

(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2013-529909

(P2013-529909A)

(43) 公表日 平成25年7月25日(2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
<b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-512184 (P2013-512184)  
 (86) (22) 出願日 平成23年5月25日 (2011. 5. 25)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月14日 (2012. 12. 14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/037833  
 (87) 国際公開番号 W02011/150005  
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011. 12. 1)  
 (31) 優先権主張番号 61/348, 656  
 (32) 優先日 平成22年5月26日 (2010. 5. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512156578  
 カッパーアールエヌエー, インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国, フロリダ州 33137  
 , マイアミ, 4400 ビスケイン ブル  
 バード  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (72) 発明者 コラド, ジョゼフ  
 アメリカ合衆国, フロリダ州 33483  
 , デルレイ ビーチ, 1004 ブルック  
 ス レーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ATOH1 に対する天然アンチセンス転写物の阻害による無調ホモログ1 (ATOH1) 関連疾患の治療

(57) 【要約】

本発明は、無調ホモログ1 (ATOH1) ヌクレオチドの発現および/または機能を調節、特に、無調ホモログ1 (ATOH1) ポリヌクレオチドの天然のアンチセンスポリヌクレオチドを標的化することによって調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。本発明はまた、それらのアンチセンスオリゴヌクレオチドの同定およびATOH1の発現に関連する疾病および障害の治療におけるそれらの使用にも関連する。

【選択図】 図1

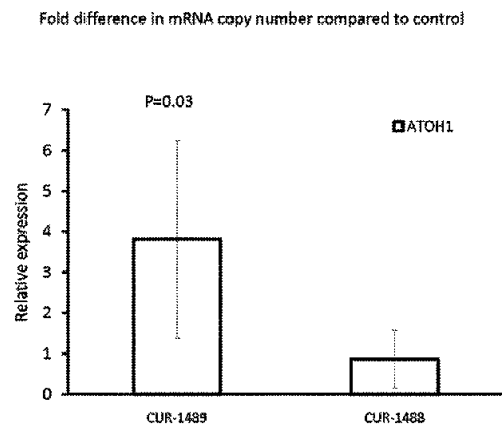


FIGURE 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

生物学的系における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、

前記系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) のポリヌクレオチドの天然アンチセンスに対する逆相補配列と少なくとも 50 % の配列同一性を有する、前記系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つの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み、

それによって、無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する、方法。 10

**【請求項 2】**

生物学的系における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、

前記生物学的系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 番目 ~ 589 番目の天然アンチセンス転写物のヌクレオチドの範囲内の連続した 5 ~ 30 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対する逆相補配列と少なくとも 50 % の配列同一性を有する、前記生物学的系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つの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み、 20

それによって、無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

生体内または体外で患者の細胞または組織における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、

前記細胞または組織を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記オリゴヌクレオチドは無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドに対する天然アンチセンスオリゴヌクレオチドと少なくとも 50 % の配列同一性を有する、前記細胞または組織を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つの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み 30

、  
それによって、生体内または体外で患者の細胞または組織における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する、方法。

**【請求項 4】**

患者の細胞または組織における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、

前記生物学的系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 番目 ~ 589 番目の天然アンチセンス転写物のヌクレオチドの範囲内の連続した 5 ~ 30 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対する逆相補配列と少なくとも 50 % の配列同一性を有する、前記前記生物学的系を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さの少なくとも 1 つの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み、 40

それによって、無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

生物学的系における無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、

前記系を、少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ 1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの天然のアンチセンスオリゴヌクレオチドの 1 つの領域を標的とする、前記系 50

を、少なくとも1つの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み、

それによって、無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調節する、方法。

【請求項6】

無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) の機能および/または発現が、対照と比較して生体内または体外で増加する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの天然のアンチセンス配列を標的とする、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドのコード核酸配列および/または非コード核酸配列を含む核酸配列を標的とする、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドの重複配列および/または非重複配列を標的とする、請求項5に記載の方法。

【請求項10】

前記少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾糖部分、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間結合、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド、およびそれらの組み合わせから選択された1以上の修飾を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項11】

前記1以上の修飾が、2' - O - メトキシエチル修飾糖部分、2' - メトキシ修飾糖部分、2' - O - アルキル修飾糖部分、二環糖部分、およびそれらの組み合わせから選択された、少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記1以上の修飾は、ホスホロオチオエート、2' - O - メトキシエチル ( M O E ) 、2' - フルオロ、アルキルホスホナート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオアート、ホスホルアミダート、カルバメート、炭酸塩、リン酸トリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせから選択された少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記1以上の修飾が、ペプチド核酸 ( P N A ) 、ロケット核酸 ( L N A ) 、アラビノ核酸 ( F A N A ) 、類似体、誘導體、およびそれらの組み合わせから選択された少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが、配列番号3および4に記載するオリゴヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

生体内または体外で哺乳動物の細胞または組織における無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) 遺伝子の機能および/または発現を調節する方法であって、

前記細胞または組織を、5 ~ 30個のヌクレオチドの長さの少なくとも1つの低分子干渉RNA ( s i R N A ) オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも1つの s i R N A オリゴヌクレオチドは無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチドに対して特異的であり、前記少なくとも1つの s i R N A オリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドのアンチセンスおよび/またはセンス核酸分子の少なくとも5個の連続した核酸の相補的配列と少なくとも50%の配列同一性を有する、前記細胞または組織を、5 ~ 30個のヌクレオチドの長さの少なくとも1つの低分子干渉RNA ( s i R N A ) オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、

