

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-538355

(P2008-538355A)

(43) 公表日 平成20年10月23日(2008.10.23)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 31/7088 (2006.01)</b>	A 61 K 31/7088	4 B 02 4
<b>A61K 48/00 (2006.01)</b>	A 61 K 48/00	4 C 08 4
<b>A61P 3/04 (2006.01)</b>	A 61 P 3/04	4 C 08 6
<b>A61P 3/10 (2006.01)</b>	A 61 P 3/10	
<b>A61P 5/48 (2006.01)</b>	A 61 P 5/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-505659 (P2008-505659)	(71) 出願人	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9200 8, カールズバッド, ラザフォード・ロー ド 1896
(86) (22) 出願日	平成18年4月10日 (2006.4.10)	(74) 代理人	100078282
(85) 翻訳文提出日	平成19年11月30日 (2007.11.30)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/013536	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(87) 国際公開番号	W02006/110775	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開日	平成18年10月19日 (2006.10.19)		
(31) 優先権主張番号	60/669,530		
(32) 優先日	平成17年4月8日 (2005.4.8)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アセチル-C o Aカルボキシラーゼに関する組成物およびそれらの用途

## (57) 【要約】

ここでは、細胞、組織または動物において、ACC1、ACC2または両方の発現を調整する化合物、組成物および方法を開示する。また、疾患および障害の治療のための医薬の調製における、開示された化合物および組成物の使用を提供する。本発明は、特定の表現型終点を達成するために、ACC1またはACC2をコードする核酸分子に標識され、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方の発現を調整する化合物、特にアンチセンス化合物を使用する方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

動物における状態の重篤度を改善または軽減する方法であって、前記状態がACC1およびACC2の発現を減少させることによって処置可能であり、前記動物を、ACC1およびACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記状態が、肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択される、請求項1記載の方法。

10

**【請求項 3】**

前記ACC1およびACC2の発現の減少が、すい臓でもCNSでも生じない、請求項1記載の方法。

**【請求項 4】**

前記ACC1およびACC2の発現の減少によって、過食もインシュリン分泌の抑制も生じない、請求項1記載の方法。

**【請求項 5】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される修飾を含む、請求項1または2記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、デオキシヌクレオチドを含む第一領域と、2'-O-(2-メトキシエチル)オリゴヌクレオチドを含む第二および第三領域とを含む、請求項1または2記載の方法。

**【請求項 7】**

動物における血中グルコース、血漿トリグリセリド、血漿コレステロールまたは肝臓トリグリセリド濃度を低下させる方法であって、ACC1およびACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 8】**

動物におけるインシュリン感応性を改善する方法であって、ACC1およびACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

30

**【請求項 9】**

動物における過脂肪蓄積を減少させる方法であって、ACC1およびACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 10】**

ACC1およびACC2の発現がCNSでもすい臓でも減少されない、請求項7~9のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 11】**

動物における状態の重篤度を改善または軽減する方法であって、前記状態がACC1およびACC2の発現を減少させることによって処置可能であり、前記動物を、ACC1の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、方法。

40

**【請求項 12】**

前記状態が、肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択される、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

前記ACC1の発現の減少が、すい臓でもCNSでも生じない、請求項11記載の方法。

**【請求項 14】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される修飾を含む、請求項11記載の方法。

50

**【請求項 15】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、デオキシヌクレオチドを含む第一領域と、2'-O-(2-メトキシエチル)オリゴヌクレオチドを含む第二および第三領域とを含む、請求項11記載の方法。

**【請求項 16】**

動物において、血中グルコース、血漿トリグリセリド、血漿コレステロールまたは肝臓トリグリセリド濃度を低下させる方法であって、ACC1の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 17】**

動物におけるインシュリン感応性を改善する方法であって、ACC1の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。 10

**【請求項 18】**

動物における過脂肪蓄積を減少させる方法であって、ACC1の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 19】**

前記ACC1の発現の減少が、CNSでもすい臓でも生じない、請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 20】**

動物における状態の重篤度を改善または軽減する方法であって、前記状態がACC2の発現を減少させることによって処置可能であり、前記動物を、ACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることを含む、方法。 20

**【請求項 21】**

前記状態が、肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択される、請求項20記載の方法。

**【請求項 22】**

前記ACC2の発現の減少が、CNSでもすい臓でも生じない、請求項20記載の方法。 。

**【請求項 23】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される修飾を含む、請求項20記載の方法。 30

**【請求項 24】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、デオキシヌクレオチドを含む第一領域と、2'-O-(2-メトキシエチル)オリゴヌクレオチドを含む第二および第三領域とを含む、請求項20記載の方法。

**【請求項 25】**

動物において、血中グルコース、血漿トリグリセリド、血漿コレステロールまたは肝臓トリグリセリド濃度を低下させる方法であって、ACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 26】**

動物におけるインシュリン感応性を改善する方法であって、ACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。 40

**【請求項 27】**

動物における過脂肪蓄積を減少させる方法であって、ACC2の発現を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与するステップを含む、方法。

**【請求項 28】**

前記ACC2の発現の減少が、CNSでもすい臓でも生じない、請求項25～27のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 29】**

ACC1をコードする核酸分子に標的された、長さ12～30核酸塩基のアンチセンス 50

オリゴヌクレオチド。

【請求項 3 0】

修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 2 9 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 1】

前記オリゴヌクレオチドが、デオキシヌクレオチドを含む第一領域と、2' - O - ( 2 - メトキシエチル ) ヌクレオチドを含む第二および第三領域とを有するキメラオリゴヌクレオチドである、請求項 2 9 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 2】

少なくとも 1 個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 2 9 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 10

【請求項 3 3】

少なくとも 1 個の 5 - メチルシトシンを含む、請求項 2 9 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 4】

A C C 2 をコードする核酸分子に標的された、長さ 1 2 ~ 3 0 核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 5】

修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される少なくとも 1 つの化学修飾を含む、請求項 3 4 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 20

【請求項 3 6】

前記オリゴヌクレオチドが、デオキシヌクレオチドを含む第一領域と、2' - O - ( 2 - メトキシエチル ) ヌクレオチドを含む第二および第三領域とを有するキメラオリゴヌクレオチドである、請求項 3 4 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 7】

少なくとも 1 個の修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項 3 4 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 個の 5 - メチルシトシンを含む、請求項 3 4 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 30

【請求項 3 9】

A C C 1 または A C C 2 の発現に関連する状態の改善または処置のための医薬の調製における、請求項 2 9 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 4 0】

肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択される状態の改善または処置のための医薬の調製における、請求項 2 9 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 4 1】

A C C 1 および A C C 2 の両方の発現が減少される、請求項 3 9 記載の使用。 40

【請求項 4 2】

A C C 1 および A C C 2 の発現の減少が C N S でもすい臓でも生じない、請求項 3 9 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮特許出願番号 6 0 / 6 6 9 , 5 3 0 ( 2 0 0 5 年 4 月 8 日出願 ) に対する優先権を主張する。この仮特許出願の全体は、参考として本明細書に援用される。 50

**【0002】****配列表**

参考のために、配列表のコピーおよび2006年4月10日に作成されたB I O L O O 5 8 W O S E Qと命名されるファイルを含む、フロッピー（登録商標）ディスクの該配列表のコンピュータ読み出し可能な形態を本明細書に組み込む。

**【0003】****発明の分野**

本明細書は、細胞、組織または動物において、ACC1またはACC2の発現を調整するのに有用な化合物、組成物および方法を開示する。

**【背景技術】**

10

**【0004】****発明の背景**

アセチルC o Aカルボキシラーゼ(ACC)活性は、脂肪酸合成における律速段階であるアセチルC o AからマロニルC o AへのATP依存性カルボキシル化に関与する。この反応は、2つの半反応、すなわち、ビオチンカルボキシラーゼ反応およびカルボキシルトランスフェラーゼ反応で進んでいく。マロニルC o Aは、長鎖脂肪酸の合成および非常に長い鎖を持つ脂肪酸への伸長反応における炭素ドナーであり、また、長鎖脂肪酸のミトコンドリア酸化作用に関与するパルミトイールC o Aカルニチンシャトルシステムの調整剤でもある（非特許文献1；非特許文献2）。

**【0005】**

20

ACC活性の生成物であるマロニルC o Aは、食事変化に応答する脂肪酸の酸化および合成コントロールの最も重要な代謝信号である。カルボキシラーゼは、食事制限、ホルモン類および他の生理的要因によって、大きく規制される。食物摂取は、ACCの合成を誘発し、ACC活性を増加する。絶食または真性糖尿病は、遺伝子の発現を抑制し、酵素の活性を低下させる。インシュリンで治療されている糖尿病動物は、酵素の活性が増し、長期のインシュリン治療は、ACCタンパク質の合成を刺激する。

**【0006】**

30

ACCは、2つの組織特異的同位酵素、すなわち、肝臓および脂肪のような脂肪生成組織中に存在するACC1（アセチルC o Aカルボキシラーゼ、ACAC、ACACAおよびt g fとしても知られる）および肝臓、心臓、骨格筋のような酸化組織中に存在するACC2（アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ、ACACB、ACC B、H ACC 2 7 5およびアセチルC o Aカルボキシラーゼ2としても知られる）として存在する。ACC1およびACC2は異なる遺伝子によってコードされる（非特許文献1）。

**【0007】**

治療のためにACC1およびACC2を減らすアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、中枢神経系およびすい臓におけるACC濃度を減らさず、したがって、ACC1およびACC2の小分子抑制で観察される副作用を阻止する点から、小分子に関して有益である。

**【非特許文献1】Harwood, Curr. Opin. Investig. Drugs**

40

, 2004, 5, 283-289

**【非特許文献2】McGarryら, J. Biol. Chem., 1978, 253, 8294-8300****【発明の開示】****【課題を解決するための手段】****【0008】****発明の要旨**

本発明は、特定の表現型終点を達成するために、ACC1またはACC2をコードする核酸分子に標識され、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方の発現を調整する化合物、特にアンチセンス化合物を使用する方法に関する。さらに、細胞、組織または動物中のACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方を同時に減少さ

50

せる方法であって、前記細胞、組織または動物を本発明の化合物または組成物の1個以上と接触させることを含む方法を提供する。

#### 【0009】

本発明は、そのような治療を必要とする対象において、前記対象に、ACC1またはACC2を減少させるアンチセンス化合物を投与することにより、血中グルコース、トリグリセリドまたはコレステロールを低下させる方法を提供する。好ましい実施形態では、アンチセンス化合物は、ACC1およびACC2の両方を減少させる。他の実施形態では、本発明は、過脂肪蓄積を低下させる方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、肝臓トリグリセリド濃度を低下させる方法を提供する。他の本発明の実施形態は、脂肪酸合成を抑制する方法である。別の実施形態として、そのような治療を必要とする対象において、前記対象に、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方を減少させるアンチセンス化合物を投与することによって、脂肪酸酸化を刺激し、インシュリン感応性を改善し、肝グルコース産生を抑制する方法が挙げられる。

10

#### 【0010】

別の実施形態では、本発明は、動物における状態の重篤度を改善させるまたは軽減する方法であって、前記状態の1以上の身体的指標の測定値が前記状態の重篤度の軽減を示すように、前記動物を、有効量のACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方を減少させるアンチセンス化合物に接触させることを提供する。1実施形態では、状態は肥満である。他の実施形態では、肥満は食事誘発性である。別の実施形態では、状態として、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、代謝症候群および心血管疾患が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、状態は肝臓脂肪症である。他の実施形態では、肝臓脂肪症は脂肪性肝炎、非アルコール性肝臓脂肪症疾患(NALD)または非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)である。また、ACC1、ACC2または両方と関連する状態の改善または治療のための医薬の調製における本発明の化合物の使用も意図する。

20

#### 【0011】

いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物はACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方を調整する。ここで意図され提供されるのは、長さ13~30ヌクレオチドの配列を含むアンチセンス化合物である。また、本明細書では、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される少なくとも2個の修飾を持つアンチセンス化合物も提供する。本明細書では、少なくとも1個の2'-O-メトキシリルエチルヌクレオチドを、5'および3'末端側のそれぞれに持つデオキシヌクレオチド領域を含むキメラオリゴヌクレオチドが提供される。さらに、10個のデオキシヌクレオチドを含み、5個の2'-O-メトキシリルエチルヌクレオチドを5'および3'両末端側に持つ、各ヌクレオシド間結合がチオリン酸エステルであるキメラオリゴヌクレオチドが提供される。さらなる実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、少なくとも1個の5'-メチルシトシンを有してもよい。

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0012】

##### 発明の詳細な説明

40

##### 概説

本明細書では、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方を減少させる、アンチセンス化合物、ならびに前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むアンチセンス化合物を使用する方法を開示する。そのような方法は、ACC1またはACC2をコードする標的核酸分子の1種以上と相補的である、アンチセンス化合物を提供することによって行う。

#### 【0013】

本発明によれば、ACC1(アセチルC<sub>0</sub>Aカルボキシラーゼ、ACAC、ACAC<sub>A</sub>およびtgc<sub>f</sub>としても知られる)またはACC2(アセチル-補酵素Aカルボキシラーゼ、ACACB、ACC<sub>B</sub>、HACC<sub>275</sub>およびアセチルC<sub>0</sub>Aカルボキシラーゼ2

50

としても知られる)の発現を調整するための組成物および方法が提供される。表1に、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2に標的されるアンチセンス化合物の設計のために有用な配列のジェンバンク(登録商標)受託番号を挙げる。各ジェンバンク(登録商標)配列は参考によって本明細書に組み込まれる。もし指定されていれば、そのような配列の配列番号が表1に示されている。本発明のアンチセンス化合物として、表1に示される1以上の標的核酸分子を減少させる化合物、およびACC1またはACC2をコードする別の核酸分子を減少させるアンチセンス化合物が挙げられる。前記アンチセンス化合物は、ACC1またはACC2をコードする核酸分子の任意の領域、セグメントまたは部位を標的としてもよい。適切な標的領域を本明細書に記載する。

【0014】

10

表1

遺伝子標的の名前および配列

【0015】

20

【表1】

30

標的	種	GENBANK®#	GENBANK®に寄託した日付	配列番号
ACC1	ヒト	NM_000664.3		1
ACC1	ヒト	NM_198834.1		2
ACC1	ヒト	NM_198835.1	12-04-03	n/a
ACC1	ヒト	NM_198836.1		4
ACC1	ヒト	NM_198837.1		5
ACC1	ヒト	NM_198838.1		6
ACC1	ヒト	NT_078100.1のヌクレオチド715679～1041454の相補体		7
ACC1	マウス	XM_109883.5		8
ACC2	ヒト	AJ575592.3		9
ACC2	ヒト	BC028417.1		10
ACC2	ヒト	N88277.1	04-02-96	n/a
ACC2	ヒト	NM_001093.1		12
ACC2	ヒト	NT_009775.14のヌクレオチド146320～274076		13
ACC2	ヒト	R99037.1	09-15-05	n/a
ACC2	ヒト	T27637.1の相補体	01-04-95	n/a
ACC2	マウス	BC022940.1	02-07-02	n/a
ACC2	マウス	NM_133904.1		17
ACC2	マウス	NT_078458.2のヌクレオチド628385～716000		18
ACC2	マウス	BF783883から構築	01-05-01	n/a
ACC2	マウス	AF290179	12-11-01	n/a
ACC2	ラット	AB004329.1	04-24-98	n/a
ACC2	ラット	CB699897.1	04-10-03	n/a
ACC2	ラット	NW_047377.1のヌクレオチド22000～127000の相補体	09-22-03	n/a
ACC2	ラット	XM_346441.1	09-22-03	n/a

本発明の実施形態には、長さ12～50ヌクレオチドの配列を含むアンチセンス化合物が含まれる。長さ12～50ヌクレオチの配列には、長さ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および50ヌクレオチドの配列を包含すると理解される。長さ13～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましい。また、長さ12～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドも好ましい。当業者であれば、ヌクレオチド長さの範囲12～50は、その範囲内および12～50ヌクレオチドの境界内に入る任意の範囲のヌクレオチド長さの全てを含むことを容易に理解するであろう。

