレオチドは違う種類の糖修飾を含む。通常、2つのウィング領域の塩基数は同じであるが、しかし、ギャップマーについては、その条件は必ずしも必須ではない。

20

#### 【0276】

一つの例としては、キメラのオリゴマー化合物として適切なモチーフは以下のようである。

#### 【0277】

$T_1 - (Nu_1)_{n_1} - (Nu_2)_{n_2} - (Nu_3)_{n_3} - (Nu_4)_{n_4} - (Nu_5)_{n_5} - T_2$  , ここで  $T_1$  は H ,  $T_2$  は H、 $Nu_1$  は 2'-MOE、 $Nu_2$  は 2'-F、 $Nu_5$  は 2'-MOE、 $n_1$  は 2、 $n_2$  は 19、 $n_3$  は 0、 $n_4$  は 0、そして  $n_5$  は 2 である。オリゴマー化合物 ISIS 393206 は、配列 ID 番号：19 にこのモチーフを適用したものである。換言すると、ISIS 393206 は、2'-MOE で修飾されたヌクレオチドをそれぞれ二つ有する外部領域と、それらに両側から挟まれて 19 個の 2'-F で修飾されたヌクレオチドを含む内部領域を有する (2'-MOE / 2'-F / 2'-MOE)。miR-122 を標的とするキメラのオリゴマー化合物が miR-122 の活性をインビボで阻害する能力を検定した。この例では、miR-122 を標的とするオリゴマー化合物が説明されている。しかし、本発明のオリゴマー化合物における修飾は、miR-122 を調節するそれらのオリゴマー化合物に限定されるものではない。

30

40

#### 【0278】

##### 一定量の投与による実験

C57BL/6 の雄マウスを民間業者から入手した。マウスは以下の治療群に分類された：ISIS 327895 で処理；ISIS 393206 で処理；および生理食塩水で処理されたもの、である。それぞれのオリゴマー化合物は、5'-ACAAACACCATTTGTCACACTCCA-3' (配列 ID 番号：19) という塩基配列を有する。ISIS 327895 は、均一な 2'-MOE 糖修飾、およびヌクレオチド間に均一にホスホロチオエート結合を含む。生理食塩水で処理されたマウスがコントロールとされた。25 mg/kg の用量のオリゴマー化合物を週二回、三週間にわたってマウスへ腹腔内投与した。処理の終了段階において、マウスは健康で正常な様子であり、血漿中の AST

50

およびALT量も正常の範囲内であった。

#### 【0279】

miR-122の標的であるALDOA mRNAの肝組織中の量をTaqmanリアルタイムPCRで測定し、生理食塩水处理した動物でのALDOA mRNAの量と比較した。その結果、ISIS 327985およびISIS 393206による処理では、ALDOAの量はそれぞれ約4倍および7倍の上昇が見られた。従って、キメラのオリゴマー化合物は、均一な2'-MOE修飾を持つオリゴマー化合物と比較して、より強力なanti-miR活性を示すことがここに明らかとなった。2'-Fを含むオリゴマー化合物による処理では脾臓の重量増加が見られたが、これは免疫賦活作用を示唆している。均一な2'-MOEを持つオリゴマー化合物および2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物は同等の融解温度を有することから、これら2つのオリゴマー化合物はALDOA mRNA量の同程度の増加をもたらすことが期待されていた。従って、内部領域に19個の2'-Fで修飾されたヌクレオチドを有し、外部領域に2'-MOEで修飾されたヌクレオチドを二つ持つオリゴマー化合物が、2'-MOEで均一に修飾されたオリゴマー化合物と比較して、著しく強いanti-miR活性を示したことは予想外であった。

10

#### 【0280】

血漿中の総コレステロール量もまた、当該技術分野において既知である方法（例えば、Olympus AU400e automated clinical chemistry analyzer, ニューヨーク州Melville）を用いて測定された。ISIS 327985およびISIS 393206で処理したマウスでは、生理食塩水处理した動物と比較して、総コレステロール量の減少が見られた。