10

20

30

40

50

生体内または体外で哺乳動物の細胞または組織における無調ホモログ1 (A T O H 1) の機能および/または発現を調節する、方法。

【請求項16】

前記オリゴヌクレオチドが、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドのアンチセンス核酸分子および/またはセンス核酸分子に相補的な連続した少なくとも5個の核酸の配列と、少なくとも80%の配列同一性を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

生体内または体外で哺乳動物の細胞または組織における無調ホモログ1 (A T O H 1) の機能および/または発現を調節する方法であって、

前記細胞または組織を、約5~30個のヌクレオチドの長さの少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドのセンスおよび/またはアンチセンス鎖の非コード配列および/またはコード配列に対して特異的であり、前記少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1および配列番号2の配列の少なくとも1つの核酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有する、前記細胞または組織を、約5~30個のヌクレオチドの長さの少なくとも1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることと、

生体内または体外で哺乳動物の細胞または組織における無調ホモログ1 (A T O H 1) の機能および/または発現を調節する工程とを含む、方法。

【請求項18】

少なくとも1つの修飾を含む合成された修飾オリゴヌクレオチドであって、

前記少なくとも1つの修飾が、少なくとも1つの修飾糖部分、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間結合、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド、およびそれらの組み合わせから選択されたものであり、

前記オリゴヌクレオチドは、生体内または体外で無調ホモログ1 (A T O H 1) にハイブリダイズし、通常の対照と比較してその機能および/または発現を調節するアンチセンス化合物であり、ならびに、

前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも約5個の連続した核酸の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し、前記少なくとも約5個の連続した核酸の配列は、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドのアンチセンスおよび/またはセンス核酸分子、ならびに、アレル、ホモログ、アイソフォーム、これらの変異型、誘導體、断片、および組み合わせに相補的である、オリゴヌクレオチド。

【請求項19】

前記オリゴヌクレオチドが、5~30個のヌクレオチドの長さであり、および、A T O H 1 遺伝子の天然アンチセンス転写物の範囲内の連続した5~30個のヌクレオチドに対する逆相補配列と少なくとも50%の配列同一性を有する、請求項18に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項20】

前記少なくとも1つの修飾は、ホスホロオチオエート、アルキルホスホナート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホノチオアート、ホスホルアミダート、カルバメート、炭酸塩、リン酸トリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせから選択されたヌクレオチド間結合を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項21】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つのホスホロオチオエートヌクレオチド間結合を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項22】

前記オリゴヌクレオチドが、ホスホロオチオエートヌクレオチド間結合の骨格を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項23】

10

20

30

40

50

前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチドを含み、該修飾されたヌクレオチドは、ペプチド核酸、ロケット核酸(LNA)、類似体、誘導體、およびそれらの組み合わせから選択されたものである、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項24】

前記オリゴヌクレオチドは、複数の修飾を含み、前記修飾は、ホスホロオチオエート、アルキルホスホナート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホノチオアート、ホスホラミダート、カルバメート、炭酸塩、リン酸トリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせから選択された修飾ヌクレオチドを含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項25】

前記オリゴヌクレオチドは複数の修飾を含み、前記複数の修飾は、ペプチド核酸、ロケット核酸(LNA)、類似体、誘導體、およびそれらの組み合わせから選択された修飾ヌクレオチドを含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項26】

前記オリゴヌクレオチドが、2'-O-メトキシエチル修飾糖部分、2'-メトキシ修飾糖部分、2'-O-アルキル修飾糖部分、二環糖部分、およびそれらの組み合わせから選択された、少なくとも1つの修飾糖部分を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項27】

前記オリゴヌクレオチドは複数の修飾を含み、前記複数の修飾は、2'-O-メトキシエチル修飾糖部分、2'-メトキシ修飾糖部分、2'-O-アルキル修飾糖部分、二環糖部分、およびそれらの組み合わせから選択された修飾糖部分を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項28】

前記オリゴヌクレオチドは約5~30個のヌクレオチドの長さを有し、無調ホモログ1(A TO H 1)のアンチセンスおよび/またはセンス鎖にハイブリダイズし、

前記オリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1(A TO H 1)ポリヌクレオチドのアンチセンスおよび/またはセンスコード核酸配列および/または非コード核酸配列の連続した少なくとも5個の核酸の配列に相補的な配列に対して、少なくとも約60%配列同一性を有する、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項29】

前記オリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1(A TO H 1)ポリヌクレオチドのアンチセンスおよび/またはセンスコード核酸配列および/または非コード核酸配列の連続した少なくとも5個の核酸の配列に相補的な配列に対して、少なくとも約80%配列同一性を有する、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項30】

前記オリゴヌクレオチドは、生体内または体外で無調ホモログ1(A TO H 1)にハイブリダイズし、通常の対照と比較してその機能および/または発現を調節する、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項31】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号3および4に記載する配列を含む、請求項19に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項32】

請求項18に記載の1以上の無調ホモログ1(A TO H 1)ポリヌクレオチドに特異的な1以上のオリゴヌクレオチド、および、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物であって、

前記ポリヌクレオチドは、アンチセンス配列、相補配列、アレル、ホモログ、アイソフォーム、変異型、誘導體、突然変異体、断片、またはそれらの組み合わせを含む、組成物

50

## 【請求項 3 3】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 および 4 に記載する配列のいずれかと比較して、少なくとも約 40% の配列同一性を有する、請求項 3 2 に記載の組成物。

## 【請求項 3 4】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 および 4 に記載するヌクレオチド配列を含む、請求項 3 2 に記載の組成物。

## 【請求項 3 5】

配列番号 3 および 4 に記載する配列の前記オリゴヌクレオチドは、1 以上の修飾または置換を含む、請求項 3 4 に記載の組成物。

## 【請求項 3 6】

前記 1 以上の修飾は、ホスホロオチオエート、メチルホスホナート、ペプチド核酸、ロケット核酸 (LNA) 分子、およびそれらの組み合わせから選択されたものである、請求項 3 5 に記載の組成物。