【0016】

50

活性を失うことなく、アンチセンス化合物の長さを延ばすあるいは縮めることができ、および／またはミスマッチ塩基を導入することができることは、当業者によく知られている。たとえば、Woolfら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7305 - 7309, 1992, 参照によって本明細書に組み込まれる)では、長さ13～25核酸塩基の一連のASOが、卵母細胞注射モデルにおいて、標的RNAの開裂を誘発するそれらの能力に関し試験された。長さ25核酸塩基の、末端近傍に8個または11個のミスマッチ塩基を持つASOは、ミスマッチを含まないASOより少量であったにもかかわらず、標的mRNAの特異的開裂を行うことができた。同様に、標的特異的開裂は、1個または3個のミスマッチを有するものを含む、13核酸塩基ASOを使用することで達成された。MaherおよびDolnick(Nuc. Acid. Res. 16: 3341 - 3358, 1988, 参照により本明細書に組み込まれる)は、一連の縦列型14核酸塩基ASO、およびそれぞれ2または3個の縦列型ASOの配列で構成される28および42核酸塩基ASOを、ウサギ網状赤血球アッセイにおけるヒトDHF-Rの翻訳を停止する能力に関して試験した。14核酸塩基ASOのみの3個はそれぞれ、28または42核酸塩基ASOより中程度のレベルではあるが、翻訳を抑制することができた。

10

## 【0017】

## 治療法

本発明の化合物は、ヒトのような動物において、ACC1またはACC2を調整するために使用することができる。限定ではない1実施形態において、前記方法は、前記動物に、有効量のACC1またはACC2、あるいは好ましくは両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与するステップを含む。1実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、ACC1またはACC2RNAの濃度または機能を効果的に減らす。ACC1またはACC2 mRNAの濃度減少は、同時に、発現のACC1またはACC2タンパク質産物の減少を導くので、そのような結果として得られた変化も測定することができる。発現ACC1またはACC2RNA、あるいはタンパク質生成物の濃度または機能を効果的に減らす本発明のアンチセンス化合物は、活性アンチセンス化合物と認められる。1実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、標的RNAの減少を、少なくとも10%まで、少なくとも20%まで、少なくとも25%まで、少なくとも30%まで、少なくとも40%まで、少なくとも50%まで、少なくとも60%まで、少なくとも70%まで、少なくとも75%まで、少なくとも80%まで、少なくとも85%まで、少なくとも90%まで、少なくとも95%まで、少なくとも98%まで、少なくとも99%まで、あるいは100%までもたらすACC1および／またはACC2を標的する。本発明の化合物は、ACC1RNA、ACC2RNAまたは両方の発現レベルをその程度まで減少させうると考えられる。

20

## 【0018】

たとえば、ACC1またはACC2発現の減少は、動物の組織または器官で測定することができる。前記組織または器官として、骨格筋、肝臓、腎臓および脂肪(白色および褐色)が挙げられるが、これらに限定されない。組織または器官のサンプルは、生体組織検査によって、常法的に得ることができる。

30

## 【0019】

前記分析される流体、組織または器官内に含まれる細胞は、ACC1またはACC2タンパク質をコードする核酸分子および／またはACC1またはACC2にコードされたタンパク質それ自身を含みうる。たとえば、動物から得た組織または器官は、標的mRNAまたはタンパク質の濃度として評価することができる。mRNA濃度は、リアルタイムPCR、ノーザンプロット法、原位置ハイブリッド形成またはDNAアレイ解析によって測定または評価することができる。タンパク質濃度は、ELISA、免疫プロット法、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ(たとえば、カスパーゼ活性アッセイ)、免疫組織化学または免疫細胞学によって測定または評価することができる。さらに、治療の効果は、当分野で公知の常法的な臨床方法により、1種以上の本発明の化合物と接触させた動物から集めた、前記組織、器官または血液のような体液中で、標的遺伝子発現に

40

50

伴うバイオマーカーを測定することによって評価することができる。これらのバイオマーカーとして、グルコース、コレステロール、リポタンパク質、トリグリセリド、遊離脂肪酸およびグルコースおよび脂質の代謝の別のマーカー；肝臓トランスアミナーゼ、ビリルビン、アルブミン、血中尿素窒素、クレアチニン、および腎臓および肝臓機能の別のマーカーが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0020】

本発明の化合物は、有効量の化合物を、適切な医薬的に許容しうる希釈剤または担体に加えることによって、医薬組成物で利用することができる。1態様では、本発明の化合物は、ACC1またはACC2の発現を減らす。好ましい態様では、本発明の化合物は、ACC1およびACC2の両方の発現を減らす。また、本発明の化合物は、ACC1またはACC2の発現を減少させることによって治療しうる疾患および障害の治療のための医薬の調製において使用することもできる。10

#### 【0021】

本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすが、ACC1およびACC2の発現は、中枢神経系では減らされない方法である。本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすが、ACC1およびACC2の発現は、すい臓では減らされない方法である。本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすが、ACC1およびACC2の発現は、すい臓の島細胞では減らされない方法である。本発明の別の実施形態は、食物摂取量を増やすことなく、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによって、動物における状態の重篤度を改善するまたは軽減することを含む。本発明の別の実施形態は、食欲を増やすことなく、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによって、動物における状態の重篤度を改善するまたは軽減することを含む。好ましい実施形態では、ACC1およびACC2の両方の発現を減らす。ここでは、動物における状態の重篤度を改善するまたは軽減する医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図され、前記状態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減少させることによって治療可能であるものを言う。20

#### 【0022】

本発明の別の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによって、動物における血漿脂質濃度を低下させる方法である。血漿脂質として、脂肪酸、トリグリセリド、コレステロール、LDLおよびVLDLが挙げられるが、これらに限定されない。ここでは、動物中の血漿脂質濃度を低下させる医薬の調製において本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。30

#### 【0023】

本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはACC1およびACC2の両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによって、動物中の肝臓トリグリセリド濃度を低下させる方法である。ここでは、動物中の肝臓トリグリセリド濃度を低下させる医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。NAFLDは、肝細胞中の単純なトリグリセリド蓄積（肝臓脂肪症）から炎症を伴う肝臓脂肪症（脂肪性肝炎）、線維化および肝硬変による疾患領域を包含する。NAFLDはNASPHに達する可能性がある。したがって、本発明の別の実施形態は、ACC1またはACC2、あるいは好ましくはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することにより、動物における肝臓脂肪症を改善することを含む。肝臓脂肪症は、NAFLD、脂肪性肝炎またはNASPHであってもよい。ここでは、動物における肝臓脂肪症を治療する医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。いくつかの実施形態では、脂肪症は、NAFLD、脂肪性肝炎またはNASPHである。40

#### 【0024】

50

本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、その必要性のある動物における過脂肪蓄積を減少させる方法である。動物の過脂肪蓄積の減少の指示薬として、体脂肪を減らすものが挙げられるが、これに限定されない。本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物における肥満の重篤度を改善するまたは軽減する方法である。本発明の他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物における食事誘発性肥満の重篤度を改善するまたは軽減する方法である。ここでは、動物における肥満を治療する医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。1実施形態では、前記医薬は、動物における体脂肪を減少させるために使用される。他の実施形態では、肥満は食事誘発性である。

10

#### 【0025】

本発明の別の実施形態として、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物中の血漿グルコースを低下させる方法および血漿トリグリセリド濃度を低下させる方法が挙げられるが、これらに限定されない。ここでは、動物中の血中グルコースまたは血漿トリグリセリドを低下させる医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが提供される。別の実施形態として、ACC1またはACC2の発現を選択的にまたはACC1およびACC2の発現を同時に減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物におけるインシュリンまたはレプチン感受性の改善方法が挙げられるが、これに限定されない。ここでは、動物におけるインシュリンまたはレプチン感受性を改善する医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが提供される。1実施形態では、インシュリン感受性の改善によって、必然的に、インシュリン濃度を減少させる結果となる。1実施形態では、インシュリン感受性の改善は、インシュリンの減少によって測定する。別の実施形態として、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物において、脂肪酸酸化を増やす方法、脂肪酸合成を減らす方法および肝グルコース産生を抑制する方法が挙げられるが、これらに限定されない。ここでは、脂肪酸酸化を増やす、脂肪酸合成を減らす、または肝グルコース産生を抑制する医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが提供される。他の実施形態として、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物の肝臓マロニルCoA濃度を減少させる方法が挙げられる。他の実施形態として、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物の脂肪生成または酸化組織中のマロニルCoA濃度を減少させる方法が挙げられる。他の実施形態として、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物における肝臓インシュリン感受性の改善が挙げられる。ここでは、動物におけるインシュリン感受性を改善するための医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが提供される。他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物の血漿ケトン濃度を改善する方法である。血漿ケトンとして、3-ベータヒドロキシブタレート、アセトンおよびアセトアセテートが挙げられる。他の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、動物における肝臓脂肪酸化を増やす方法である。

20

#### 【0026】

本発明の別の実施形態は、ACC1、ACC2またはその両方の発現を減らすアンチセンス化合物を投与することによる、ある状態の重篤度を改善するまたは軽減することを含む。前記状態として、代謝障害および循環器障害が挙げられるが、これらに限定されない。代謝障害として、肥満、食事誘発性肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、脂質異常症、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症および代謝症候群が挙げられるが、これらに限定されない。循環器障害として、冠状心疾患が挙げられるが、これに限定されない。ここでは、代謝または循環器

30

40

50

障害を阻止するまたは治療するための医薬の調製において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが提供される。ここでは、肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択される状態の改善または治療のために本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。

#### 【0027】

ここでは、肥満、糖尿病、インシュリン耐性、インシュリン欠乏、コレステロール過剰血症、過血糖症、高トリグリセリド血症、高脂肪酸血症、肝臓脂肪症、代謝症候群または心血管疾患から選択され、ACC1およびACC2の発現を減少させることによって治療可能な状態の改善または治療のために、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することが意図される。10

#### 【0028】

##### 標的

本明細書で使用される用語「標的核酸」および「ACC1またはACC2をコードする核酸分子」は、ACC1またはACC2をコードするDNAから転写されたRNA(mRNA前駆体およびmRNA、またはその一部を含む)、またそのようなRNAから誘導されたcDNAを包含するために、便宜上使用されてきた。

#### 【0029】

活性アンチセンス化合物が相補的である標的核酸上の位置を、以下、「有効な標的セグメント」と言う。本明細書で使用される用語「有効な標的セグメント」は、活性アンチセンス化合物が標的となる標的領域の少なくとも一部と定義される。いかなる理論にも縛られるつもりはないが、現在、これらの標的セグメントは、ハイブリダイゼーションに到達可能な標的核酸の位置を示すと考えられている。20

#### 【0030】

##### 領域、セグメントおよび部位

ターゲッティングプロセスは、普通、所望の効果、たとえば、ACC1、ACC2またはその両方の発現の減少となるように、アンチセンス相互作用がおこる標的核酸の範囲内にある、少なくとも1つの標的領域、セグメントまたは部位の検出も含む。「領域」は、少なくとも1つの識別可能な構造、機能または特徴を持つ標的核酸の一部と定義する。セグメントは、標的核酸の領域内にある。「セグメント」は、標的核酸内の領域のより小さなあるいはサブの一部と定義する。本発明で使用される「部位」は、標的核酸内の特有な核酸塩基位置と定義する。30

#### 【0031】

ひとたび、1以上の標的領域、セグメントまたは部位が識別されると、標的に十分に相補的となり、すなわち、十分な親和性および特性でハイブリダイゼーションされ、所望の効果を得るアンチセンス化合物が設計される。

#### 【0032】

標的セグメントは、有効な標的セグメントの5' - 末端からの連続する核酸塩基の少なくとも一部を含むDNAまたはRNA配列(残りの核酸塩基は、標的セグメントの5' - 末端のすぐ上流から始まり、DNAまたはRNAが所望の数の核酸塩基を含むまで続く、同じDNAまたはRNAの連続的ストレッチである)を含みうる。同様に、有効な標的セグメントは、有効な標的セグメントの3' - 末端からの連続する核酸塩基の少なくとも一部を含むDNAまたはRNA配列(残りの核酸塩基は、標的セグメントの3' - 末端のすぐ下流から始まり、DNAまたはRNAが所望の数の核酸塩基を含むまで続く、同じDNAまたはRNAの連続的ストレッチである)によって示される。有効なオリゴマー標的セグメントは、有効な標的セグメントの配列の内部の一部からの連続的核酸塩基の少なくとも一部を含み、オリゴヌクレオチドが所望の数の核酸塩基を含むまでどちらかのあるいは両方向に伸長することができるDNAまたはRNA配列によって示すことができるとも理解される。あるいは、標的セグメントは、たとえば、有効な標的セグメントの5'または3'末端から、あるいは内部部位から数えて、有効な標的セグメントの少なくとも8、940

、10、11、12、13、14、15、16、17、18または19の連続核酸塩基を含みうる。したがって、本発明に包含されるオリゴヌクレオチドは、本明細書で例示したオリゴヌクレオチドの少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18または19の連続的核酸塩基を含んでもよい。例示したアンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも13核酸塩基部分を含むオリゴヌクレオチドが好ましい。例示したアンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも8核酸塩基部分を含むオリゴヌクレオチドも好ましい。

#### 【0033】

本明細書で識別された有効な標的セグメントは、ACC1またはACC2を調整する追加の化合物のスクリーンに使用することができる。前記スクリーニング方法は、ACC1またはACC2をコードする核酸分子の有効な標的セグメントを、1種以上の候補調整剤と接触させるステップと、ACC1またはACC2をコードする核酸分子の濃度を上げるまたは下げる1種以上の候補調整剤に選択するステップとを含む。ひとたび、候補調整剤または調整剤が、ACC1またはACC2をコードする核酸分子の濃度をあるレベルに変更することができることが示されれば、前記調整剤は、ACC1またはACC2の機能のさらなる調査研究に、あるいは調査、診断薬あるいは治療薬としての用途に使用することができる。

10

#### 【0034】

例示された化合物が抑制される標的領域を、本明細書では、標的核酸の最も5'位よりの部位を示すことによって記載する。例示された長さの化合物と結合した、例示した化合物の標的領域を記載する。たとえば、配列番号210のアンチセンス化合物は、ACC2配列MM\_133904.1のヌクレオチド1932~1951を標的する。本明細書の例示で示すように、前記オリゴヌクレオチドはACC2を減少させ、したがって、ヌクレオチド1932~1951は、NM\_133904.1の有効な標的セグメントである。本発明の化合物は、たとえば、長さ13~30核酸塩基でもよく、たとえば、例示された配列の13核酸塩基部分を含んでもよいので、本発明の範囲内の化合物は、NM\_133904.1のヌクレオチド1915~1968のいかなる部分も標的してもよいことは、認められうる。さらなる例として、配列番号210の13-核酸塩基部分を含む、NM\_133904.1の30マー標的ヌクレオチド1915~1944もここで記載する本発明の範囲内に包含される。

20

#### 【0035】

mRNA分子中の開始コドンと停止コドンおよびこれらの対応DNA分子は、当業者には容易に識別可能である。本明細書で使用される「開始コドン領域」または「停止コドン領域」は、開始または停止コドンからいずれかの方向(すなわち、5'または3')における、約25から約50までの連続ヌクレオチドを包含するmRNAまたは遺伝子の部分を言う。したがって、「開始コドン領域」または「停止コドン領域」は、本発明のアンチセンス化合物で効果的に標的される全領域を言う。

30

#### 【0036】

翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域を言うことが当該分野で公知の、オープシリーディングフレーム(ORF)または「コード領域」は、効果的に標的される領域でもある。本発明の範囲内で、1つの領域は、遺伝子のオープシリーディングフレーム(ORF)の翻訳開始または終止コドンを包含する遺伝子内領域である。

40

#### 【0037】

別の標的領域として、「5'非翻訳領域」(5'UTR)および「3'非翻訳領域」(3'UTR)が挙げられる。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自身、およびキャップ部位に隣接する最初の50ヌクレオチドを含むと考えられる。前記5'キャップ領域は標的でもある。