20

#### 【0281】

##### 作用発現の解析

均一に修飾された、またはキメラのオリゴマー化合物による処理後のmiR-122阻害活性の作用発現を比較するために、ISIS 327895およびISIS 393206を25mg/kgの用量で週二回、五週間までマウスへ投与した。そして、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, および10回目の投与のそれぞれ24時間後に、各治療グループから4匹ずつのマウスを検体とした。それぞれの時点でALDOA mRNA量および血漿中コレステロールを測定したところ、2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物が、より強いanti-miR-122活性、すなわちALDOA mRNA量の上昇および血漿中コレステロール量の減少をもたらすことが示唆された。さらに、2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物の方が、均一な2'-MOEオリゴマー化合物と比較して、より早い段階でALDOAの上昇および血漿中コレステロール量の減少が確認された。従って、2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物は、均一な2'-MOEオリゴマー化合物と比較して、より強い効果およびより早い作用発現を示すことが明らかとなった。

30

#### 【0282】

##### 用量反応試験

anti-miRNAオリゴマー化合物の用量依存性を評価するために、均一な2'-MOEおよび2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物を、6.25, 12.5, 25、または50mg/kgの用量で週二回、三週間までマウスへ投与した。2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物を6.25, 12.5, 25、および50mg/kgの用量で投与した結果、生理食塩水を投与した動物での測定値と比較してALDOA mRNAはそれぞれ約4, 5, 4.25、および5倍増加した。均一な2'-MOEオリゴマー化合物の同量を投与した結果、生理食塩水を投与した動物での測定値と比較してALDOA mRNAはそれぞれ約0.25, 1.5, 2および3倍増加した。血漿中コレステロール量もまた同様に、用量依存的に減少した。すなわち、2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物を6.25, 12.5, 25、および50mg/kgの用量で投与すると、生理食塩水を投与した動物での測定値と比較して血漿中コ

40

50

レステロール量はそれぞれ約40%、45%、45%、および48%減少した。2'-MOEオリゴマー化合物では、低いほうから三番目の用量までは血漿中コレステロール量を約5%減少させる結果となり、最高の用量では血漿中コレステロール量を少なくとも40%減少させた。従って、2'-MOE/2'-F/2'-MOEオリゴマー化合物は2'-MOEオリゴマー化合物と比較して、著しく優れた効果および効能を示すことが明らかとなった。

#### 【0283】

ここに提供されたキメラのオリゴマー化合物は、より強いanti-miRNA活性を示した。従って、ここに提供されるのはマイクロRNA活性を阻害する方法であり、その方法はここに記すように、改善されたanti-miRNA活性を有するオリゴマー化合物の動物への投与を含むものである。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物はキメラのオリゴマー化合物であり、それは内部領域に2'-F修飾ヌクレオチドを含み、そして外部領域に安定度を増加させる修飾を含む。一実施形態では、オリゴマー化合物はその内部領域に種類の2'-修飾ヌクレオチドを含み、そして外部領域にはそれぞれ二種類目の2'-修飾ヌクレオチドを含む。さらなる実施形態では、ギャップ領域に2'-フルオロ修飾を含み、そしてウィング領域には2'-メトキシエチル修飾を含む。一実施形態では、オリゴマー化合物はISIS 393206である。

#### 【実施例3】

#### 【0284】

強い活性を有するオリゴマー化合物

マイクロRNAsを標的とし、位置ごとに修飾されたモチーフを有するオリゴマー化合物が、インビボでマイクロRNA活性を阻害する能力を検定した。

#### 【0285】

10から12箇所の2'-F糖修飾および内部領域に付加的な修飾を含むオリゴマー化合物が検定された。付加的な修飾には、2'-OMe、2'-MOE、または4'-CH<sub>2</sub>-O-2'の形に架橋する糖修飾が含まれる。オリゴマー化合物は配列ID番号: 19の配列を含む。ISIS 396608は、5'-MMLFFLFFLFFLFFLFFLFFLMM-3'の形で位置ごとに修飾されたモチーフを有し、ここでMは2'-MOEを、Lは4'-CH<sub>2</sub>-O-2'という架橋を有する二環式の核酸を意味する。ISIS 397303は、5'-MMFMFMFMFMFMFMFMFMFMFM-3'の形で位置ごとに修飾されたモチーフを有し、ここでMは2'-MOEを、Fは2'-Fを意味する。ISIS 397404は5'-MMFOFOFOFOFOFOFOFOFOFOFMM-3'の形で位置ごとに修飾されたモチーフを有し、ここでMは2'-MOEを、Fは2'-Fを、そしてOは2'-OMeを意味する。