## 【請求項 3 7】

少なくとも 1 つの無調ホモログ 1 (A T O H 1) および / または少なくとも 1 つのそのコードされた生成物に関連する疾病を予防または治療する方法であって、

患者に対し、少なくとも 1 つの無調ホモログ 1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドの天然のアンチセンス配列に結合し、かつ前記少なくとも 1 つの無調ホモログ 1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドの発現を調節する、少なくとも 1 つのアンチセンスオリゴヌクレオチドを治療上有効な用量投与することを含み、

それによって、前記少なくとも 1 つの無調ホモログ 1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドおよび / または少なくとも 1 つのそのコードされた生成物に関連する疾病を予防または治療する、方法。

## 【請求項 3 8】

前記少なくとも 1 つの無調ホモログ 1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドに関連する疾病が、A T O H 1 の機能異常および / または発現に関連する疾患または障害、癌、欠陥のある p 5 3 のシグナル伝達経路に関連する疾患または障害、増殖性疾患または障害、異常な細胞増殖、神経疾患または障害、聴覚系に関連する疾患または障害 (例えば、難聴、部分的な難聴、内耳有毛細胞等の損傷または損失による前庭欠陥)、前庭系に関連する疾患または障害 (例えば、前庭有毛細胞の喪失、平衡障害など)、変形性関節症、N o t c h シグナル伝達経路に関連する疾患または障害、腸の疾患または障害 (例えば、大腸炎、腸炎など)、歯牙形成障害、意識的固有感覚に関連する疾患または障害、内受容に関連する疾患または障害、呼吸に関連する疾患または障害から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

生体内投与のために選択された標的ポリヌクレオチドとして、A T O H 1 遺伝子の天然のアンチセンス転写物に対して選択的な少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを特定し、選択する方法であって、

選択された標的ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的な、少なくとも 5 個の連続したヌクレオチドを含む、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを特定することと、

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下での、前記標的ポリヌクレオチドまたは選択された標的ポリヌクレオチドに対するアンチセンスであるポリヌクレオチドとアンチセンスオリゴヌクレオチドとのハイブリッドの熱融解温度を測定することと、

得られた情報に基づいて、生体内投与のための少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを選択することを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2010年5月26日に提出された米国仮特許出願第 61 / 348656号

10

20

30

40

50

の優先権を主張し、当該米国仮特許出願は、参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明の実施形態は、A T O H 1 および関連分子の発現および / または機能を調節するオリゴヌクレオチドを含む。

【背景技術】

【0003】

D N A - R N A および R N A - R N A ハイブリダイゼーションは、D N A 複製、転写、および翻訳を含む、核酸の機能の多くの側面にとって重要である。ハイブリダイゼーションはまた、特定の核酸を検出するか、またはその発現を変化させるさまざまな技術の中心となる。アンチセンスヌクレオチドは、例えば、標的 R N A にハイブリダイズし、R N A スプライシング、転写、翻訳、複製を妨害することによって遺伝子発現を阻害する。アンチセンス D N A は、D N A - R N A ハイブリッドがほとんどの細胞型に存在している活性であるリボヌクレアーゼ H による消化の基質として機能するという付加的特徴を備える。アンチセンス分子は、オリゴヌクレオチドの場合 ( O D N ) に細胞内に送達することができ、または R N A 分子として内因性遺伝子から発現させることができる。F D A は最近、アンチセンスが治療的有用性を有する点を反映させた、( サイトメガロウイルス網膜炎の治療用の ) アンチセンス薬、V I T R A V E N E ( 商標 ) を承認した。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0004】

本概要は、本発明の本質と要点を簡潔に示す本発明の要約を提示するために提供される。特許請求の範囲の記載の意義の解釈や、範囲の限定のためにこれを用いるべきではないという理解を前提として提示されたものである。

【0005】

一実施形態において、本発明は、天然のアンチセンス転写物の作用を阻害するための方法であって、当該天然のアンチセンス転写物の任意の領域を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることにより、対応するセンス遺伝子をアップレギュレートする、該方法を提供する。本出願においては、前記天然のアンチセンス転写物の阻害が、本発明の範囲に包含されると考えられる s i R N A 、リボザイム、および小分子により達成され得ることも想定されている。

30

【0006】

一実施形態は、生体内または体外で患者の細胞または組織における A T O H 1 ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、前記細胞または組織を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 番目 ~ 589 番目のヌクレオチドの範囲内の連続した 5 ~ 30 個のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対する逆相補配列と少なくとも 50 % の配列同一性を有する、該工程を含み、それによって、生体内または体外で患者の細胞または組織における A T O H 1 ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する、方法を提供する。

40

【0007】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドが、A T O H 1 ポリヌクレオチドの天然のアンチセンス配列、例えば配列番号 2 に記載のヌクレオチド、およびその変異型、アレル、ホモログ、突然変異体、誘導體、断片、および相補配列を標的とする。アンチセンスオリゴヌクレオチドの例としては、配列番号 3 および 4 に記載のものが挙げられる。

【0008】

別の実施形態は、生体内または体外で患者の細胞または組織における A T O H 1 ポリヌクレオチドの機能および / または発現を調節する方法であって、前記細胞または組織を、5 ~ 30 個のヌクレオチドの長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、前記オリゴヌクレオチドは、A T O H 1 ポリヌクレオチドのアンチセンスに対す

50

る逆相補配列と少なくとも50%の配列同一性を有する、該工程を含み、それによって、生体内または体外で患者の細胞または組織におけるA T O H 1ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調節する、方法を提供する。