#### 【0038】

したがって、適切な標的領域として、5'UTR、開始コドン、停止コドン、コード領域、3'UTR、5'キャップ領域、イントロン、エキソン、イントロン-エキソン接合

50

部、エキソン・イントロン接合部およびエキソン・エキソン接合部が挙げられるが、これらに限定されない。適切な標的領域は、接合部部位のどちらかの方向（すなわち、5'または3'）の約25～約50ヌクレオチドを包含する。

#### 【0039】

##### 変異体

また、当該分野では、選択的RNA転写物を、DNAの同じ遺伝子領域から產生することができるることも知られている。これらの選択的転写物は、一般的に、「変異体」として知られている。より具体的には、「mRNA前駆体変異体」は、同じ遺伝子DNAから產生された転写物であって、同じ遺伝子DNAから產生された別の転写物とは、それらの開始または停止位置のいずれかにおいて相違し、イントロン配列およびエキソン配列の両方を含む転写物である。

10

#### 【0040】

スプライシング中に1以上のエキソンまたはイントロン領域、あるいはその一部が切除されると、mRNA前駆体変異体はより小さな「mRNA変異体」を产生する。したがって、mRNA変異体は、加工mRNA前駆体変異体であり、特有のmRNA前駆体変異体は、それぞれ、スプライシングの結果として、常に、特有のmRNA変異体を产生するに違いない。また、これらのmRNA変異体は、「選択的スライス変異体」としても知られている。もし mRNA 前駆体変異体のスプライシングがおこらなければ、mRNA前駆体変異体は、mRNA変異体と同一である。

20

#### 【0041】

また、当該分野では、転写を開始または停止する選択シグナルを使用することによって、変異体を产生することができ、mRNA前駆体およびmRNAは、複数の開始コドンまたは停止コドンを持ちうることが知られている。mRNA前駆体またはmRNAを起源とし、選択的開始コドンを使用する変異体は、そのmRNA前駆体またはmRNAの「選択的開始変異体」として知られている。選択的停止コドンを使用するそれらの転写物は、そのmRNA前駆体またはmRNAの「選択的停止変異体」として知られている。選択的停止変異体の1つの具体的なタイプは、產生された複数の転写物が転写機構による「ポリA停止シグナル」の1つの別の選択に由来する「ポリA変異体」であり、それによって、特有のポリA部位で停止する転写物を产生する。したがって、本明細書に記載するタイプの変異体も、適切な標的核酸である。

30

#### 【0042】

##### 標的発現の調整

「調整」は、機能の変動、たとえば、標的RNAの発現または濃度の増加（刺激または誘発）または削減（抑制または減少）を意味する。他の例として、発現の調整は、mRNA前駆体プロセシングのスライス部位選択を変動することを含みうる。「発現」は、遺伝子のコードされた情報が現在の構造に変換され、細胞内で作動する機能全てを含む。これらの構造は、転写および翻訳の産生物を含む。「発現の調整」は、そのような機能の変動を意味する。「調整剤」は、ACC1またはACC2の発現を調整し、有効な標的セグメントに相補的なものの少なくとも一部を含む化合物を言う。

40

#### 【0043】

標的核酸の発現の調整は、核酸機能の任意の番号の変更によって達成することができる。調整すべきRNAの機能として、転座機能を含むことができ、これには、RNAのタンパク質翻訳の部位への転座、RNA合成の部位から離れた細胞内の部位へのRNAの転座、RNAからのタンパク質の翻訳が含まれるが、これらに限定されない。調整することができるRNAプロセシング機能として、1以上のRNA種を得るためにRNAのスプライシング、RNAのキャッピング、RNAの3'成熟およびRNAと関連する触媒活性または錯体形成（RNAにかかるものでもよいし、RNAによって促進されるものでもよい）が挙げられるが、これらに限定されない。発現の調整は、時間的なあるいは純定常状態レベルによる、1以上の核酸種の濃度の増加、あるいは1以上の核酸種の濃度の低下となる可能性がある。標的核酸機能によるそのような干渉の1つの結果が、ACC1、ACC

50

2またはA C C 1およびA C C 2の両方の発現の調整である。したがって、1実施形態では、発現の調整は、標的RNAまたはタンパク質濃度の増加または減少を意味することができる。他の実施形態では、発現の調整は、1以上のRNAスプライス産生物の増加または減少、あるいは2種以上のスプライス産生物の比の変化を意味することができる。

#### 【0044】

##### ハイブリダイゼーションおよび相補性

「ハイブリダイゼーション」は、アンチセンス化合物の相補性鎖のペアリングを意味する。特定の機構に限定されないが、ペアリングの最も一般的な機構には水素結合が関与し、これは、アンチセンス化合物の鎖の相補ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基（核酸塩基）間のワトソン・クリック、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン水素結合であるかもしれない。たとえば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成によって組み合わされる相補核酸塩基である。ハイブリダイゼーションは、種々の条件下でおこりうる。特異的結合が望まれる条件下、すなわち、インビオアッセイまたは治療処置の場合の生理学的条件下、およびアッセイがインビトロアッセイで行われる条件下で、アンチセンス化合物の非標的核酸配列への非特異的結合を避けるために、十分な程度の相補性がある場合、アンチセンス化合物は、「特異的にハイブリダイゼーションしうる」。

10

#### 【0045】

本明細書で使用される「相補性」は、1本または2本のアンチセンス化合物鎖上の2個の核酸塩基間での正確なペアリング能力を言う。たとえば、アンチセンス化合物のある位置の核酸塩基と標的核酸のある位置の核酸塩基との水素結合が可能であれば、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の水素結合の位置は、相補的な位置であると考えられる。各分子中の十分な数の相補的位置が互いに水素結合することができる核酸塩基によって占められている場合、アンチセンス化合物と別のDNAまたはRNAとは互いに相補的である。したがって、「特異的にハイブリダイゼーション可能な」と「相補的」は、安定で特異的な結合がアンチセンス化合物と標的核酸との間でおこり、化合物を機能化するように、十分な量の核酸塩基にわたって正確なペアリングまたは相補性の十分な程度を示すために使用される用語である。

20

#### 【0046】

当該分野では、特異的にハイブリダイゼーション可能であるため、あるいは本発明に包含されるために、アンチセンス化合物の配列がその標的核酸の配列に対して100%相補的である必要はないことが理解されている。標的核酸またはそのような核酸内の有効な標的セグメントに対して100%未満の相補性はミスマッチを有する化合物を提供し、したがってミスマッチを有する化合物が本発明の範囲内に入ることは、当業者によって認められるであろう。好ましいオリゴヌクレオチドは、約3未満のミスマッチを有する。

30

#### 【0047】

さらに、オリゴヌクレオチドは、介在または隣接セグメントがハイブリダイゼーション（たとえば、ループ構造、ミスマッチまたはヘアピン構造）に巻き込まれないように、複数のセグメントをハイブリダイゼーションしてもよい。本発明のアンチセンス化合物は、それらが標的とする標的核酸配列内の標的領域に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列相補性を含む。たとえば、アンチセンス化合物の20個の核酸塩基のうちの18個が標的領域に対して相補的で、したがって特異的にハイブリダイゼーションするアンチセンス化合物は、90%相補性を示すであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は、相補的核酸塩基でクラスターを形成してもよく、あるいは点在させられてもよく、互いに、あるいは相補的核酸塩基に接触している必要はない。このように、両側に標的核酸を持つ完全相補性の2つの領域が並ぶ、4個の非相補的核酸塩基を有する長さ18核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸に関して77.8%の総相補性を持ち、したがって、本発明の範囲内に包含されるであろう。標的核酸の領域を持つアンチセンス化合物の%相補性は、当該分野で公知のBLASTプログラム（基本的な局所アラインメント検索ツール）

40

50

と PowerBLAST プログラム (Altschul, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang および Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656) を使用して常法的に測定することができる。%相同性、配列の同一性または相補性は、たとえば、Smith および Watermann のアルゴリズムを使用するデフォルト設定 (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) を使用して、Gap プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison WI) によって測定することができる。

#### 【0048】

ACC1 および ACC2 の両方に対して相補性のあるアンチセンス化合物は、本発明の範囲内であると考えられる。たとえば、ACC1 に対して 100% の相補性を持つが、ACC2 に対しては 85% の相補性または 3 ミスマッチ (したがって、標的部位に対して相補的である 20 個のヌクレオチドのうち 17 個を持つ) を持つオリゴヌクレオチドは、本発明で使用を意図するものである。同様に、ACC1 および ACC2 に両方に対して 85% の相補性を持つオリゴヌクレオチドも、使用が意図される。また、ACC1 および ACC2 の両方に対して 100% の相補性を持つオリゴヌクレオチドも使用が意図される。本発明の好ましい実施形態として、ACC1 および ACC2 に対して十分な相補性を持ち、ACC1 および ACC2 の両方における発現の減少をもたらすオリゴヌクレオチドが挙げられる。

10

#### 【0049】

ACC1 および ACC2 配列の通常のアラインメント (たとえば、BLAST または別の簡単に入手しうるプログラムによって実施されるアラインメント) が、ACC1 および ACC2 を別々にあるいは同時に標的とするオリゴヌクレオチドの設計に適切な領域を示すことは、当業者によって認められるであろう。

20

#### 【0050】

##### アンチセンス機構および化合物

「アンチセンス機構」は、標的核酸を持つ化合物のハイブリダイゼーションに関する全ての機構であり、ハイブリダイゼーションの結果または効果は、たとえば、転写またはスプライシングを含む細胞機構の共同失速を持つ標的分解または標的占有である。そのような機構は当該分野で認められ、たとえば、RNAi および RNA 干渉を基礎とする機構が挙げられる。

30

#### 【0051】

用語「アンチセンス化合物」は、核酸分子の領域にハイブリダイゼーションしうるポリマー構造体を言う。この用語として、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縁体、オリゴヌクレオチド模倣物およびこれらのキメラ混合物が挙げられる。アンチセンス化合物は、通常、直線状に生成されるが、つなぎ合わせることも、あるいは環状に生成することもできる。さらに、分岐状構造は当該分野で公知である。「アンチセンス化合物」または「オリゴマーアンチセンス化合物」は、化合物がハイブリダイゼーションし、その発現を調整する (増やすまたは減らす) 核酸分子の領域に対し少なくとも部分的に相補的であるアンチセンス化合物を言う。したがって、全てのアンチセンス化合物はオリゴマー化合物といってよいが、オリゴマー化合物は全てアンチセンス化合物ではない。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、核酸をベースとするオリゴマーであるアンチセンス化合物である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは化学的に修飾されうる。アンチセンス化合物の限定ではない例示として、プライマー、プローブ、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド、選択的スプライサーおよび siRNA が挙げられる。このように、これらの化合物を、一本鎖、二本鎖、環状、分岐状、またはヘアピン状の形態に導くことができ、内部または末端が膨らんだまたはループ状のような構造要素を含むことができる。二本鎖化合物は、完全にまたは部分的に二本鎖化された化合物のハイブリダイゼーションおよび形成を可能

40

50

にする、十分な自己相補性を有する二本鎖化合物または一本鎖を形成するための、2本のハイブリダイゼーションされたストランドで構成されうる。好ましい実施形態では、本発明の化合物は自己触媒体ではない。

#### 【0052】

本発明における「キメラ」アンチセンス化合物または「キメラ」は、オリゴヌクレオチドなどの一本鎖または二本鎖アンチセンス化合物であり、これは、2個以上の化学的に異なる領域を持ち、前記領域は、それぞれ、少なくとも1個の分子ユニット、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物を含む場合、ヌクレオチドを含むものである。

#### 【0053】

「ギャップマー」は、両側に非デオキシオリゴヌクレオチドセグメントが並ぶ2' - デオキシオリゴヌクレオチド領域を有する、アンチセンス化合物、一般的にオリゴヌクレオチドと定義する。中央領域を「ギャップ」と言う。傍らにあるセグメントを「ウイング」と言う。もしウイングの1つが非デオキシオリゴヌクレオチドモノマーを持たなければ、「ヘミマー」と記載する。

#### 【0054】

本発明の1実施形態では、二本鎖アンチセンス化合物は、短い干渉RNA(siRNA)を包含する。本明細書で使用される用語「siRNA」は、第一鎖および第二鎖を有する二本鎖化合物と定義し、各鎖は、中央部と2個の独立した末端部とを持つ。第一鎖の中央部は、第二鎖の中央部に対して相補的であり、鎖のハイブリダイゼーションを可能にする。末端部は、独立して、場合によっては、相補鎖の対応末端部に相補的である。鎖の末端は、1以上の天然または修飾核酸塩基の付加によって修飾され、突出部を形成してもよい。限定ではない1例では、siRNAの第一鎖は、標的核酸に対してアンチセンスであり、第二鎖は第一鎖に対して相補的である。ひとたびアンチセンス鎖を特定の核酸標的を標的するように設計すると、siRNAのセンス鎖は、アンチセンス鎖の相補体として設計し、合成することができ、どちらかの鎖は、修飾またはどちらかの末端への付加を含んでもよい。たとえば、1実施形態では、siRNA二重鎖の2本の鎖は、中央核酸塩基で相補的であり、それぞれ、1または両末端で突出部を持つ。二重鎖の一端をまっすぐに、他端を突出した核酸塩基を持つようにすることが可能である。1実施形態では、突出する核酸塩基の数は、二重鎖の各鎖の3'末端から1~6個である。他の実施形態では、突出する核酸塩基の数は、二重鎖の1つの鎖の3'末端から1~6個である。さらなる実施形態では、突出する核酸塩基の数は、1本または2本の二重鎖の5'末端から1~6個である。他の実施形態では、突出する核酸塩基の数は0である。好ましい実施形態では、各鎖は、長さ19核酸塩基で、相補鎖を持つ完全にハイブリッド可能な、突出部を含まないものである。

#### 【0055】

siRNA二重鎖の各鎖は、約12~約35核酸塩基であってもよい。好ましい実施形態では、siRNA二重鎖の各鎖は、約17~約25核酸塩基である。中央相補部分は、長さ約12~約35核酸塩基であってもよい。好ましい実施形態では、中央相補部部分は、長さ約17~約25核酸塩基である。siRNA二重鎖の各鎖および中央相補部分は、長さ約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35核酸塩基であってもよいことは理解される。末端部は、1~6核酸塩基でありうる。末端部は、長さ1、2、3、4、5または6核酸塩基であることが理解される。siRNAは、末端部を持たなくともよい。siRNAの2本の鎖は、内部で結合し、3'または5'末端をそのままにしておくことができ、あるいは結合し、連続するヘアピン構造またはループを形成することもある。ヘアピン構造は、5'または3'末端のどちらかで突出部を含み、1本鎖特性の延長を作ってもよい。

#### 【0056】

二本鎖化合物を、本明細書で検討するような化学修飾を含むように作ることができる。

#### 【0057】

10

20

30

40

50

## 化学修飾

本発明の実施形態として、修飾ヌクレオシド間結合、修飾核酸塩基または修飾糖から選択される少なくとも2個の修飾を含む化合物が挙げられる。1実施形態では、本発明のアンチセンス化合物はキメラオリゴヌクレオチドである。1実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、少なくとも1個の2' - O - (2-メトキシエチル)ヌクレオチドが、それぞれ5'および3'末端側にあるデオキシヌクレオチド領域を含むキメラオリゴヌクレオチドである。他の実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、10個のデオキシヌクレオチドを含み、5'および3'の両末端側に5個の2' - O - (2-メトキシエチル)ヌクレオチドがあるキメラオリゴヌクレオチドである。さらなる実施形態では、本発明のアンチセンス化合物は、少なくとも1個の5-メチルシトシンを有してもよい。