#### 【0286】

オリゴマー化合物は25mg/kgの用量で、週二回、三週間マウスへ投与された。そして肝臓でのALDOA mRNA量を測定した。2'-Fを持つ内部領域へ導入した2'-MOEまたは2'-OMeを有するオリゴマー化合物では、生理食塩水処理した動物と比較してALDOA mRNAが2~2.5倍に上昇した。4'-CH<sub>2</sub>-O-2'の形に架橋する糖修飾を導入すると、生理食塩水処理した動物のALDOA mRNA量の約3.5倍に増加し、そしてコレステロールも約40%減少させる結果となった。2'-MOE/2'-F/2'-MOEでは、ALDOA mRNA量が最も大きく上昇し、そして血漿中総コレステロールの減少(約60%)も最も優れており、また、脾臓の重量も最も大きな値となる結果をもたらした。

#### 【実施例4】

#### 【0287】

強い活性および改善された治療指数を有するオリゴマー化合物

マイクロRNAを標的とするオリゴマー化合物への2'-MOE/2'-F/2'-MOEモチーフの組み込みが、インビボでの高い効果および効能をもたらしたことから、このモチーフは様々な用途の中でも治療用途のためにanti-miRオリゴマー化合物へ組

10

20

30

40

50

み込むことが望ましい。このモチーフの治療指数をさらに改善するために、キメラのモチーフの中央領域へ、2'-F以外の2'-修飾を有するように、位置ごとに修飾されたオリゴマー化合物を設計した。後述するように検定を行ったオリゴマー化合物の集合の一部を表Aに示した。付加的に検定された化合物はISIS 400129であり、これは以下のようにヌクレオシド間のホスホロチオエート結合によって結合された修飾ヌクレオシドを有するものである：以下のように配置されたものである：二つの2'-MOE、三つの2'-F、一つの2'-MOE、五つの2'-F、一つの2'-MOE、五つの2'-F、一つの2'-MOE、三つの2'-F、二つの2'-MOEである。

【0288】

【表6】

表A

ISIS No	配列 ID 番号	n1	n2	n3	n4	n5	Nu <sub>1</sub>	Nu <sub>3</sub>	Nu <sub>5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
393206	19	2	19	0	0	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400124	19	2	2	3	14	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400125	19	2	5	3	11	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400126	19	2	8	3	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400127	19	2	11	3	5	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400128	19	2	14	3	2	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H
400130	19	2	10	1	8	2	2'-MOE	2'-MOE	2'-MOE	H	H

【0289】

#### 一定量の投与による実験

内部領域に少なくとも16箇所の2'-F修飾ヌクレオチドを有する、位置ごとに修飾されたオリゴマー化合物を用いて、インビボでの実験を行った。オリゴマー化合物は配列ID番号：19の配列を含む。検定されたオリゴマー化合物は、ISIS 393206, ISIS 400124, 400125, 400126, 400127, 400128, 400129, および400130を含む。オリゴマー化合物を、25mg/kgの用量で週2回、3週間に渡ってマウスに腹腔内投与した。ISIS 393206も同様に投与した。オリゴマー化合物で処理したマウスの肝臓でのALDOA mRNA量を定量的PCRで測定し、生理食塩水で処理したマウスの肝臓での測定値と比較した。ISIS 393206では、ALDOA mRNAが約4倍に上昇し、コレステロールは約50%減少した。ISIS 400124, 400125, 400126, 400127, 400128, 400129, および400130オリゴマー化合物のそれぞれによる処理では、生理食塩水処理したマウスの肝臓での測定値の少なくとも2倍以上にALDOA mRNAが上昇する結果となった。血漿中総コレステロールの減少は20%から40%の間であった。特に、ISIS 400124, 400126, および400127は、ISIS 393206と同等の効率でALDOA mRNA量を上昇させることができ、生理食塩水処理した場合の肝臓ALDOA量と比較して約4倍となった。さらには、ISIS 393206処理では脾臓重量の増加が見られたのに対して、これらのオリゴマー化合物では脾臓重量の著しい増加は見られなかった。ISIS 400125, 400129, および400128では、ALDOA mRNA量がそれぞれ約3倍、2.5倍、および2倍へ上昇し、脾臓重量の増加はなかった。一方、オリゴマー化合物の内部領域に2'-Fを含むISIS 400130では、ALDOA mRNA量が約3倍に増加したものの、ISIS 393206処理したマウスで見られたのと同程度の脾臓重量の増加ももたらさず結果となった。

【0290】

#### 一回の投与による実験

miR-122を標的とするオリゴマー化合物を一回だけ投与した場合の効果を評価するための実験を行った。オリゴマー化合物は以下のモチーフを含む：均一に修飾した2'