【0009】

別の実施形態は、生体内または体外で患者の細胞または組織におけるA T O H 1ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調節する方法であって、前記細胞または組織を、5~30個のヌクレオチドの長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、前記オリゴヌクレオチドは、A T O H 1アンチセンスポリヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドと少なくとも50%の配列同一性を有する、該工程を含み、それによって、生体内または体外で患者の細胞または組織におけるA T O H 1ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調節する、方法を提供する。

10

【0010】

ある実施形態では、組成物が、センスおよび/またはアンチセンスA T O H 1ポリヌクレオチドに結合する1以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0011】

ある実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、1以上の修飾または置換されたヌクレオチドを含む。

【0012】

ある実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、1以上の修飾された結合を含む。

【0013】

さらに別の実施形態では、前記修飾されたヌクレオチドが、ホスホロオチオエート、メチルホスホナート、ペプチド核酸、2'-O-メチル、フルオロ-または炭素、メチレンまたは他のロックト核酸(LNA)分子を含む修飾塩基を含む。好ましくは、前記修飾されたヌクレオチドは、-L-LNAを含む、ロックト核酸分子である。

20

【0014】

ある実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、患者に対し皮下に、筋肉内に、静脈内に、または腹腔内に投与される。

【0015】

ある実施形態では、前記オリゴヌクレオチドは、医薬組成物として投与される。治療レジメンは、患者に対して前記アンチセンス化合物を少なくとも1回投与することを含む。しかし、この処置は、一定期間にわたって複数回の投与を含むように改変することができる。この処置は、1種類以上の他の治療と併用することができる。

30

【0016】

ある実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、リボソームに包入されるか、担体分子(例えばコレステロール、TATペプチド)に付着される。

【0017】

他の態様は、以下に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】Lipofectamine 2000を用いて導入されたSiRNAオリゴで処置した後48時間でのHEPG2細胞におけるA T O H 1の、mRNAの対照と比較した倍率変化および標準偏差を示す。リアルタイムPCRの結果は、HepG2細胞におけるA T O H 1のmRNAのレベルが、A T O H 1のアンチセンスHs.611058へと設計されたオリゴのうちの1つで処置した後48時間で大幅に増加していることを示す。CUR-1488およびCUR-1489と付記されたバーは、それぞれ配列番号3および4で処置されたサンプルに対応する。

40

【発明を実施するための形態】

【0019】

[配列表の説明]

配列番号1: ホモサピエンス無調ホモログ1(A T O H 1)、転写変異体1、mRNA

50



(NCBI登録番号：NM\_005172)；配列番号2：天然ATH1アンチセンス配列プライミングされていないHs.69747；配列番号3および4：アンチセンスオリゴヌクレオチド。\*はホスホロチオエート結合を示す。

【0020】

[ 詳細な説明 ]

本発明のいくつかの態様について、例示のための応用例を参照して以下に説明する。種々の特定の細部、関係、および方法は、本発明の完全な理解のために記載されていることを理解されたい。しかし、本発明を、1以上の特定の細部を用いることなく、または他の方法を用いて実施できることは、当業者には容易に理解されよう。本発明は、行為や事象の順序によって限定されず、いくつかの行為は、異なる順序で、および/または他の作用または事象と同時に発生し得る。さらに、すべての例示された行為または事象は、本発明による方法を実施するために必ずしも必要ではない。

10

【0021】

本明細書に記載されるすべての遺伝子、遺伝子名、および遺伝子産物は、本明細書に記載される組成物および方法が適用される任意の種由来のホモログに対応するものとする。したがって、この用語は、以下に限定しないが、ヒトおよびマウス由来の遺伝子および遺伝子産物を包含する。特定の種に由来する遺伝子または遺伝子産物が開示される場合、この開示内容は、例示のみを意図するものであり、それが現れた文脈が明示的に示さない限り、限定として解釈すべきものではない。したがって、例えば、本明細書に開示する遺伝子であって、いくつかの実施形態においてそれが哺乳動物の核酸およびアミノ酸配列に関連するものは、以下に限定しないが、他の哺乳類、魚類、両生類、爬虫類、および鳥類を含む他の動物に由来するホモログおよび/またはオルソログ遺伝子および遺伝子産物を包含するものとする。ある実施形態では、該遺伝子または核酸配列はヒト由来である。

20

【0022】

[ 定義 ]

本明細書で使用される用語の選択は、特定の実施形態を説明する目的でされたものであり、本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は文脈において明らかに別記されない限り、複数形の内容も含むものとする。さらに、用語「含む」、「含める」、「有する」、「もつ」またはその変化形は、本明細書および/または添付の請求項において使用される場合、用語「包含する」と同様に非排他的な意味で用いられるものとする。

30

【0023】

用語「約」または「概ね」は、当業者が決定した特定の数値について許容される誤差範囲内にあることを意味し、当該誤差範囲は、部分的には、その数値がどのように測定または決定されたか、すなわち測定システムの限界に応じて決まる。例えば、「約」は、本技術分野での習慣に従って、1またはそれ以上の標準偏差内に収まっていることを意味し得る。あるいは、「約」は、所与の数値に対し、最大20%、好ましくは最大10%、より好ましくは最大5%、さらに好ましくは最大1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に生物学的な系またはプロセスに関して、この用語は、ある数値に対し、1桁分(10倍)以内、より好ましくは5倍以内、さらに好ましくは2倍以内を意味し得る。特定の数値が本明細書および特許請求の範囲に記載される場合、特に別記されない限り、特定の数値の許容される誤差範囲ないであることを意味する用語「約」が仮定されるものとする。