10

### 【0058】

当該分野で知られているように、ヌクレオシドは塩基-糖混合物である。ヌクレオシドの塩基部分は、普通、複素環塩基（「核酸塩基」または単位「塩基」とも言う）である。そのような複素環塩基の最も一般的な2つのクラスは、プリン類およびピリミジン類である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合するリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシリル糖を含むこれらのヌクレオシドに関し、リン酸基は、糖の2'、3'または5'ヒドロキシリル部分に結合することができる。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は、それぞれ、隣接するヌクレオシドを共有結合し、直鎖ポリマー化合物を形成する。また、この直鎖ポリマー化合物のそれぞれの末端がさらに結合し、環状化合物を形成することができる。オリゴヌクレオチド内で、リン酸基は、一般的に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成すると言われている。RNAおよびDNAの通常の結合または骨格は、3' ~ 5'リン酸ジエステル結合である。オリゴヌクレオチド中に化学修飾を含みその活性を変化させるのが好ましいことが多い。化学修飾は、たとえば、標的RNAに関するアンチセンスオリゴヌクレオチドの親和性を増加させることによって、ヌクレアーゼ耐性を増加させることによって、および/またはオリゴヌクレオチドの薬物動態を変えることによって、オリゴヌクレオチド活性を変えることができる。その標的のためのオリゴヌクレオチドの親和性を増やす化学特性の使用は、より短いオリゴヌクレオチド化合物の使用を可能にする。

20

### 【0059】

本明細書で使用する用語「核酸塩基」または「複素環塩基部分」は、ヌクレオシドの複素環塩基部分を言う。一般的に、核酸塩基は、他の核酸の塩基に水素結合することができる原子または前記原子の基を1以上含む任意の基を言う。「非修飾」または「天然の」核酸塩基、たとえば、プリン核酸塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ピリミジン核酸塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)に加え、当該分野で公知の、多くの修飾核酸塩基または核酸塩基模倣物が、本発明に使用可能である。用語修飾核酸塩基および核酸塩基模倣物は重なりあうが、一般的に、修飾核酸塩基は、構造において、たとえば、7-デアザプリンまたは5-メチルシトシンのような親核酸塩基に非常に類似する核酸塩基を指すが、一方、核酸塩基模倣物は、たとえば、三環フェノキサジン核酸塩基模倣物のようなより複雑な構造を含む。前記修飾核酸塩基の製造方法は、当業者によく知られている。

30

### 【0060】

また、本発明のアンチセンス化合物は、修飾糖部分を含む1以上のヌクレオシドを含んでもよい。ヌクレオシドのフラノシリル糖環は、置換基の付加、2個の非ジェミナル原子の架橋による二環式核酸(BNA)の形成、4' - 位の環を形成する酸素に関し-S-、-N(R)-または-C(R1)(R2)のような原子または基の置換(しかしこれに限定されない)のような数多くの方法で修飾しうる。前記修飾糖部分はよく知られ、その標的および/または増加ヌクレアーゼ耐性に関するアンチセンス化合物の親和性を変更する、普通、増やすために使用することができる。好ましい修飾糖の代表的なリストには、LNAおよびENA(4' - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - O - 2' - 結合を含む)を含む二環式修飾糖(BNAの);および置換糖、特に、2' - F、2' - OCH<sub>2</sub>または2' - O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>

40

50

2-OCH<sub>3</sub>置換基を含む、2'-置換糖が挙げられるが、これらに限定されない。また、糖類は、なかでも糖模倣物基に置換される。修飾糖の製造法は、当業者によく知られている。

#### 【0061】

本発明は、ヌクレオシドまたは別の修飾モノマーユニットとともに結合し、アンチセンス化合物を形成するヌクレオシド間結合基を含む。ヌクレオシド間結合基の2つの主なクラスは、リン原子の存在または不存在によって定義される。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合として、リン酸ジエステル類、リン酸トリエステル類、メチルホスホネート類、亜リン酸エステル類およびチオリン酸エステル類が挙げられるが、これらに限定されない。リンを含有しない代表的なヌクレオシド間結合基として、メチレンメチルイミノ(-C(H)<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-)、チオジエステル類(-O-C(O)-S-)、チオノカルバメート(-O-C(O)(NH)-S-)；シロキサン(-O-Si(H)<sub>2</sub>-O-)；およびN,N'-ジメチルヒドラジン(-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-)が挙げられるが、これらに限定されない。非リンヌクレオシド間結合基を含むアンチセンス化合物は、オリゴヌクレオシドと言われる。天然のリン酸ジエステル結合と比べて、修飾ヌクレオシド間結合は、アンチセンス化合物のヌクレアーゼ耐性を変化させる、普通、増やすために、使用することができる。キラル原子を有するヌクレオシド間結合は、ラセミ、キラルまたは混合物として製造することができる。代表的なキラルヌクレオシド間結合として、アルキルリンおよびチオリン酸エステル類が挙げられるが、これらに限定されない。リン含有およびリンを含有しない結合の製造法は、当業者によく知られている。10

#### 【0062】

本明細書で使用する「模倣物」は、糖、核酸塩基および/またはヌクレオシド間結合に置換された基を言う。模倣物は、オリゴヌクレオチドの結合ヌクレオシドに、構造的には非常に異なる（単なる修飾ではない）が、機能的には類似する基である。一般的に、模倣物は、糖または糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの変わりに使用され、核酸塩基は、選択標的へのハイブリダイゼーションのために維持される。糖模倣物の代表的例示として、シクロヘキセニルまたはモルフォリノが挙げられるが、これらに限定されない。糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせに関する模倣物の代表的な例示として、ペプチド核酸(PNA)および非電荷アキラル結合によって結合するモルフォリノ基が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、模倣物は、核酸塩基の代わりに使用される。代表的な核酸塩基の模倣物は、当該分野でよく知られており、三環フェノキサジン類縁体および汎用塩基(Bergerら, Nuc Acid Res. 2000, 28: 2911-14, 参照により本明細書に組み込まれる)が挙げられるが、これらに限定されない。糖、ヌクレオシドおよび核酸塩基模倣物の合成方法は、当業者によく知られている。20

#### 【0063】

本明細書で使用される、用語「ヌクレオシド」は、ヌクレオシド、無塩基ヌクレオシド、修飾ヌクレオシド、および模倣物塩基および/または糖類を持つヌクレオシドを含む。30

#### 【0064】

本発明において、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸(RNA)またはデオキシリボ核酸(DNA)のオリゴマーまたはポリマーであるアンチセンス化合物を言う。この用語は、天然起源のおよび非天然起源の核酸塩基、糖および共有ヌクレオシド間結合で構成され、可能であれば、さらに非核酸結合体を含むオリゴヌクレオチドを含む。40

#### 【0065】

本発明は、たとえば、リン酸ジエステルおよびチオリン酸エステルヌクレオシド間結合を含むヌクレオシド間結合を形成するのに有用な反応性リン基を有する化合物を提供する。本発明の前駆体またはオリゴマー化合物の製造および/または精製方法は、本発明の組成物または方法の限定ではない。DNA、RNAおよび本発明のアンチセンス化合物の合成および精製方法は、当業者によく知られている。

#### 【0066】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「キメラアンチセンス化合物」は、同じアンチセンス化合物内の別の糖、核酸塩基およびヌクレオシド間結合と比べて、示差的に修飾された、糖、核酸塩基および／またはヌクレオシド間結合を少なくとも1個有するアンチセンス化合物を言う。糖、核酸塩基およびヌクレオシド間結合の残りは、独立して、修飾されてもよく、非修飾であってもよいが、ただし、これらは、示差的に修飾された部分（複数を含む）から識別可能である。一般的に、キメラアンチセンス化合物は、孤立した位置にあってもよいし、特定のモチーフを規定する領域に一塊となってもよい修飾ヌクレオシドを持つ。修飾および／または模倣物基の任意の組み合わせは、本発明のキメラアンチセンス化合物を含みうる。

## 【0067】

キメラアンチセンス化合物は、普通、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞摂取の増加および／または標的核酸に関する結合親和性の増加を与えるように修飾された領域を少なくとも1つ含む。アンチセンス化合物の付加的な領域は、RNA：DNAまたはRNA：RNAハイブリッドを開裂しうる酵素のための基質として作用してもよい。一例として、RNアーゼHは、RNA：DNA二重鎖のRNA鎖を開裂する細胞エンドヌクレアーゼである。したがって、RNアーゼHの活性化は、RNA標的の開裂の結果となり、それによって、遺伝子発現の抑制の効率を大きく促進する。その結果、キメラを用いた場合、より短いアンチセンス化合物データについて、たとえば、同じ標的領域にハイブリダイゼーションするチオリン酸エステルデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、匹敵する結果をしばしば得ることができる。RNA標的の開裂は、ゲル電気泳動、もし必要なら、当該分野で公知の関連核酸ハイブリダイゼーション技術を使用して、日常的に測定することができる。

10

## 【0068】

あるキメラおよび非キメラアンチセンス化合物は、特定のモチーフを持つものとして、さらに説明することができる。本発明で使用される用語「モチーフ」は、類似した、または示差的に修飾された、または修飾されていないヌクレオシドに関連して、アンチセンス化合物中の修飾糖部分および／または糖模倣物基の種類を言う。本発明で使用される用語「糖類」、「糖部分」および「糖模倣物基」は、相互互換的に使用される。そのようなモチーフとして、ギャップモチーフ、交互モチーフ、完全修飾モチーフ、ヘミマーモチーフ、プロッカーモチーフおよび位置的に修飾されたモチーフが挙げられるが、これらに限定されない。核酸塩基の配列および構造ならびにヌクレオシド間結合のタイプは、アンチセンス化合物のモチーフの決定において要因ではない。

20

## 【0069】

本発明の1態様では、アンチセンス化合物は、1以上の共役基によって共有結合によって修飾されている。共役基は、可逆性結合または付加逆性結合によって結合してもよい。共役基は直接アンチセンス化合物に結合してもよいし、またはリンカーを使用して結合してもよい。リンカーは、1官能性または2官能性リンカーであってもよい。そのような結合方法およびリンカーは当業者によく知られている。一般的に、共役基は、アンチセンス化合物に結合し、1以上の特性を変性する。そのような考えは、当業者によく知られている。

30

## 【0070】

## N A F L D および代謝症候群

用語「非アルコール性肝臓脂肪症疾患」（NAFLD）は、肝細胞内での単純なトリグリセリド蓄積（肝臓脂肪症）から炎症を伴う肝臓脂肪症（脂肪性肝炎）、線維化および肝硬変までの範囲の疾患領域を包含する。非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、トリグリセリドの堆積が進み、NAFLDの進行を経ておこる。壊死、炎症および線維化を誘発しうる二次打撃は、NASHの発症を必要とする。二次打撃の対象は、広いカテゴリー（酸化ストレスの増加をもたらす要因および炎症性サイトカインの発現を促進する要因）に分類しうる。肝臓トリグリセリドの増加は、動物およびヒトの肝細胞中の酸化的ストレスの増加をもたらし、肝臓トリグリセリド蓄積、酸化的ストレスおよびNASHへの肝臓脂

40

50

肪症の進行との間の可能性のある因果関係を示していることが示唆されてきた (Brown および Horton, J. Clin. Invest., 2004, 114, 147 - 152)。高トリグリセリド血症および高脂肪酸血症は、周辺組織中にトリグリセリドの蓄積をもたらす可能性がある (Shimamura, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 322, 1080 - 1085)。

#### 【0071】

「代謝症候群」は、代謝に由来する脂質および非脂質循環器リスク要因の集まりと定義される。インシュリン耐性として知られる、全身的な代謝障害と深くかかわる。全米コレステロール教育プログラム (NCEP) 成人治療パネル III (ATP III) は、5つのリスク決定子のうち3つ以上が存在する場合、代謝症候群の診断用の基準を定めた。5つのリスク決定子は、男で102cmを超えるウエスト周りとして規定される腹部の肥満、150mg/dL以上のトリグリセリド濃度、男で40mg/dL未満、女で50mg/dL未満のHDLコレステロールレベル、130/85mmHg以上の血圧、および110mg/dL以上の空腹時血糖値である。これらの決定子は臨床現場で容易に測定することができる (JAMA, 2001, 285, 2486 - 2497)。

10

#### 【0072】

##### 組み合わせ

本発明の組成物は、2種以上のアンチセンス化合物を含むことができる。他の関連実施形態では、本発明の組成物は、1種以上のアンチセンス化合物、特に、第一核酸に標的されたオリゴヌクレオチドと、第二核酸標的に標的された付加的なアンチセンス化合物を1種以上とを含むことができる。あるいは、本発明の組成物は、同じ核酸標的の異なる領域に標的されたアンチセンス化合物を2種以上含むことができる。2種以上の組み合わせられた化合物は一緒に使用してもよいし、連続的に使用してもよい。

20

#### 【0073】

##### 併用治療

本発明の化合物は、状態の治療のために、付加的な効果を1種以上の本発明の化合物と1種以上の別の適切な治療／予防化合物とを投与することによって達成する併用治療において使用されてもよい。1種以上の治療／予防化合物を、ACC1またはACC2のアンチセンス抑制剤の1種以上と組み合わせて、付加的な治療効果を達成してもよい。

30

#### 【0074】

##### オリゴマー合成

修飾されたおよび修飾されていないヌクレオシドのオリゴマー化は、DNA (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agarwal (1993), Humana Press) および / または RNA (Scaringe, Methods (2001), 23, 206 - 217. Gaitら, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1 - 36. Galloら, Tetrahedron (2001), 57, 5707 - 5713) に関する文献記載の方法にしたがって日常的に行うことができる。

40

#### 【0075】

本発明のアンチセンス化合物は、固相合成の周知の技術によって都合よくおよび日常的に生成することができる。そのような合成のための設備は、数社の専門業者、たとえば、アプライドバイオシステムズ (Foster City, CA) によって販売されている。当該分野で知られているそのような合成のための別の手段のいかなるものも、追加してあるいは代わりに使用してもよい。チオリン酸エステルおよびアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを生成するための類似の技術を使用することはよく知られている。本発明は、オリゴマー合成の方法によって限定されない。

#### 【0076】

##### オリゴマー精製および分析

50

オリゴヌクレオチドの精製および分析の方法は、当業者に知られている。分析方法として、キャピラリー電気泳動(CE)およびエレクトロスプレイ質量分光法が挙げられる。このような合成および分析方法は、マルチウェルプレート上で行うことができる。本発明の方法は、オリゴマー精製の方法によって限定されない。

#### 【0077】

限定ではない開示および参照による組み込み

本発明のある化合物、組成物および方法を、具体性をもって、ある実施形態に従って説明してきたが、本明細書の例示は、単に本発明の化合物を説明するためだけに挙げたもので、本発明はこれらに限定されるものではない。本願に列挙した参考文献、ジェンバンク(登録商標)受託番号などは、それぞれ、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。

10

#### 【実施例】

#### 【0078】

##### 実施例1 アッセイの調整

ACC1またはACC2の発現の調整は、当該分野で公知の種々の方法によってアッセイすることができる。ACC1またはACC2 mRNAの濃度は、たとえば、ノーザンプロット分析法、競合ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)またはリアルタイムPCRによって定量することができる。RNA分析は、全体の細胞RNAまたはポリ(A)+mRNA上で、当該分野で公知の方法によって行うことができる。RNAの分離方法は、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, p 4.1.1~4.2.9および4.5.1~4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993で教示されている。

20

#### 【0079】

ノーザンプロット分析法は、当該分野では通常のものであり、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, p 4.2.1~4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996で教示されている。リアルタイム定量法(PCR)は、PE-アプライドバイオシステムズ, Foster City, CAから市販されているABI PRISM(登録商標)7700配列検出システムを使用し、および製造業者の指示書に従って、簡単に達成することができる。

30

#### 【0080】

ACC1またはACC2によってコードされているタンパク質の濃度は、当該分野で周知の種々の方法、たとえば、免疫沈降法、ウェスタンプロット分析法(免疫プロット法)、ELISAまたは蛍光活性化細胞選別法(FACS)を使用して定量することができる。ACC1またはACC2によってコードされたタンパク質に関する抗体は、抗体のMSRSカタログ(エリー社, Birmingham, MI)のような種々のソースから識別し入手することができ、あるいは従来の抗体生成法によって製造することができる。ポリクローナル抗血清を生成する方法は、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, p 11.12.1~11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示されている。モノクローナル抗体の生成は、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, p 11.4.1~11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997に教示されている。