- MOE ; 2' - MOE / 2' - F / 2' - MOE ; および内部領域に少なくとも16箇所の2' - Fを有する位置ごとに修飾されたもの、である。マウス ( B a l b / c 雌、治療グループにつき  $n = 4$  ) の腹腔内へ、11, 33、または100 mg / kgの用量を一回だけ投与し、4日後に検体とした。共にmiR - 122のアンチセンスによる阻害によって上昇することが知られているALDOA mRNA量およびGYS1 mRNA量を肝臓で測定し、生理食塩水処理したマウスの肝臓中でのそれぞれのmRNA量と比較した。表Bはこの実験のデータを要約したものである；ここでALDOAおよびGYS1 mRNA量は、生理食塩水処理のコントロールに対するパーセンテージで示した；CHOLはコレステロールの基準値（実験開始時の値）に対するパーセンテージである；SDは標準偏差である。

10

【0291】

【表7】

表B

	ALDOA		GYS1		CHOL	
	% 生理 食塩水	SD	% 生理 食塩水	SD	% ベース ライン	SD
393206-11 mg/kg	178	25	141	12	71	8
393206-33 mg/kg	212	73	163	21	87	12
393206-100 mg/kg	445	116	259	60	58	6
400124-11 mg/kg	151	51	129	16	90	11
400124-33 mg/kg	279	121	193	84	70	10
400124-100 mg/kg	242	94	180	45	89	8
400125-11 mg/kg	104	13	97	7	107	6
400125-33 mg/kg	242	86	144	23	86	4
400125-100 mg/kg	447	21	237	4	73	6
400126-11 mg/kg	166	7	108	4	84	3
400126-33 mg/kg	274	27	152	16	72	5
400126-100 mg/kg	454	5	270	8	66	5
400127-11 mg/kg	400	43	224	15	69	6
400127-33 mg/kg	419	112	232	42	78	7
327895-11 mg/kg	107	2	126	8	100	3
327895-33 mg/kg	104	11	137	7	96	2
327895-100 mg/kg	169	28	147	17	80	6

20

30

【0292】

ここに記したとおり、均一な2' - MOE化合物は最高の用量ではALDOA mRNA量を増加（約2倍）させ、検定された各用量でGYS1 mRNAを増加（約1.5から2倍）させた。ISIS 393206, 400125, および400126の100 mg / kg用量では、ALDOA mRNA量を約4倍増加させた。特に、ISIS 400127では、11および33 mg / kg（100 mg / kgは技術的問題から検定されなかった）の両方でALDOA mRNAを約4倍に増加させ、これは他の化合物では最高の用量で見られた増加量と同等なものとなった。ISIS 400125および400126はALDOA mRNAをかなり増加させる結果をもたらした。ISIS 400124もまたALDOA量を増加させた。

40

【0293】

一定量の投与による実験で見られたのと同様に、キメラのオリゴマー化合物の内部領域に、2' - F以外の2' - 修飾を導入すると、脾臓重量の増加が起こらないことから分かる

50

ように、免疫賦活作用に関して改善が見られた。

【 0 2 9 4 】

これらのデータは、本発明のオリゴマー化合物が強い活性と改善された治療指数を示すことを立証している。このように、マイクロRNA sを標的とするオリゴマー化合物は、効果および効能を含めて治療用途に適した特性を有するものである。

【配列表】

0005213723000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 エサウ、クリスティン

アメリカ合衆国、9 2 0 3 7 カリフォルニア州、ラ ホヤ、8 7 2 6 ビラ ラ ホヤ ドライブ ナンバー 7 9

(72)発明者 スウェイジ、エリック、イー .

アメリカ合衆国、9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールス バッド、7 7 8 9 パレンケ ストリート

(72)発明者 バット、バークリシェン

アメリカ合衆国、9 2 0 0 9 カリフォルニア州、カールスバッド、9 1 1 ローズマリー アベニュー

(72)発明者 キンバーガー、ガース、エー .

アメリカ合衆国、9 2 1 3 0 カリフォルニア州、サン ディエゴ、3 5 8 5 カミニート エル リンコン ナンバー 2 0 3

審査官 吉住 和之

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 3 9 0 1 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 9 3 9 7 ( W O , A 1 )

Nature , 2 0 0 5 年 , Vol.438, No.7068, p.685-689

Nucleic Acids Research , 2 0 0 5 年 , Vol.33, No.4 , p.1290-1297

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C A / R E G I S T R Y ( S T N )