40

【0024】

本明細書で使用される用語「mRNA」は、標的化された遺伝子の既知のmRNA転写物、および解明され得る他の転写物を意味する。

【0025】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス化合物」という表現によって、他のRNAまたはDNA(標的RNA、DNA)に結合するRNAまたはDNA分子を意味する。例えば、RNAオリゴヌクレオチドの場合、RNA-RNA相互作用によって他のRNA標的に結合し、その標的RNAの活性を変化させる。アンチセンスオリゴヌ

50

クレオチドは、特定のポリヌクレオチドの発現および/または機能をアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることができる。この定義は、治療、診断、または他の観点から有用である任意の外来のRNAまたはDNA分子を含むことを意味する。そのような分子としては、例えば、標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズするアンチセンスRNAまたはDNA分子、干渉RNA (RNAi)、マイクロRNA、デコイRNA分子、siRNAは、酵素RNA、治療編集RNAおよびアゴニストおよびアンタゴニストのRNA、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、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、プライマー、プローブ、および他のオリゴマー化合物が挙げられる。このようなものとして、これらの化合物は、一本鎖の、二本鎖の、部分的一本鎖の、または環状オリゴマー化合物の形で導入し得る。

10

**【0026】**

本発明の文脈において、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) またはその模倣物質のオリゴマーまたはポリマーを指す。用語「オリゴヌクレオチド」という用語はまた、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、その置換型またはアノマー型、ペプチド核酸 (PNA)、ロック核酸 (LNA)、ホスホロオチオエート、メチルホスホナートなどを含む、天然および/または修飾されたモノマーまたは結合の直鎖状または環状のオリゴマーを含む。オリゴヌクレオチドは、ワトソン・クリック型塩基対、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型塩基対などのモノマー-モノマー相互作用の規則的なパターンによって、標的ポリヌクレオチドに特異的に結合することができる。

20

**【0027】**

オリゴヌクレオチドは、「キメラ」すなわち異なる領域から構成されているものであってよい。本発明の文脈において、「キメラ」化合物は、例えば、DNA領域 (S)、RNA領域 (S)、PNA領域 (S) などの2以上の化学領域を含むオリゴヌクレオチドである。各化学領域は、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合ではヌクレオチドから構成されている。これらのオリゴヌクレオチドは、一般的には、そのオリゴヌクレオチドが1以上の所望の特性を発揮するべく修飾されている少なくとも1つの領域を含む。該オリゴヌクレオチドの所望の特性としては、以下に限定されないが、例えば、ヌクレアーゼ分解に対する高い抵抗性、高い細胞取り込み、および/または標的核酸に対する高い結合親和性などが挙げられる。したがって、オリゴヌクレオチドの異なる領域は、異なる特性を有し得る。本発明のキメラオリゴヌクレオチドは、上記のような、2以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、および/またはオリゴヌクレオチドアナログの混合構造として形成することができる。

30

**【0028】**

オリゴヌクレオチドは、「位置を揃えた形」で (in "register") 結合され得る複数の領域から構成されるものであり得、すなわちモノマーが連続して結合される場合、天然DNAの場合と同様に結合されるか、またはスパーサーを介して結合され得る。スパーサーは、領域間の共有結合「架橋」を構成することを意図し、好ましい場合において炭素原子約100個を超えない長さを有する。スパーサーは、さまざまな機能 (例えば正電荷または負電荷の含有) を保持でき、特殊な核酸結合特性 (干渉物質、グループバインダー、毒素、フルオロフォアなど) を保持でき、親油性であり、例えばアルファヘリックスを誘導するアラニン含有ペプチドのように、特殊な2次構造を誘導する。

40

**【0029】**

本明細書において使用される「ATH1」および「無調ホモログ1」は、ファミリーの全メンバー、変異体、アレル、断片、種、コード配列および非コード配列、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチド鎖などを非排他的に包含する。

**【0030】**

本明細書において使用される用語、「無調ホモログ1」、ATH1、ATH1、HATH1、MATH-1、およびbHLHa14は、文献では同義のものともみなされ、本出願において互換的に使用される。

50

## 【0031】

本明細書において使用される用語「に特異的なオリゴヌクレオチド」または「を標的にするオリゴヌクレオチド」は(i)標的遺伝子の一部分と安定な複合体を形成できる配列、または(ii)標的遺伝子のmRNA転写物の一部分と安定な2重鎖を形成できる配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。複合体および2重鎖の安定性は、理論計算および/または体外アッセイによって決定され得る。ハイブリダイゼーション複合体および2重鎖の安定性を決定するための典型的な方法は、下記の実施例において記載される。

## 【0032】

本明細書において使用される用語「標的核酸」は、DNA、そのようなDNAから転写されたRNA(プレmRNAおよびmRNAを含む)、およびそのようなRNA、コード配列、非コード配列、センスまたはアンチセンスポリヌクレオチドに由来するcDNAも包含する。オリゴマー化合物のその標的核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸の通常の機能を妨げる。特異的にハイブリダイズする化合物による標的核酸の機能に対するこの調節は、通常「アンチセンス」と称される。干渉されるDNAの機能には、例えば複製および転写が含まれる。干渉されるRNAの機能として、例えばタンパク質翻訳部位へのRNAの転座、RNAからのタンパク質の翻訳、1つまたは複数のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAが関与し得る、またはRNAによって促進され得る触媒活性などの全ての生体機能が挙げられる。標的核酸機能でのそのような干渉の全体的効果は、コードされる産物またはオリゴヌクレオチドの発現の調節である。