40

#### 【0081】

免疫沈降法は、当該分野で標準的なものであり、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, p 10.16.1~10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998.で見つかる。ウェスタンプロット(免疫プロット)分析は、当該

50

分野で標準的なものであり、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, p 10. 8 . 1 ~ 10. 8 . 21, John Wiley & Sons, Inc., 1997で見つかる。酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)は、当該分野で標準的なものであり、たとえば、Ausubel, F. M. ら, Current Protocols in Molecular Biology, 第2巻, p 11. 2 . 1 ~ 11. 2 . 22, John Wiley & Sons, Inc., 1991で見つかる。

#### 【0082】

本発明のアンチセンス化合物の標的核酸発現における効果は、標的核酸が測定可能な濃度で存在すれば、種々の細胞タイプのいかなるものでも試験することができる。本発明のアンチセンス化合物の標的核酸発現における効果は、たとえば、PCRまたはノーザンプロット分析法を使用して日常的に測定することができる。細胞ラインは、通常組織および細胞タイプの両方から、および種々の障害(たとえば、過剰増殖性障害)と関連する細胞から、誘導される。複数の組織および種から誘導される細胞ラインは、それぞれ、たとえば、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC, Manassas, VA)、日本癌研究資源銀行(東京, 日本)または応用微生物学研究センター(Wiltshire, United Kingdom)から得られる。

#### 【0083】

第一細胞、動物から分離され、連続培養を受けていないこれらの細胞は、当該分野で公知の方法に従って生成することができ、あるいは種々の商業的供給者より得ることができる。さらに、第一細胞は、臨床設定におけるヒトドナー対象(すなわち、献血者、手術患者)から得られたものも含む。第一細胞は、当該分野で公知の方法により生成してもよく、または商業上の供給者、たとえば、ステムセルテクノロジーズ；ゼン・バイオ社(Research Triangle Park, NC)；キャンブレックスバイオサイエンシーズ(Walkersville, MD)；インビトロテクノロジーズ(Baltimore, MD)；カスケードバイオロジーズ(Portland, OR)；アドバンスドバイオテクノロジーズ(Columbia, MD)から得ることもできる。

#### 【0084】

##### 細胞のタイプ

アンチセンス化合物の標的核酸発現における効果を以下の細胞の種類で試験した。

##### b. END :

マウス脳内皮細胞ラインb. ENDを、マックスプランク研究所(Bad Nauheim, Germany)のWerner Risau博士から得た。b. END細胞を、DMEM、10%ウシ胎児血清(インビトロジェンライフテクノロジーズ, Carlstadt, CA)を加えた高グルコース(インビトロジェンライフテクノロジーズ, Carlstadt, CA)中で、常法で培養した。約90%の集密度に達した時、細胞を、常法により、トリプシン処理および希釈によって継代させた。アンチセンス化合物トランスフェクション実験での使用のために、細胞を96-ウェルプレート(Falcon-Primaria #353872, BD Biosciences, Bedford, MA)に、密度約3000細胞/ウェルで接種した。

#### 【0085】

##### A549 :

ヒト肺がん細胞ラインA549を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Manassas, VA)から得た。A549細胞を、DMEM、10%ウシ胎児血清、100単位/mlのペニシリンおよび100マイクログラム/mlのストレプトマイシン(インビトロジェンライフテクノロジーズ, Carlstadt, CA)を加えた高グルコース(インビトロジェンライフテクノロジーズ, Carlstadt, CA)中、常法で培養した。約90%の集密度に達した時、細胞を、常法により、トリプシン処理および希釈によって継代させた。アンチセンス化合物トランスフェクション実験での使用のために、細胞を、96-ウェルプレート(Falcon-Primaria #3872)に、密度約50

10

20

30

40

50

00細胞 / ウェルで接種した。

【0086】

初代マウス肝細胞：

初代マウス肝細胞を、チャールスリバー研究所から購入したCD-1マウスから、常法により、調製した。初代マウス肝細胞を、常法で、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリノン/トレプトマイシン、1%抗生物質-抗有糸分裂薬(インビトロジエンライフテクノロジーズ, Carlsbad, CA)および10nMのウシインシュリン(シグマ-アルドリッヂ, St. Louis, MO)を加えた肝細胞添加培地で培養した。アンチセンス化合物トランスフェクション実験での使用のために、細胞を、0.1mg/mlコラーゲンを塗布した96-ウェルプレート(Falcon-Primaria #353872, BDバイオサイエンシーズ, Bedford, MA)に、密度約10,000細胞 / ウェルで接種した。10

【0087】

アンチセンス化合物での処理

細胞が適正な密集度に達した時、これらを、記載したトランスフェクション方法を使用して、オリゴヌクレオチドで処理した。当該分野で公知の別の適切なトランスフェクション試薬として、LIPOFECTAMINE(登録商標)、OLIGOFECTAMINE(登録商標)およびFUGENE(登録商標)が挙げられるが、これらに限定されない。当該分野で公知の別の適切なトランスフェクション方法として、電気穿孔法が挙げられるが、これに限定されない。20

【0088】

LIPOFECTIN(登録商標)

細胞が65~75%の集密度に達した時、これらを、オリゴヌクレオチドで処理した。Opti-MEM(登録商標)-1還元血清培地(インビトロジエンライフテクノロジーズ, Carlsbad, CA)中で、オリゴヌクレオチドをLIPOFECTIN(登録商標)(インビトロジエンライフテクノロジーズ, Carlsbad, CA)と混合し、100nMのオリゴヌクレオチド当たり、オリゴヌクレオチドの所望の濃度と、2.5または3μg/mlのLIPOFECTIN(登録商標)濃度を達成した。このトランスフェクション混合物を、室温で約0.5時間培養した。96-ウェルプレート中で成長した細胞に関し、ウェルを100μLのOPTI-MEM(登録商標)-1で1回洗浄し、次いで、130μLのトランスフェクション混合物で処理した。24-ウェルプレートあるいは別の基準組織培養プレート中で成長した細胞を、適正な容量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して、同様に処理する。細胞を処理し、データを2通りまたは3通り得る。37で約4~7時間の処理の後、トランスフェクション混合物を含む培地を、新しい培養培地に入れ替えた。オリゴヌクレオチド処理から16~24時間後、細胞を採取した。30

【0089】

CYTODECTIN(登録商標)

細胞が65~75%の集密度に達した時、これらを、オリゴヌクレオチドで処理した。Opti-MEM(登録商標)-1還元血清培地(インビトロジエンライフテクノロジーズ, Carlsbad, CA)中で、オリゴヌクレオチドをCYTODECTIN(登録商標)(ジーンセラピーシステムス, San Diego, CA)と混合し、100nMのオリゴヌクレオチド当たり、オリゴヌクレオチドの所望の濃度と、2または4μg/mlのCYTODECTIN(登録商標)濃度を達成した。このトランスフェクション混合物を室温で約0.5時間培養した。96-ウェルプレートで成長した細胞に関し、ウェルを100μLのOPTI-MEM(登録商標)-1で1回洗浄し、次いで、130μLのトランスフェクション混合物で処理した。24-ウェルプレートあるいは別の基準組織培養プレート中で成長した細胞を、適正な用量の培地およびオリゴヌクレオチドを使用して、同様に処理する。細胞を処理し、データを2通りまたは3通り得る。37で4~7時間の処理の後、トランスフェクション混合物を含む培地を、新しい培養培地に入れ替えた4050

。オリゴヌクレオチド処理から16～24時間後、細胞を採取した。

【0090】

コントロールオリゴヌクレオチド

コントロールオリゴヌクレオチドを、特定の細胞ラインに関する最適アンチセンス化合物濃度を測定するために使用する。さらに、本発明のアンチセンス化合物を、アンチセンス化合物スクリーニング実験または表現型アッセイで試験する場合、コントロールオリゴヌクレオチドを、本発明の化合物と並行して試験する。

【0091】

使用されるオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞ラインにより様々である。特定の細胞ラインに関する最適オリゴヌクレオチド濃度を測定するために、細胞を、濃度の範囲で、陽性コントロールオリゴヌクレオチドで処理する。次いで、標的mRNAの80%抑制となる陽性コントロールオリゴヌクレオチドの濃度を、その細胞ラインの後続試験において、新しいオリゴヌクレオチドのスクリーニング濃度として利用する。80%抑制が達成されなかった場合、標的mRNAの60%抑制となる陽性コントロールオリゴヌクレオチドの最低濃度を、その細胞ラインの後続試験において、オリゴヌクレオチドスクリーニング濃度として利用する。60%抑制が達成されなかった場合、その特定の細胞ラインは、オリゴヌクレオチドトランスフェクション試験には不適切であると判断する。コントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドISI8078(GTGC GCG CAG C C CGA AATC, 配列番号19として本明細書に組み込まれる)は、2'-デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、前記領域は、その両側(5'および3')が「ウィング」で挟まれている、キメラオリゴヌクレオチドである。前記ウィングは、2'-MOEヌクレオチドとしても知られている、2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで構成されている。ISI8078は、5'側に5'-ヌクレオチドウイングが隣接し、3'側に6'-ヌクレオチドが隣接する9'-ヌクレオチドギャップ領域を有する。これは、ヒトJunのN-末端キナーゼ-2に標的され、発現の調整をアッセイする際、陽性または陰性コントロールとして使用してもよい。

10

20

30

40

【0092】

実施例2

ACC1またはACC2のmRNA濃度のリアルタイム定量的PCR分析

ACC1またはACC2のmRNA濃度の定量化は、リアルタイム定量的PCRにより、ABI PRISM(登録商標)7600、7700または7900配列検出システム(PE-アプライドバイオシステムズ, Foster City, CA)を使用し、製造者の指示書に従って行った。

30

【0093】

リアルタイムPCRで用いるプローブおよびプライマーは、標的特異的配列をハイブリダイゼーションするように設計された。プライマーの方法およびプローブ設計は、当該分野で公知である。リアルタイムPCRで使用されるプライマーおよびプローブの設計は、市販のソフトウェア、たとえば、Primer Express(登録商標)、PEアプライドバイオシステムズ, Foster City, CAを使用して、行うことができる。

【0094】

定量的PCR分析の前に、測定される標的遺伝子に特異的なプライマー-プローブセットを、その「多重化される」能力に関して、GAPDH增幅反応で評価した。分離した後、RNAを、逐次逆転写酵素(RT)反応およびリアルタイムPCRに供する。両試験とも同じウェル中で行う。RTおよびPCR試薬は、インビトロジェンライフテクノロジーズ(Carlsbad, CA)から得た。RT、リアルタイムPCRを、20μLのPCR混合物(2.5×PCR緩衝-MgCl<sub>2</sub>、6.6mMのMgCl<sub>2</sub>、dATP、dCTP、dCTPおよびdTTPがそれぞれ375μM、フォワードプライマーおよびリバースプライマーがそれぞれ375nM、125nMのプローブ、4単位のRNアーゼ抑制剤、1.25単位のPLATINUM(登録商標)Taq、5単位のMuLV逆転写酵素

50

および $2.5 \times$ ROX色素)を、 $30 \mu\text{L}$ の総RNA溶液(20~200ng)を含む96-ウェルプレートに添加することによって、同様に行つた。RT反応を、48で30分培養することによって行つた。95で10分培養し、PLATINUM(登録商標)Taqを活性化した後、2ステップPCRプロトコルを、95で15秒(変性)次いで60で1.5分(アニーリング/伸長)のサイクルで、40サイクル行つた。

#### 【0095】

RT、リアルタイムPCRによって得られた遺伝子標的定量値は、GAPDH、発現が一定の遺伝子の発現レベルを使用することによって、あるいはRibogreen(登録商標)(モレキュラープローブス社,Eugene,OR)を使用して、総RNAを定量することによって、正規化した。GAPDH発現は、RT、リアルタイムPCRによって、標的と同時に走査し、多重化または分離してその定量化がおこなわれた。総RNAは、Ribogreen(登録商標)RNA定量試薬(モレキュラープローブス社,Eugene,OR)を使用して定量した。

10

#### 【0096】

$170 \mu\text{L}$ のRibogreen(登録商標)作用試薬( $10 \text{ mM}$ のトリスHClおよび $1 \text{ mM}$ のEDTA(pH 7.5)中、 $1:350$ に希釈されたRibogreen(登録商標)試薬)を、 $30 \mu\text{L}$ の精製細胞RNAを含む96-ウェルプレートにピペットを入れた。前記プレートをCytoFluor 4000(PEアプライドバイオシステムズ)を用い、励起 $485 \text{ nm}$ および放射 $530 \text{ nm}$ で読んだ。

20

#### 【0097】

GAPDH PCRプローブは、5'末端に共有結合するJOEと、3'末端に共有結合するTAMRAまたはMGBを有する。ここで、JOEは、蛍光レポーター(reporter)色素であり、TAMRAまたはMGBはクエンチャーカラー色素である。いくつかの細胞タイプでは、異なる種からのGAPDH配列に設計されたプライマーおよびプローブを、GAPDH発現を測定するために使用する。たとえば、ヒトGAPDHプライマーおよびプローブセットを、サル由来細胞および細胞ラインにおけるGAPDH発現を測定するために、使用してもよい。

20

#### 【0098】

##### 実施例3

###### ヒトACC1発現のアンチセンス減少

30

一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、表1に挙げた公開された配列を用い、ヒトACC1の異なる領域を標的にするよう設計した。化合物を表2に示す。表2の全化合物は、10個の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側(5'および3')が5'-ヌクレオチド「ウイング」で挟まれている、長さ20ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)である。ウイングは、2'-MOEヌクレオチドとしても知られている、2'-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格)間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5'-メチルシチジンである。化合物を、遺伝子標的mRNA濃度に関するそれらの効果に関して、本明細書の別の実施例で記載した定量リアルタイムPCRにより、ヒトACC1をハイブリダイゼーションするように設計された、以下のプライマー-プローブセットを使用して、分析した。

40

フォワードプライマー：GGATGGTGTTCACTCGGTAAATAGA(配列番号20として本明細書に組み込まれる)

リバースプライマー：GGGTGATATG TGCTGC GTC AT(配列番号21として本明細書に組み込まれる)

および、PCRプローブは、FAM-CATCAGCAGAGACTACGTCC TCA AG CAAATC-TAMRA(配列番号22として本明細書に組み込まれる)である。ここで、FAMは蛍光色素であり、TAMRAはクエンチャーカラー色素である。

#### 【0099】

A549細胞を、LIPOFECTIN(登録商標)を使用し、 $70 \text{ nM}$ の開示された

50

アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した。発現の減少を表2に、%抑制として示す。  
「N.D.」とある場合は、これは測定できないことを示す。コントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号19を使用した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドが抑制性のある標的領域を、本明細書では、「有効な標的セグメント」と言う。

## 【0100】

表2

2'-MOE ウィングおよびデオキシギャップを有するキメラオリゴヌクレオチドによるヒトACC1 mRNA濃度の減少

## 【0101】

## 【表2-1】

10

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	%抑制	配列番号
366558	1	848	ACGAGTATTCAAAGTCTTA	46	23
366491	2	501	ACCACATCCTCTCATCATTG	17	24
366492	2	506	AGACCACCATCCCTCTCAT	8	25
366493	2	542	CCAGAAAGACCTAGCCCTCA	5	26