## 【0033】

RNA干渉「RNAi」は、「標的」核酸配列に配列特異的の相同性を有する2本鎖RNA(dsRNA)分子によって介在される。本発明の特定の実施形態において介在物質は、5~25ヌクレオチドの「低分子干渉」RNA2重鎖(siRNA)である。siRNAは、ダイサーとして周知のRNase酵素によるdsRNAのプロセッシングに由来する。siRNA2重鎖産物は、RISC(RNA Induced Silencing Complex、RNA誘導サイレンシング複合体)と称される多タンパク質siRNA複合体に入る。なんらかの特定の理論にも制約されることを言う意図はないが、次いでRISCは、siRNA2重鎖が配列特異的方法で相互作用し、触媒的に切断を介在する標的核酸(適切にはmRNA)に導かれると考えられる。本発明により使用され得る低分子干渉RNAは、当技術分野において十分に周知であり、当業者によく知られている手順に従って合成および使用され得る。本発明の方法における使用のための低分子干渉RNAは、適切には約1~約50の間のヌクレオチド(nt)を含む。非限定的実施形態の例において、siRNAは約5~約40nt、約5~約30nt、約10~約30nt、約15~約25ntまたは約20~25ヌクレオチドを含み得る。

## 【0034】

適切なオリゴヌクレオチドの選択は、自動的に核酸配列のアラインメントをとり、同一または相同な領域を示すコンピュータープログラムを使用することによって容易になる。そのようなプログラムは、例えばGenBankなどのデータベースを検索することによって、またはPCR産物を配列決定することによって得られた核酸配列を比較するために使用される。さまざまな種由来の核酸配列の比較により、種の間で適切な程度の同一性を示す核酸配列の選択が可能になる。配列決定されていない遺伝子の場合、標的種および他の種における遺伝子間での同一性の程度の決定を可能にするサザンプロットが実施される。当技術分野においてよく知られるように、種々の程度のストリンジェンシーでのサザンプロットを実施することによって、同一性の概算的測定値を得ることが可能である。これらの手順は、管理される対象における標的核酸配列に高い相補性を示し、他の種における対応する核酸配列に低い相補性を示すオリゴヌクレオチドの選択を可能にする。当業者であれば、本発明における使用のための遺伝子の適切な領域を選択することにおいては相応な許容範囲があることを理解されよう。

## 【0035】

「酵素的RNA」によって酵素活性を有するRNA分子が意味される(Cech, (1

10

20

30

40

50

988) J. American Med. Assoc. 260, 3030~3035)。酵素的核酸(リボザイム)は、最初に標的RNAに結合することによって作用する。そのような結合は、標的RNAを切断するべく作用する分子の酵素的部分の近接に保持される酵素的核酸の標的結合部分を通じて生じる。したがって酵素的核酸は、最初に標的RNAを認識し、次いで塩基対形成を通じて結合し、一旦正しい部位に結合すると標的RNAを切断するべく酵素的に作用する。

【0036】

「デコイRNA」は、リガンドに対する天然結合ドメインを模倣するRNA分子を意味する。したがってデコイRNAは、特異的リガンドの結合に関して天然結合標的と競合する。例えば、HIVトランス活性化応答(TAR)RNAの過剰発現は、「デコイ」として作用することができ、HIV tatタンパク質に効率的に結合し、それによりHIV RNAにコードされるTAR配列へのその結合を阻害することが判明している(Sullengerら, (1990) Cell, 63, 601-608)。これは、具体例として挙げられている。当業者であれば、これが一例に過ぎず、他の実施形態が当技術分野において公知の技術を使用して容易に作成され得ることを理解されよう。

10

【0037】

本明細書において使用される用語「モノマー」は、典型的には、大きさを数個、例えば約3~4個の単量体単位から約数百個の単量体単位までの範囲のオリゴヌクレオチドを形成するホスホジエステル結合またはその類似結合によって連結されたモノマーを示す。ホスホジエステル結合の類似として、ホスホロオチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホロセレノエート、ホスホラミデートなどが挙げられ、後により詳細に記載される。

20

【0038】

用語「ヌクレオチド」は、非天然のヌクレオチドとともに天然のヌクレオチドを包含する。以前には「非天然に発生する」ものと考えられていた各種ヌクレオチドが、その後天然にも見出されたことがあるのは当業者には明らかなはずである。したがって、「ヌクレオチド」は、既知のプリンおよびピリミジンヘテロ環を含む分子だけでなく、ヘテロ環アナログおよびそれらの互変異性体も含む。他の種類のヌクレオチドの例としては、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、プリン、キサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N6-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N4, N4-エタノシトシン、N6, N6-エタノ-2, 6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C3-C6)-アルキニルシトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、シュードイソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンおよびBennerら、米国特許第5,432,272号に記載されている「非天然の」ヌクレオチドである。「ヌクレオチド」という用語は、これらの例のすべてに加えてそのアナログおよび互変異性体も包含するものとする。特に興味深いヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、およびウラシルであり、これらはヒトにおける治療および診断の用途に関連して自然に生じるヌクレオチドと考えられる。ヌクレオチドは、例えばKornbergおよびBaker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)に記載の天然の2'-デオキシ糖および2'-ヒドロキシ糖ならびにそれらのアナログを含む。

30

40

【0039】

ヌクレオチドに関して「アナログ」は、(例えばScheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulme, J. J., (2001) Nature Biotechnology 19:17~18; Manoharan M., (1999) Biochemistry et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997) Nucleic Acid Research, 2

50

5 : 4 4 2 9 ~ 4 4 4 3、Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3 : 203 - 213, Herdewin P., (2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10 : 297 - 310に概略が記載) 修飾された塩基成分および/または修飾された糖部分を有する合成ヌクレオチド; 2' - O, 3' - C - 結合 [ 3 . 2 . 0 ] ビシクロアラビノヌクレオチドを含む。そのようなアナログは、結合特性、例えば2重鎖または3重鎖安定性、特異性などを増強するために設計された合成ヌクレオチドを含む。

#### 【0040】

本明細書において使用される「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の実質的な相補鎖の対形成を意味する。対形成の1つの機序は、オリゴマー化合物の鎖の相補的ヌクレオチドまたはヌクレオチド塩基(ヌクレオチド)間でのワトソン-クリック型、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合であり得る水素結合を含む。例えばアデニンおよびチミンは、水素結合の形成を通じて対形成する相補的ヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションは、各種環境下で生じ得る。

10

#### 【0041】

アンチセンス化合物は、標的核酸への化合物の結合が標的核酸の通常機能に干渉して機能および/または活性の調節を生じ、特異的結合が望ましい条件下(すなわち生体内アッセイまたは治療的処置の場合での生理的条件下および対外アッセイの場合でのアッセイが実施される条件下)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に「特異的にハイブリダイズできる」。

20

#### 【0042】

本明細書において使用される表現「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、本発明の化合物がその標的配列にハイブリダイズし、最小限の他の配列にしかハイブリダイズしない条件を意味する。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる環境下では異なっており、本発明の文脈においてオリゴマー化合物が標的配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成物ならびにそれらが調査されるアッセイによって決定される。一般に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、Na<sup>+</sup>またはK<sup>+</sup>などの無機陽イオン塩の低濃度(< 0.15 M) (すなわち低イオン強度)、20 - 25より高くオリゴマー化合物: 標的配列複合体のT<sub>m</sub>より低い温度、およびホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなどの変性剤または界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在を含む。例えば、ハイブリダイゼーション率はホルムアミド1%ごとに1.1%低下する。高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件の例は、0.1 x 塩化ナトリウム-クエン酸ナトリウムバッファー(SSC) / 0.1% (w/v) SDSで60、30分間である。

30

#### 【0043】

本明細書において使用される「相補性」は、1つまたは2つのオリゴマー鎖上の2つのヌクレオチド間の正確な対形成の能力を意味する。例えばアンチセンス化合物の特定の位置の核酸塩基が標的核酸の特定の位置で核酸塩基と水素結合でき、前記標的核酸がDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド分子である場合、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位置であると考えられる。オリゴマー化合物とさらなるDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド分子とは、各分子における十分な数の相補的位置が相互に水素結合できるヌクレオチドによって占められる場合に相互に相補的である。したがって「特異的にハイブリダイズできる」および「相補的」は、オリゴマー化合物と標的核酸との間に安定かつ特異的な結合が生じるような十分な数のヌクレオチドにわたる十分な程度の正確な対形成すなわち相補性を示すために使用される用語である。

40

#### 【0044】

オリゴマー化合物の配列は、特異的にハイブリダイズできるその標的核酸の配列に100%相補的である必要がないことは当技術分野において理解されることである。さらにオリゴヌクレオチドは、介在するまたは隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象

50

に關与せず(例えばループ構造、ミスマッチまたはヘアピン構造)1以上のセグメントにわたってハイブリダイズできる。本発明のオリゴマー化合物は、それらが標的化される標的核酸配列中の標的領域に対して、少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%または少なくとも約99%の配列相補性を有する。例えば、アンチセンス化合物の20個のヌクレオチドのうち18個が標的領域に相補的であり、したがって特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性を示す。この例において残りの非相補的ヌクレオチドは、相補的ヌクレオチドと共に一群となっていて点状に在りても良く、相互にまたは相補的ヌクレオチドに近接している必要はない。そのように長さ18ヌクレオチドであり、標的核酸と完全に相補的な2つの領域によって隣接された4つ(4個)の非相補的ヌクレオチドを有するアンチセンス化合物は、標的核酸に全体で77.8%の相補性を有し、したがって本発明の範囲内に含まれる。アンチセンス化合物と標的核酸の領域との相補性百分率は、当技術分野において周知のBLASTプログラム(basic local alignment search tools)およびPowerBLASTプログラムを使用して通常通りに決定され得る。相同性百分率、配列同一性または相補性は、例えば、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., (1981)2, 482-489)を使用するGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix(登録商標), Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)の初期設定を使用することによって決定され得る。

10

20

**【0045】**

本明細書において使用される用語「熱融点(T<sub>m</sub>)」は、規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度の下で、標的配列に相補的であるオリゴヌクレオチドの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度を意味する。典型的にはストリンジェントな条件は、塩濃度が少なくともNaイオン濃度(または他の塩)約0.01~1.0M、pH7.0~8.3であり、短いオリゴヌクレオチド(例えば10~50ヌクレオチド)については温度が低くとも約30°Cであるものである。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加でも達成され得る。

**【0046】**

本明細書において使用される用語「調節」は、遺伝子の発現における増大(刺激)または減少(阻害)を意味する。

30

**【0047】**

ポリヌクレオチド配列の文脈において使用される場合に用語「変異型」は、野生型遺伝子に關連するポリヌクレオチド配列を包含する。この定義は、例えば「アレル」、「スプライス」、「種」または「多型」変異型も含み得る。スプライス変異型は、基準の分子と有意な同一性を有し得るが、一般にmRNAプロセッシングの際のエクソンの選択的スプライシングによる、より多いまたは少ない数のポリヌクレオチドを有する。対応するポリペプチドは、追加的機能ドメインまたはドメインの欠損を有し得る。種の変異型は、1つの種から他の種へ変化するポリヌクレオチド配列である。本発明における特定の有用性は、野生型遺伝子産物の変異型である。変異型は、核酸配列における少なくとも1つの変異から生じることができ、変化したmRNAまたはその構造または機能が変化していても変化していなくてもよいポリペプチドを生じ得る。任意の所与の天然または組み換え遺伝子は、対立形態を有さない場合も、1つ有する場合も、多数有する場合もある。変異型を生じる通常の変異変化は、一般に天然の欠失、追加またはヌクレオチドの置換に歸する。これらの型の変化のそれぞれは、単独でまたは他との組み合わせで1回または複数回、所与の配列に生じ得る。