## 【0102】

【表2-2】

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	%抑制	配列番号
366494	2	1369	ATACCTGCAGTTGAGCCAC	80	27
366495	2	1597	GGGAAGTCATCTGCATTGT	10	28
366496	2	1816	ATGTGTTCAAATACTGCTGG	55	29
366497	2	1821	GTTCCATGTGTTCAAATACT	59	30
366498	2	1970	GACATCAGGCCACCATCTTG	57	31
366499	2	2007	TCCCCATGGCAATCTGGAGC	83	32
366500	2	2053	GATACCCATACATCATACG	28	33
366501	2	2266	TCAGCAAATTATGAAAGTCC	69	34
366502	2	2271	GAGAATCAGCAAATTATGAA	56	35
366503	2	2362	TCACCCCGAATAGACAGCTC	75	36
366504	2	2367	GAAAGTCACCCCGAATAGAC	50	37
366505	2	2372	AGTCGAAAGTCACCCCGAA	71	38
366506	2	2593	GCAGGAAGGACTTGACCCCT	64	39
366507	2	2635	TCATAGATAAGTTCAACATC	14	40
366508	2	2830	GTTTTATTGCCAATTGTGAT	71	41
366509	2	2835	CACAGGTTTATTGCCAATT	83	42
366510	2	3214	GGAAGGCAGTATCCATTATC	60	43
366511	2	3379	TACTGAGCCATTCTCTTCTT	67	44
366512	2	3384	TAGCATACTGAGCCATTCTC	83	45
366513	2	3575	CAGATCCATCACACAGCCT	67	46
366514	2	3643	AGGGCGAATAACACATTGTC	64	47
366515	2	3748	AACTGATCAATAAGCATTGT	32	48
366516	2	3908	CTCTACTTGGITATGGCGAA	71	49
366517	2	3967	TGCAGGTTCTCAATGCAAAA	68	50
366518	2	3972	GTTCCTGCAGGTTCTCAATG	73	51
366519	2	3977	GATGAGTTCTGCAGGTTCT	67	52
366520	2	4129	GTGTTGTCCTTAAGCTGGCG	66	53
366521	2	4261	TCGCTGACACTAGCTACATG	85	54
366522	2	4492	TCAGTCTGATAGCCACATT	65	55
366523	2	4662	GGAATTCTCTATGAAATCTC	63	56
366524	2	4699	TCAAACATTATCCCTGCTCG	75	57
366525	2	4772	AAAAATTCTCATCCGGITCA	55	58
366526	2	4777	AGGTCAAAATTCTCATCCG	71	59
366527	2	5069	AATCTTGTGGATGGCCATGA	53	60
366528	2	5151	TGATTTCTGAGTTCTGCCTGG	61	61
366529	2	5156	AATGTTGATTTCTGAGTTCTG	53	62
366530	2	5204	TGTCAGGAAGAGGGCGATGG	51	63
366531	2	5214	CAGACTCGTTGTCAGGAAG	83	64
366532	2	5317	ATTCCATGCAGTGGCTCTG	84	65
366533	2	5424	GCCGAAACATCTCTGGGATA	71	66
366534	2	5953	GTATCTGTACCTGGATTG	73	67
366535	2	6103	CGGACAAGGTAAAGCCCCAAT	75	68
366536	2	6108	CCAGCCGGACAAGGTAAAGCC	82	69
366537	2	6133	TTCTCAACCTGGATGGTTCT	69	70
366538	2	6385	GGAACAAACTCGATGATTCT	66	71
366539	2	6390	TTGTGGGAACAAACTCGATG	60	72
366540	2	6440	GGTTGGGTGAGGACGGCCTG	42	73
366541	2	6580	GTTCGGTTCTACAGCAAC	82	74
366542	2	7014	TGGTTTCACCAGATCTT	76	75
366543	2	7019	ACGCATGGTTTCACCAAGAT	83	76
366544	2	7175	GTGCAAGTCAGCAAATGCA	54	77
366545	2	7180	GTGTCGTGCAAGTCAGCAAA	61	78

【表2-3】

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	%抑制	配列番号
366546	2	7300	ATTTTCTCTTGACCAGGTC	39	79
366547	2	7655	AAGCTCTCCTACGTGGAAG	61	80
366548	2	8964	CTAGTTGTTGAAAGTAAACT	47	81
366549	2	9496	GATTGATTTATTGCAAAAA	21	82
366550	2	9512	ACTTGTAGATATGIGGGATT	27	83
366551	2	9958	GTAGAGGTTTATTCAACAA	79	84
366552	4	109	CCAGAAAGACCTCAGGGTGG	79	85
366553	5	252	CTATAGTCTTTGTCTAAT	24	86
366554	5	479	CATGCTGGACCTTGAAGCA	5	87
366555	6	479	ATTCAAAGTCTTGAAGCA	6	88
366556	6	592	GACATGCTGGACCTGAAAAA	39	89
366557	6	599	CAAGCCAGACATGCTGGACC	73	90
338246	6	3313	ACCACAGCCTTCATGTGGCC	79	91
366482	7	51352	CTCACCTCACCTCAGGGTGG	48	92
366483	7	109758	AAATGACCTGGAGCATAGAT	48	93
366484	7	111089	TAACACTTACCTTGAAGCA	0	94
366485	7	120863	ATTTCAAAGTCTGAGGATAC	46	95
366486	7	120974	GTACCCACACCTGAAAATC	37	96
366487	7	157787	CTTCAGCATCTGGTAGATAC	63	97
366488	7	248329	CCATGCCAATCTGGAAAGGC	77	98
366489	7	275126	GATGGAACCAGGACCTATGT	54	99
366490	7	300424	GCTCTCTGCTCTGCTAG	64	100

好みいオリゴヌクレオチドおよび標的領域は、ACC1において少なくとも約50%減少をもたらすために十分に活性であったものである。少なくとも約70%までACC1を減少させたオリゴヌクレオチドが特に好みい。

## 【0104】

好みい有効標的セグメントは、配列番号7のヌクレオチド248329~248348、配列番号6のヌクレオチド599~618および3313~3322、ならびに配列番号4のヌクレオチド109~128を含む。また、好みい有効標的セグメントは、配列番号2のヌクレオチド1369~1388、2007~2026、2266~2285、2362~2381、2372~2391、2830~2849、2835~2854、3379~3398、3384~3403、3575~3594、3908~3927、3967~3986、3972~3991、3977~3996、4129~4148、4261~4280、4492~4511、4699~4718、4777~4796、5214~5233、5317~5336、5424~5443、5953~5972、6103~6122、6108~6127、6133~6152、6385~6404、6580~6599、7014~7033、7019~7038および9958~9977も含む。

## 【0105】

「活性標的セグメント」は、表中の活性があり有効な標的セグメントの任意の2つによって結合されうることが理解される。適切な標的領域は、配列番号2のヌクレオチド5214~6152の領域である。この領域内で設計された7個のオリゴヌクレオチドは全て、少なくとも約70%の減少をもたらした。また、5214~6152標的領域の境界内に含まれる活性オリゴヌクレオチドによって規定される標的領域が適切である。

## 【0106】

## 実施例4

## ヒトACC2発現のアンチセンス減少

一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、表1に挙げた公開された配列を用い、ヒトACC2の異なる領域を標的にするよう設計した。化合物を表3に示す。表3の全化合物

10

20

30

40

50

は、10個の2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側(5'および3')が5'-ヌクレオチド「ウイング」で挟まれている、長さ20ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)である。ウイングは、2' - M O E ヌクレオチドとしても知られている、2' - O - (2'-メトキシエチル)ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格)間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5'-メチルシチジンである。化合物を、遺伝子標的mRNA濃度に関するそれらの効果に関して、本明細書の別の実施例で記載した定量リアルタイムPCRにより、ヒトACC2をハイブリダイゼーションするように設計された、以下のプライマー-プローブセットを使用して、分析した。

フォワードプライマー：C G T G C C C A T C A G C A T C A C (配列番号105として  
本明細書に組み入れられる) 10

リバースプライマー：G A A G G C T A C C A T G G C T C C C (配列番号106として  
本明細書に組み入れられる)

およびPCRプローブは、

F A M - C C C T G A C C T G C T G A G G C A C A G C A - T A M R A (配列番号10  
7として本明細書に組み入れられる)である。ここで、F A Mは蛍光色素であり、T A M  
R Aはクエンチャーカラーである。

#### 【0107】

A549細胞を、LIPOFECTIN(登録商標)を使用し、70nMの開示されたアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した。「標的部位」は、アンチセンス化合物が設計されていることを示すACC2標的配列上の最も5'位よりの部位を言う。発現の減少を表3に、%抑制として示す。「N.D.」とある場合は、これは測定できないことを示す。コントロールアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号19を使用した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドが抑制性のある標的領域を、本明細書では、「有効な標的セグメント」と言う。

#### 【0108】

表3

2' - M O E ウイングおよびデオキシギャップを持つキメラオリゴヌクレオチドによるヒトACC2の減少

#### 【0109】

20

20

30

【表3-1】

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	ACC2 mRNA の%抑制	配列番号
366437	9	1	AGACAAAGAAGCAAGACCAT	0	108
366438	9	50	CCAGATTITTAACCAGGAAA	10	109
366439	9	55	TTCCCCCAGATTTTAACCA	21	110
366440	9	468	TCATCAGCTGCCTCTTGATG	20	111
366441	9	844	CGGAACATCTCATAGGCCA	59	112
366442	9	1009	GGGATTCTCTGGCAATGTC	0	113
366443	9	1124	GGCCCACATGGCCTCACTGG	46	114
366444	9	1456	ATGAGAAAGATGGCGAGCC	42	115
366445	9	1461	GCTTCATGAGAAAGATGGGC	47	116
366446	9	1466	GGCCAGCTTCATGAGAAAGA	26	117
366447	9	1754	GCAGGGATGTTCCACCTGCA	26	118
366448	9	1816	GGCACGCCATGGCGATCTG	43	119
366449	9	1930	GCAATGACGTGGCCTCGGGC	41	120
366450	9	1958	GTCTGGTTTTCGCTGGTGA	48	121
366451	9	2036	GCTGAAGTAACCCACACGT	40	122
366452	9	2041	GCCACGCTGAAGTAACCCCA	46	123
366453	9	2224	TCTGGAAAGCTCTCGGTCTC	51	124
366454	9	2229	CGTTGTTCTGGAAGCTCTCG	59	125
366455	9	2423	ATCTACGAGGTTCAGTAGTG	63	126
366456	9	2474	CTGCCGGGCCACCTTGAGAA	46	127
366457	9	2781	GGGTCATGATCATTTCATC	56	128
366458	9	2786	GTTCAAGGTTCATGATCATCT	68	129
366459	9	2818	TTGATGTACTTCACCCGGCC	68	130
366460	9	3130	GCCACGCTGGTCATGATCTC	43	131
366461	9	3181	TGGGCCATCACCTGCGGAC	53	132
366462	9	3247	TCCAGGATGGTGGCTATCTG	45	133

【0 1 1 0】

10

20

【表3-2】

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	ACC2 mRNA の%抑制	配列番号
366463	9	3252	GGCAGTCCAGGATGGTGGCT	49	134
366464	9	3341	GCTGCGGTATCTCTGGACCA	39	135
366465	9	3421	GCTTGCTGAAAATGGTGCTC	56	136
366466	9	3426	AGTGGGCTTGTGAAAATGG	29	137
366467	9	3529	AGCTGGTTCTTCTGGCAC	63	138
366468	9	3534	TCACCAGCTGGTCTTCTG	70	139
366469	9	3565	TCTGGGCCACACAGCTCATC	62	140
366470	9	3754	AACTGGTGGCCGTACATGTC	30	141
366471	9	3759	GGCAGAACTGGTGGCCGTAC	54	142
366472	9	4438	TCTTCTGCAAACATCATCT	0	143
366473	9	4481	CAGCTGGAAGGCCAGGGCAG	63	144
366474	9	4534	TGGTGGCACAGGGCACGGC	67	145
366475	9	4653	AGGAGGCTTCCTTGTGATC	14	146
366476	9	5083	AGATCCTTGGTGACGTAGGG	29	147
366477	9	5088	GGAGCAGATCCTTGGTGACG	48	148
366478	9	5172	GTAAAGAGAGGCCTGCCTG	57	149
366479	9	5913	TGTTGGATGTGTAGACCTCT	55	150
366480	9	6933	CCAGGATGTCAGATATGACG	34	151
366481	9	7237	ACCAGGCCCTGGATGGTCTT	8	152
366435	10	87	CACGGTCATCAGTCAACAAAC	0	153
366436	10	3680	GCTCGGAACCAGTAGCCCCCTG	30	154
361119	12	2602	TCAACCTCTCCCTCATGTA	45	155
189530	12	3579	AGAAGATGCAGTCCAGCACC	35	156
189531	12	3775	TGCCGCAGCTCGTAGGAGGG	64	157
189537	12	3992	CCGGTGCCTGCAGGCTGTITA	48	158
189541	12	5046	AGAGGCTGATGTCCAGGTAG	63	159
189542	12	5242	AAGAGAGCCTGCCTGAACAT	23	160
189543	12	5252	CCACAGTTAAAGAGAGCCT	49	161
189544	12	5257	GAGCCCCACAGTTAAAGAG	54	162
189545	12	5338	CGGTTCATCTCCACCAGCTG	63	163
189548	12	5375	GAAGGCCACCATGCCAACCT	45	164
189549	12	5380	ATTTGAAGGCCACCATGCC	16	165
189550	12	5385	ACCTCATTTGAAGGCCACC	64	166
189553	12	5614	TCTGGTCCACCCAAGCCAC	65	167
189557	12	5963	CAGGACCTTGTGAGAGCAC	37	168
189558	12	5968	CTTCCCAGGACCTTGTGAG	36	169
189559	12	5973	CCTCTCTCCAGGACCTTG	31	170
189560	12	5980	GTGTAGACCTCTCTCCCAG	49	171
189566	12	6229	TTCAGAGTTGGGTGAGGCCT	26	172
189571	12	6280	ATGATTCCCTGAAAATGCC	43	173
189572	12	6285	GTGCCATGATTCCCTGAAA	54	174
189573	12	6290	CCAGGGTGCCATGATTCCCT	52	175
189574	12	6358	GTCTCCACAGCAATCACTCC	25	176
189575	12	6727	CTCTCTTGTCTGCATACAT	29	177
189576	12	6732	CCCTGCTCTCTTGTCTGCA	50	178
189589	12	7301	GATGGTCTGAGGACAGAGT	12	179
366429	13	27846	CATGCTCGGCCTGCAGAATA	14	180
366430	13	62687	AGCCACATACCGGGGTGGACT	50	181
366431	13	80821	CACTTGGAGAGTCCTCTC	47	182
366432	13	93058	TCAGCACAGCAGGCCACCA	34	183
366433	13	121050	CCCAGGCACCCCTACATGAAA	43	184
366434	13	125943	GGCTCAGGGAGGAGAAGGCA	25	185

好みいオリゴヌクレオチドおよび標的領域は、ACC2において少なくとも約50%

10

20

30

40

50

減少をもたらすために十分に活性であったものである。少なくとも約60%までまたはそれ以上ACC2を減少させたオリゴヌクレオチドが特に好ましい。

#### 【0111】

好ましい有効な標的セグメントは、配列番号9のヌクレオチド844～863、222  
9～2248、2423～2442、2781～2800、2786～2805、281  
8～2837、3421～3440、3529～3548、3534～3553、356  
5～3584、4481～4500、4534～4553、5172～5191および5  
913～5932を含む。また、好ましい有効な標的セグメントは、配列番号12の37  
75～3794、5046～5065、5338～5357、5385～5404、56  
14～5633も含む。

10

#### 【0112】

「活性標的セグメント」は、表中の活性があり有効な標的セグメントの任意の2つによって結合されうることが理解される。配列番号9の適切な標的セグメントは、ヌクレオチド2229～2442、ヌクレオチド2786～2837、ヌクレオチド3529～35  
84およびヌクレオチド4481～4553を含む。また、配列番号12のヌクレオチド  
5385～5633の領域が適切である。

#### 【0113】

##### 実施例5

ACC1およびACC2の発現のアンチセンス減少：C57BL/6マウスにおけるインピボ試験

20

本発明のさらなる実施形態において、アンチセンス化合物は、公開された配列を使用して、マウスACC1またはACC2を標的にするよう設計され、本明細書で記載した方法を使用して、b.END細胞または初代マウス肝細胞中、インピトロでスクリーニングされた。使用したプライマー-プローブセットは、マウスACC1またはACC2にハイブリダイゼーションするように設計された。以下がマウスACC2に関するプライマー-プローブセットである。

フォワードプライマー：AGGTGCTCATCGCCAAACA（配列番号269として本明細書に組込まれる）

リバースプライマー：CCAGCGGCCGGATGGA（配列番号270として本明細書に組込まれる）

30

PCRプローブ：

FAM-CATCGCTGCGGTCAAGTGTATGCG-TAMRA（配列番号271として本明細書に組込まれる）、ここで、FAMは蛍光色素であり、TAMRAはクエンチャーカラムである。

30

#### 【0114】

以下が、マウスACC2に関する他のプライマー-プローブである。

フォワードプライマー：GGGCTCCCTGGATGACAA（配列番号272として本明細書に組込まれる）

40

リバースプライマー：TTCCGGAGGAGTTCTGGA（配列番号273として本明細書に組込まれる）

40

PCRプローブ：

FAM-CTCTGATGAGGACCCTAGTGCGCG-TAMRA（配列番号274として本明細書に組込まれる）、

ここで、FAMは蛍光色素であり、TAMRAはクエンチャーカラムである。

50

#### 【0115】

以下が、マウスACC1に関するプライマー-プローブである。

フォワードプライマー：CTGGCTGCATCCATTATGTC（配列番号275として本明細書に組込まれる）

50

リバースプライマー：GGGTTGTCCTCAGTTGCAATTGG（配列番号276として本明細書に組込まれる）

P C R プローブ :

F A M - C T G G A G C A G C A C T T G A C C C T G G C - T A M R A (配列番号 277として本明細書に組込まれる)、ここで、F A Mは蛍光色素であり、T A M R Aはクエンチャーカラムである。

【 0 1 1 6 】

数種の活性化合物がマウスにおけるさらなる検討のために選ばれた。

【 0 1 1 7 】

雄 C 5 7 B 1 / 6 マウスに脂肪含有量が約 4 % の食餌を給餌し、表 4 に示すオリゴヌクレオチドを用量 1 0 0 m g / k g で 1 週間に 1 回の割合で 2 週間、皮下注射した。表 4 に、各オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列、標的とする核酸の配列番号、およびオリゴヌクレオチドが相補的である示された配列番号における、最も 5' 位よりの標的部位を示す。使用したオリゴヌクレオチドの配列を表 4 に示す。使用したアンチセンスオリゴヌクレオチドは、10 個の 2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域から構成され、両側(5' および 3')が、5' - ヌクレオチド「ウイング」で挟まれている、長さ 20 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)である。ウイングは、2' - M O E ヌクレオチドとしても知られている、2' - O - (2' - メトキシエチル)ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格)間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5' - メチルシチジンである。

【 0 1 1 8 】

表 4

【 0 1 1 9 】

【 表 4 】

標的配列番号	標的部位	配列(5' から 3')	配列番号
8	5010	TCCATAGCGCATTACCATGC	186
8	5150	TCCTTATAACAGGCTGATGTC	187
17	6170	TTCCTTGAAACTGCCATGGT	188
17	223	GAGITCCTCTGCTGACTGGC	189
8	5132	TCCAAGTAGTAGCCAGACTC	190
8	5648	CGTGGGATGCCTTCTGCTCT	191
12	3579	AGAAGATGCAGTCCAGCACC	192

生理食塩水を注射された動物を、コントロールとして使用する。各処置グループは 5 匹の動物で構成されていた。処置期間の後、マウスを殺処分し、肝臓および脂肪中の標的濃度を評価した。R N A 分離および標的 m R N A 発現レベル定量を、本明細書の別の実施例で記載した R I B O G R E E N (登録商標)を使用して行う。各処置グループの結果を、生理食塩水で処理したコントロールと比較した、標的(A C C 1 または A C C 2) m R N A の % 抑制として表 5 に示す。

【 0 1 2 0 】

表 5

アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理されたマウスの組織内の A C C 1 または A C C 2 の減少

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

【表5】

配列番号	ACC1の%抑制		ACC2の%抑制	
	肝臓	脂肪	肝臓	脂肪
186	83	91	0	9
187	61	88	12	46
188	14	74	42	62
189	0	59	92	83
190	63	87	21	57
191	68	91	28	57
192	1	75	55	76

10

表5に示すように、配列番号186および190を有するオリゴヌクレオチドは、ACC2濃度よりACC1濃度においてより大きな減少をもたらした。配列番号189および188の配列を有するオリゴヌクレオチドは、ACC1濃度よりACC2濃度においてより大きな減少をもたらした。配列番号190および191は、ACC1およびACC2の両方の濃度において、減少をもたらし、一方、配列番号192は、脂肪において、ACC1およびACC2の両方の濃度で類似の減少をもたらした。

## 【0122】

グルコース代謝における標的抑制の効果を、本発明のアンチセンス化合物で処理したマウスについて評価した。血漿グルコースを、処置の開始時と、処置の2週間後に測定した。結果を、各処置グループに関し、平均血漿グルコース濃度として、表6に示す。グルコース濃度は、通常の臨床方法、たとえばYSIグルコース分析器(YSIサイエンティフィック, Yelllow Springs, OH)を使用して測定した。

20

## 【0123】

表6

C57BL/6マウス中の血漿グルコース濃度におけるACC1またはACC2減少の効果

## 【0124】

## 【表6】

配列番号	血漿グルコース (mg/dL)	
	第0週	第2週
n/a	196	186
186	209	192
187	221	196
188	215	203
189	212	188
190	200	215
191	213	154
192	196	158

30

表6に示すように、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、血漿グルコース濃度を減少させた。本発明の他の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物の血漿グルコースを低下させる方法である。

40

## 【0125】

## 実施例6

ACC2に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果：正常マウスにおけるインビオ評価

一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、表1に挙げた公開された配列を用い、ACC2の異なる領域を標的にするよう設計した。使用したオリゴヌクレオチドの配列を表7に示す。この実験で使用した全てのオリゴヌクレオチドは、10個の2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側(5' および3')が5'-ヌクレオチド「ウィング」で挟まれている、長さ20ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレ

50

オチド（「ギャップマー」）である。ウィングは、2' - M O E ヌクレオチドとしても知られている、2' - O - (2-メトキシエチル) ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド（骨格）間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5'-メチルシチジンである。化合物を、標準げっ歯類食餌で保たれた C 5 7 B 1 / 6 マウスにおける遺伝子標的 m R N A 濃度に関するそれらの効果について分析した。

## 【0126】

C 5 7 B 1 / 6 マウスに、表 7 に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを用量 1 0 0 mg / kg / 週間で、3 週間毎週皮下注射した。生理食塩水を注射した動物をコントロールとして用いた。各処置グループは 5 匹の動物で構成されていた。処置期間の後、マウスを殺処分し、肝臓中の標的濃度を評価した。R N A 分離および標的 m R N A 発現レベル定量を、本明細書の別の実施例で記載したように行う。各処置グループの結果を、生理食塩水で処理したコントロールに対する測定した標的 (A C C 1 または A C C 2) m R N A の % 抑制として表 7 に示す。「標的部位」は、アンチセンス化合物が設計された、示された A C C 2 標的配列上の最も 5' 位よりの部位を言う。発現における減少を、% 抑制として表 7 に示す。

## 【0127】

表 7

2' - M O E ウィングおよびデオキシギャップを有するキメラオリゴヌクレオチドによるマウス A C C 2 またはマウス A C C 1 の減少 - インビボスクリーニング

## 【0128】

## 【表 7】

標的配列番号	標的部位	配列(5' から3')	ACC2 mRNA の%抑制	ACC1 mRNA の%抑制	配列番号
17	223	GAGTCCTCTGCTGACTGGC	55	91	189
17	1925	TGGGTITTCGCTGGTGATCC	45	77	193
17	1923	GGTTTCGCTGGTGATCCTG	25	70	194
17	2091	TGGCCTCTTCACGGTCTCG	25	64	195
17	2368	GCAGGGAGGGACCTGACCCCT	27	43	196
17	2557	TACGTAGTGTAACTGCTGCC	5	41	197
17	2575	TCAACCTCTTCCTTCATGTA	35	31	155
17	3097	ACACTGGTCATGATCTCCTG	38	54	198
17	3277	TGTGTGTTCATGAAGAAGAC	35	69	199
17	3341	CACCAACAGCTTCATGTAGC	44	26	200
17	3921	GGAACCTCACCAACACAGGTG	0	0	201
18	54021	GGCAGCATGAACTGGAACTC	7	5	202
17	4726	ATGTGGITGCAGTCAGTGC	54	61	203
17	4738	AAGTTGAGGAAGATGTGGTT	7	0	204
17	4747	GTGGGCACAAAGTTGAGGAA	67	71	205
17	4762	GGGTCCATGATGACTGTGGG	0	58	206
17	4927	AGGTAGTAGCCAGACTCGTT	68	75	207
17	5336	GATGTCATTGCCGATGACAA	26	0	208
18	30804	GAAGCTGCCATCCTGGCTGT	70	3	209
17	1932	CCTCATCTGGGTTTCGCTG	84	88	210
17	2071	CCCCAGGAGAAGCAGTGC	80	42	211

表 7 に示されるように、A C C 1 または A C C 2 に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、A C C 1 、A C C 2 または A C C 1 および A C C 2 の両方の発現を減少させることができる。標的 m R N A の抑制に起因する生理学的効果を評価するために、マウスを、処置期間の終了時に、血漿トリグリセリド、血漿コレステロールおよび血漿トランスアミナーゼ濃度に関してさらに評価した。トリグリセリド (T R I G ) およびコレステロール (C H O L ) を、実験の開始時 (第 0 週) と試験終了時 (第 3 週) に、通常の臨床分

10

20

30

40

50

析装置（たとえば、Olympus 臨床アナライザー，Melville, NY）によつて測定した。グルコース濃度を、グルコースアナライザー、たとえば、YSI グルコースアナライザー（YSI サイエンティフィック，Yellow Springs, OH）を使用して測定した。各処置グループに関し、平均血漿グルコース濃度を表 8 に mg / dL で示す。測定結果を表 8 に、処置グループごとに平均濃度として示す。コレステロールとトリグリセリド濃度を mg / dL で示す。

## 【0129】

表 8

血漿トリグリセリド、コレステロールにおける ACC2 に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

10

## 【0130】

## 【表 8 - 1】

配列番号	血漿グルコース		トリグリセリド		コレステロール	
	第0週	第3週	第0週	第3週	第0週	第3週
n/a	177	176	118	79	89	75
193	194	184	113	113	92	95
194	186	172	129	127	90	89
195	185	176	119	124	97	90
196	189	191	114	155	87	99
197	198	173	90	174	94	89
155	164	176	100	106	97	95
198	171	183	108	116	104	88
199	179	179	143	85	102	108
200	170	181	123	118	98	94
201	192	183	129	121	90	95
202	185	172	97	100	87	67

## 【0131】

## 【表 8 - 2】

配列番号	血漿グルコース		トリグリセリド		コレステロール	
	第0週	第3週	第0週	第3週	第0週	第3週
203	215	174	123	137	91	232
204	195	177	140	115	93	95
205	204	166	106	146	94	105
206	207	165	180	132	101	100
207	197	179	135	119	101	76
208	189	155	81	102	102	92
209	202	167	86	118	98	86
210	213	159	121	142	95	81
211	176	159	101	126	88	100
189	200	159	103	85	80	86

体重を、試験の間中モニターした。試験の間の体重の増加に関して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを受けた動物と生理食塩水で処理されたコントロール動物は同様であった。また、ひ臍、肝臍および脂肪組織の重さも試験の終了時にモニターした。生理食塩水で処理されたコントロール動物に関し、肝臍、脂肪およびひ臍の重さは、それぞれ、平均で、約 1 g、約 0.3 g および約 0.2 g であった。ACC2 に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された動物に関しては、肝臍、脂肪およびひ臍の重さは、それぞれ、約 1 ~ 3 g、約 0.1 ~ 0.4 g および約 0.1 ~ 0.2 g の範囲であった。

## 【0132】

## 実施例 7

30

40

50

A C C 1 および A C C 2 の発現のアンチセンス抑制効果：食事誘発性肥満のマウスモデルにおけるインビオ試験

雄 C 5 7 B L / 6 マウスに 12 週間 60 % 脂肪食餌を与え、その後、表 9 に記載したオリゴヌクレオチドを、50 mg / kg / 週の用量で、6 週間毎週皮下注射した。高脂肪食を与え、生理食塩水を注射した、またはスクランブルコントロールオリゴヌクレオチド I S I S 1 4 1 9 2 3 (C C T T C C C T G A A G G T T C C T C C 、配列番号 212 として本明細書に組込まれる) を注射した動物を、コントロールとして使用した。他のコントロールとして、通常の固体試料を与えられた動物に、同様に、生理食塩水を注射した。表 9 に示された I S I S 1 4 1 9 2 3 およびオリゴヌクレオチドは、10 個の 2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側(5' および 3') が 5'-ヌクレオチド「ウィング」で挟まれている、長さ 20 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」)である。ウィングは、2' - M O E ヌクレオチドとしても知られている、2' - O - (2-メトキシエチル) ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格) 間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたリチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5-メチルシチジンである。

10

20

【0133】

表 9

【0134】

【表 9】

標的配列番号	標的部位	配列(5' から 3')	配列番号
8	5010	TCCATAGCGCATTACCATGC	186
17	1925	TGGGTITTCGCTGGTGATCC	193
17	3277	TGTGTGTTCATGAAGAAGAC	199
17	4762	GGGTCCATGATGACTGTGGG	206
17	1932	CCTCATCTGGGTTTCGCTG	210
17	4927	AGGTAGTAGCCAGACTCGTT	207

各処置グループは、7 匹の動物で構成された。処置期間の後、マウスを殺処分し、肝臓の標的濃度を評価した。RNA 分離および標的 mRNA 発現レベル定量化は、本明細書の別の実施例で記載するように行う。表 10 に、各処置グループの結果を、コントロール(高脂肪を与え、生理食塩水で処理したコントロールから測定した標的 A C C 1 または A C C 2 mRNA)に対するパーセントとして示す。

30

【0135】

表 10

A C C 1 または A C C 2 に標的された、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された高脂肪供給マウスにおける A C C 1 または A C C 2 発現の減少

【0136】

【表 10】

40

配列番号	ACC1	ACC2
	%コントロール	
186	12	70
210	26	11
193	64	35
212	79	64
生理食塩水、通常の固体試料	87	114
199	46	9
206	68	42
207	31	43

50

表10に示されるように、ACC1またはACC2に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、インビボで、標的発現レベルを減少させる。

【0137】

前記試験中、体重および餌消費量をモニターした。各処置グループの累積餌消費量は、生理食塩水で処理した、高脂肪供給マウスと類似していた。試験の開始時（第0週）および終了時（第6週）に測定した各処置グループの平均体重を表11に示す。

【0138】

表11

アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した動物の体重

【0139】

【表11】

配列番号	体重(g)	
	第0週	第6週
生理食塩水、高脂肪供給	41	45
186	42	39
210	42	43
193	43	41
212	42	42
生理食塩水、通常の固形試料	27	28
199	37	37
206	38	36
207	38	37

また、試験終了時に、ひ臓、肝臓および精巣上体脂肪パッドの重さも測定した。脂肪パッドの重さは、生理食塩水で処理した高脂肪供給動物またはコントロールオリゴヌクレオチドISISSIONで処理した動物に比べて、ACC1またはACC2を標的するアンチセンス化合物で処理した動物において減少していた。総合すれば、これらの結果は、ACC1またはACC1およびACC2の両方のアンチセンス抑制は、食事誘発性肥満の動物モデルにおいて、体重または餌消費量を変化させることなく、脂肪パッド重の減少を引き起こすことを示している。したがって、本発明の別の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、過脂肪蓄積を減少させる方法、肥満を治療する方法、および動物における食事誘発性肥満を治療する方法を含む。

【0140】

標的mRNAの抑制に起因する生理的效果を評価するために、処置された食事誘発性肥満マウスの血漿トリグリセリド、血漿コレステロール、ならびに血漿HDLおよびLDLを、試験の開始時（第0週）、処置の第3週の間（第3週）、および処置の第5週の間（第5週）、さらに、測定した。血漿トリグリセリドおよびコレステロールは、常法的な臨床分析装置（たとえば、Olympus Clinical Analyzer, Melville, NY）によって測定した。各処置グループに関し、平均血漿トリグリセリド（TRIG）、コレステロール（CHOL）、LDLおよびHDL濃度を、表12にmg/dLで示す。

【0141】

表12

高脂肪食餌を与えられたマウスにおける、血漿脂質濃度に関する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

【0142】

10

20

30

40

【表12】

処置配列番号	TRIG			CHOL			HDL			LDL		
	第0週	第2週	第5週	第0週	第2週	第5週	第0週	第2週	Wk5	第0週	第2週	第5週
生理食塩水、高脂肪供給	99	93	86	185	182	181	148	146	152	20	23	26
186	94	101	80	184	162	65	150	130	51	19	18	11
210	112	128	99	198	170	160	157	130	126	21	26	26
193	107	101	83	184	179	178	144	142	146	19	21	24
212	124	83	99	196	192	193	157	158	167	21	21	20
生理食塩水、通常の固形試料	175	125	112	103	90	98	76	71	78	12	11	11
199	80	59	73	144	149	191	116	122	151	15	20	29
206	77	65	68	121	134	129	97	106	101	13	19	23
207	89	87	76	148	152	136	119	123	113	17	17	15

表12に示されるように、配列番号186および210の配列を有するオリゴヌクレオチドは、試験の間中、血漿コレステロール濃度の減少をもたらした。したがって、本発明の他の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物のコレステロール濃度を低下させる方法である。配列番号186を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、試験の間中、LDL濃度を減らす結果にもなった。したがって、本発明の他の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物のLDL濃度を低下させる方法である。

## 【0143】

組織のトリグリセリド濃度を、ロッシュダイグノスティックス(Indianapolis, IN)から入手したトリグリセリドGPOアッセイを使用して測定した。肝臓トリグリセリド濃度は、評価する肝臓脂肪症または肝臓中の脂質の蓄積を評価するために使用する。生理食塩水で処置され高脂肪を供給されたコントロール動物で測定した肝臓トリグリセリド濃度に正常化した場合、コントロールISI 141923での処置は、肝臓トリグリセリドを35%まで減少させ、通常の固形試料を与えられた、生理食塩水処置マウスは、肝臓トリグリセリドを高脂肪供給相当物より82%低下させた。配列番号186、210または193を有するオリゴヌクレオチドで処置された高脂肪供給動物は、それぞれ、67%、70%および46%の減少を示した。配列番号199、206または207での処置は、それぞれ、44%、46%または71%の減少をもたらした。したがって、ACC1およびACC2を減少させるアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、肝臓トリグリセリド含有量を減らす。本発明の別の実施形態は、肝臓トリグリセリドを低下させる方法、および本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物の肝臓脂肪症を改善させる方法を含む。

## 【0144】

また、グルコースおよびインシュリン代謝における標的抑制の効果も、本発明のアンチセンス化合物で処置された食事誘発性肥満マウスにおいて評価した。血漿グルコースを、処置の開始時、処置の2週間および5週間後に測定した。血漿インシュリンを、処置の開始時、処置の2週間後、5週間後に同様に測定した。

## 【0145】

グルコース負荷試験も行った。マウスに1g/kgのデキストロースの腹腔内注射し、血中グルコース濃度をグルコース投与前、および30分の間隔で2時間測定した。グルコース濃度は、グルコースアナライザー、たとえば、YSIグルコースアナライザー(YSIサイエンティフィック, Yellow Springs, OH)を使用して測定し、インシュリン濃度は、(Windham, NH)から得たAlpcoインシュリン-特異的ELISAキットを使用して測定した。グルコース代謝における変化を、血中グルコース濃度を各時間点でプロットし、作成した濃度曲線下面積と比較することによって、分析した。コントロールと比較して、処置グループに、濃度曲線下面積で実質的な違いは観察されず、すなわち、グルコース負荷は、ACC1またはACC2に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置により、改善も悪化もしなかった。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置された動物に関して、供給されたまたは絶食させたものの血中グルコース濃度に実質的な変化は観察されなかった。試験の間中、生理食塩水処置コントロール高脂

肪供給マウスにおいて、供給されたインシュリン濃度は、約4から6ng/mLに増加した。対照的に、配列番号186、210または193の配列番号の配列を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置では、試験の間中、インシュリン濃度の約4から3ng/mLへの減少がもたらされた。同様に、配列番号199または207を持つオリゴヌクレオチドによる処置では、インシュリン濃度の約3ng/mLから約1ng/mLへの減少がもたらされた。配列番号206の配列を持つオリゴヌクレオチドによる処置は、約5ng/mLから約1ng/mLへの減少をもたらした。したがって、本発明の他の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、血漿インシュリン濃度における減少として測定される、動物におけるインシュリン感応性を改善する方法である。

## 【0146】

10

身体組成を、試験の開始時（第0週）、治療の第3週の間（第3週）、および処置期間の終点（第6週）に、体脂肪量および脂肪なし重さのDEXAスキャン測定によって分析した。表13に各処置グループに関し、平均体脂肪率として結果を示す。

## 【0147】

表13

高脂肪食餌を与えられたマウスの身体組成

## 【0148】

## 【表13】

処置配列 番号	%体脂肪		
	第0週	第3週	第6週
生理食塩水、 高脂肪供給	39	42	42
186	39	38	29
210	39	38	35
193	39	38	33
212	40	39	37
生理食塩水、 通常の固形試料	17	15	15
199	32	32	28
206	32	28	22
207	32	31	28

20

表13に示されるように、ACC1にACC2標的されたオリゴヌクレオチドは、高脂肪供給において、体重を減少させる。本発明の他の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することにより、動物の過脂肪蓄積または体脂肪を減少させる方法である。

## 【0149】

30

## 実施例8

ACC1およびACC2の発現のアンチセンス減少の効果：ob/obマウスにおけるインビオ試験

レプチンは、食欲を調整する脂肪により產生されるホルモンである。ヒトおよび非ヒト動物の両方において、このホルモンの欠乏は肥満を招くが、ob/obマウスは、肥満および過血糖症となるレプチン遺伝子において突然変異を有する。このように、これらのマウスは、肥満および糖尿病について検討するため、およびこれらの状態を治療するべく設計された処置について検討するために、有用なモデルである。本発明によれば、本発明のアンチセンス化合物を、肥満および糖尿病のob/obモデルにおいて試験する。

40

## 【0150】

雄C57B1/6J-Lep ob/obマウス（ジャクソンラボラトリ、Bar Harbor, ME）に、表14に示す配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、50mg/kg/週の用量で6週間、毎週皮下注射した。使用したオリゴヌクレオチドは、10個の2'-デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側（5'および3'）が5'-ヌクレオチド「ウィング」で挟まれている、長さ20ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド（「ギャップマー」）である。ウィングは、2'

50

- M O E ヌクレオチドとしても知られている、2' - O - ( 2 - メトキシエチル ) ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格)間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5 - メチルシチジンである。

【 0 1 5 1 】

生理食塩水注射動物をコントロールとして使用した。各処置グループは 6 匹の動物で構成された。

【 0 1 5 2 】

表 1 4

【 0 1 5 3 】

【 表 1 4 】

10

標的配列番号	標的部位	配列 (5' から 3')	配列番号
8	5010	TCCATAGCGCATTACCATGC	186
17	1925	TGGGTTTCGCTGGTGATCC	193
17	1932	CCTCATCTGGGTTTCGCTG	210
17	4927	AGGTAGTAGCCAGACTCGTT	207

処置期間後、マウスを殺処分し、肝臓の標的濃度を評価した。K N A 分離および標的mRNA発現レベル定量化は、本明細書の別の実施例で記載されるように行う。表 1 5 に、各処置グループの結果を、生理食塩水処置コントロールに対するパーセントとして示す。

20

【 0 1 5 4 】

表 1 5

A C C 1 または A C C 2 に標的されたアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置された o b / o b マウスにおける A C C 1 または A C C 2 発現の抑制

【 0 1 5 5 】

【 表 1 5 】

配列番号	ACC1の%抑制	ACC2の%抑制
186	92	12
210	79	80
193	52	63
207	83	76

30

全処置グループに関して、本発明で記載したように測定した肝臓トリグリセリド濃度は、生理食塩水処置コントロール動物の濃度より低かった。配列番号 1 8 6 の核酸塩基配列を持つオリゴヌクレオチドによる処置は、生理食塩水処置コントロールと比べて、血漿コレステロールおよび L D L 濃度を減少させた。したがって、本発明のアンチセンス化合物のこれらの効果は、レプチン信号伝達とは関係なく得られる。本発明の実施形態は、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物の肝臓トリグリセリドを低下させる方法、本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物の肝臓脂肪症を改善する方法、および本発明のアンチセンス化合物を投与することによって、動物の血漿コレステロールまたは L D L 濃度を低下させる方法を含む。

40

【 0 1 5 6 】

実施例 9

ヒト A C C 1 に設計された 2' - M O E ウィングおよびデオキシギャップを持つキメラオリゴヌクレオチド

一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、表 1 に挙げた公開された配列を用いて、ヒト A C C 1 の異なる領域を標的にするよう設計した。前記オリゴヌクレオチドを表 1 6 に示す。表 1 6 の化合物は、全て、1 0 個の 2' - デオキシヌクレオチドからなる中央「ギャップ」領域で構成され、その両側(5' および 3')が 5 - ヌクレオチド「ウィング」で挟まれている、長さ 2 0 ヌクレオチドのキメラオリゴヌクレオチド(「ギャップマー」

50

)である。ウィングは、2' - MOEヌクレオチドとしても知られている、2' - O - (2 - メトキシエチル)ヌクレオチドで構成されている。ヌクレオシド(骨格)間結合は、オリゴヌクレオチド全域にわたりチオリン酸エステルである。全シチジン残基は、5 - メチルシチジンである。

## 【0157】

表16

ヒトACC1に設計された、2' - MOE ウィングおよびデオキシギャップを持つキメラオリゴヌクレオチド

## 【0158】

## 【表16-1】

10

20

30

40

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	配列番号
381739	2	655	GAGTGCTGGTTCAAGCTCCAG	213
381740	2	889	TCTATTTCTTCTGTCTCG	214
381741	2	910	ACAGTGAAATCTCGTTGAGA	215
381742	2	958	ATCACTTTATTCCCCAAA	216
381743	2	1006	ATGCATTCACTGCTGCAAT	217
381744	2	1102	GCATTGGCTTAAGGTCTTC	218
381745	2	1234	CCCCAGCCAGCCCACACTGC	219
381746	2	1549	CCCTCTGAGGCCTTGATCAT	220
381747	2	1621	GCTGAACCTGTCTGAAGAG	221
381748	2	1963	GCCACCATCTCTGTACAAGG	222
381749	2	1996	ATCTGGAGCTGTGCTGCAGG	223
381750	2	2242	GCAGCAGCAACACTGAAATA	224
381751	2	2357	CCGAATAGACAGCTCCTTCA	225
381752	2	2377	ACTGTAGTTCGAAAGTCACC	226
381753	2	2452	AGTCTGTCCAGCCAGCCAGT	227
381754	2	2567	GGAGTGAAGGAAGTTAGAGA	228
381755	2	2629	ATAAGITCAACATCTACTGT	229
381756	2	2665	CGAGTCACCTTAAGTACATA	230
381757	2	2840	AAACACACAGGTTTATTGC	231
381758	2	2845	TTCTCAAACACACAGGTTT	232
381759	2	2850	TTTCCTTCTCAAACACACAG	233
381760	2	2855	GTCATTTCTCTCAAACA	234
381761	2	2896	TGGATTAACCTCCAGCAGA	235
381762	2	2965	ATCTTCATTACCTCAATCTC	236
381763	2	3389	GTTGCTAGCATACTGAGCCA	237
381764	2	3394	GTGATGTTGCTAGCATACTG	238
381765	2	3424	TGCTGGCTGGAAACTGACA	239
381766	2	3541	ATGCCACTTCGGTACCTCTG	240
381767	2	4165	GATGTGGGCAGCATGAAC	241
381768	2	4186	ATGTTCCCTCTGTTGGATG	242
381769	2	4516	AGCCTGTCATCCTCAATATC	243
381770	2	4615	CTGAAATCCTTGTGCAAC	244

## 【0159】

【表 16 - 2】

ISIS #	標的配列番号	標的部位	配列(5'から3')	配列番号
381771	2	4693	TTATCCCTTGCTCGGAATGT	245
381772	2	4741	AAAGCCAGAGCAGGCTCCAG	246
381773	2	4813	AGGTGCATCTTGTGATTAGC	247
381774	2	4876	CGAACAAAGAACCTGTAGTC	248
381775	2	5068	ATCTTGATGGGTCCATGAT	249
381776	2	5098	CGCATTACCATGCTCCGCAC	250
381777	2	5146	TTCAGTTCTGCCTGGAGGAC	251
381778	2	5200	AGGAAGAGGCCGGATGGGAAT	252
381779	2	5265	CTGTCCTGGAGTCAGTCACT	253
381780	2	5270	CTGTGCTGCCTGGAGTCAG	254
381781	2	5275	ATGATCTGTGCTGTCCTGGA	255
381782	2	5280	GAAACATGATCTGTGCTGTC	256
381783	2	5416	ATCTCTGGGATATCATATAT	257
381784	2	6019	CCAGCAATCATTCCAGAAC	258
381785	2	6439	GTGGGTGAGGACGGCCTGC	259
381786	2	6631	TTGGCTTCAGAATCCAGGTT	260
381787	2	6636	TTATCTTGGCTTCAGAATCC	261
381788	2	6646	GCCTGCTGGATTATCTTGGC	262
381789	2	6745	CTCCAGTTGGCAAAGACCAT	263
381790	2	6982	ATTCTACTGTCCCTTCTGG	264
381791	2	7122	CCTCCCGCTCCTCAACTTG	265
381792	2	7144	TGGTAAATGGAATTAGGAA	266
381793	2	7174	TGCAAGTCAGCAAATGCAC	267
381794	2	7201	TTCTCCTGCATCCGGCCTGG	268

10

20

30

表 16 のオリゴヌクレオチドは、遺伝子標的 m R N A 濃度に関するそれらの効果に関し、ヒト A C C 1 にハイブリダイゼーションするように設計されたプライマー - プローブセットを用い、本明細書の別の実施例で記載したように、定量的リアルタイム P C R によって分析してもよい。I S I S 3 8 1 7 7 9 、 I S I S 3 8 1 7 8 0 、 I S I S 3 8 1 7 8 1 、 I S I S 3 8 1 7 8 2 、 I S I S 3 8 1 7 8 3 および I S I S 3 8 1 7 8 4 は、配列番号 2 のヌクレオチド 5 2 1 4 ~ 6 1 5 2 の適切な標的領域内に包含される。

## 【配列表】

2008538355000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

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

(72)発明者 バノット, サンジャイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 , カールズバッド, パセオ アラヤン 8 0 9  
4

(72)発明者 モニア, ブレット ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4 , エンシニタス, カーサ ヘルモサ コート  
2 3 0 6

(72)発明者 ガイスラー, ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 8 3 , ビスタ, ローレル サークル 1 5 7 3

(72)発明者 マッケイ, ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 4 , ポーウェイ, ゴールデン アイ レーン 1  
2 4 6 7

(72)発明者 ドビー, ケニス ダブリュー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 1 4 , デル マー, ストラトフォード コート 7  
0 3 ナンバー 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA06 CA11 HA17

4C084 AA13 NA14 ZA362 ZA702 ZA752 ZB212 ZC212 ZC332 ZC352

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZA36 ZA70 ZA75 ZB21 ZC21  
ZC33 ZC35