40

**【0048】**

得られたポリペプチドは、一般に相互に比較して顕著なアミノ酸同一性を有する。多型変異型は、所与の種の個体間での特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列における変異型で

50

ある。多型変異型は、「単一ヌクレオチド多型」(SNP)またはポリヌクレオチド配列が1塩基によって変化している単一塩基変異も包含できる。SNPの存在は、例えば、易罹患性対抵抗性である病態についてのある傾向を有する特定の集団についての指標であり得る。

【0049】

誘導体ポリヌクレオチドは、化学的修飾(例えば水素のアルキル、アシルまたはアミノ基での置換)に供された核酸を含む。誘導体、例えばオリゴヌクレオチド誘導体は、修飾された糖部分または糖間結合などの天然に存在しない部分を含み得る。これらにおける例は、ホスホオチオエートおよび当技術分野において周知の他のイオウ含有種である。誘導核酸は、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁性粒子などが挙げられる標識も含み得る。

10

【0050】

「誘導体」ポリペプチドまたはペプチドは、例えばグリコシル化、ポリエチレングリコール化、リン酸化、硫酸化、還元/アルキル化、アシル化、化学的カップリングまたは穏やかなホルマリン処理によって修飾されたものである。誘導体は、以下に限定されないが放射性同位元素、蛍光または酵素標識を含む検出可能な標識を含むために直接または間接的のいずれかで修飾もされ得る。

【0051】

本明細書において使用される用語「動物」または「患者」とは、例えばヒト、ヒツジ、エルク、シカ、ミュールジカ、ミンク、哺乳動物、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、鳥類、ニワトリ、爬虫類、魚類、昆虫およびクモ類を含む意味である。

20

【0052】

「哺乳動物」は、典型的には医療的ケアの下にある温血哺乳動物(例えばヒトおよび家畜)を含む。例として、ヒトのみならず、ネコ、イヌ、ウマ、ウシおよびヒトが挙げられる。

【0053】

「治療」または「処置」は、(a)哺乳動物において病状が生じることを予防する工程、具体的にはそのような哺乳動物が前病気状態におかれているが、病状が生じているとまだ診断されていない場合；(b)病状を抑制する工程、例えばその進行を止める工程；および/または(c)病状を軽減する工程、例えば病態の退行を所望の終点に至るまで生じさせる工程、を含む哺乳動物における病気に対する処置を含む。治療は、疾患の症状の回復(例えば疼痛または不快感の緩和)も含み、そのような回復は、疾患に直接効果を与える場合または与えない場合がある(例えば原因、伝染、発現など)。

30

【0054】

本明細書において「癌」とは、哺乳動物においてみられるあらゆる種類の癌または新生物または悪性腫瘍を指し、以下に限定されないが、白血病、リンパ腫、黒色腫、癌腫、および肉腫が含まれる。癌は、「腫瘍」すなわち癌の悪性細胞を含む組織として現れる。腫瘍の例には肉腫および癌種が含まれ、例えば、以下に限定されないが、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫などが挙げられる。本明細書に開示する本発明の組成物によって治療できる他の癌としては、以下に限定されないが、例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺癌、原発性脳腫瘍、胃癌、大腸癌、悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノ

40

50

イド、膀胱癌、胃癌、前癌状態の皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌などが挙げられる。

#### 【0055】

本明細書において「癌」とは、哺乳動物においてみられるあらゆる種類の癌または新生物または悪性腫瘍を指し、以下に限定されないが、白血病（例えば、急性骨髄性白血病等）、リンパ腫、黒色腫、癌腫、および肉腫が含まれる。癌は、「腫瘍」すなわち癌の悪性細胞を含む組織として現れる。腫瘍の例には肉腫および癌種が含まれ、例えば、以下に限定されないが、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫などが挙げられる。本明細書に開示する本発明の組成物によって治療できる他の癌としては、以下に限定されないが、例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺癌、原発性脳腫瘍、胃癌、大腸癌、悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌状態の皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌などが挙げられる。

10

20

#### 【0056】

本明細書において「神経の疾患または障害」とは、神経系および/または視覚系の任意の疾患または障害を指す。「神経の疾患または障害」は、中枢神経系（脳、脳幹、小脳）、末梢神経系（脳神経を含む）、および自律神経系（その一部は、中枢神経系および末梢神経系の両方に配置されている）に關与する疾患または障害を含む。神経の疾患または障害として、以下に限定されないが、後天的てんかん性失語症、急性散在性脳脊髄炎、副腎白質ジストロフィー、加齢黄斑変性症、脳梁欠損症、失認症、アイカルディ症候群、アレキサンダー病、アルパーズ病、交代制片麻痺、アルツハイマー病、血管性認知症；筋萎縮性側索硬化症、無脳症、アンジェルマン症候群、血管腫症、酸素欠乏症、失語症、失行症、くも膜嚢胞、くも膜炎、アーノルド・キアリ奇形、動静脈奇形、アスペルガー症候群、血管拡張性運動失調症、注意欠陥多動性障害、自閉症、自律神経障害、背部痛、バツェン病、ベーチェット病、ベル麻痺、良性特発性眼瞼けいれん、良性焦点性、筋萎縮症、良性頭蓋内圧亢進症、ピンスワンガー病、眼瞼痙攣、プロッホサルズバーガー症候群、腕神経叢損傷、脳膿瘍、脳損傷、脳腫瘍（多形性膠芽腫を含む）、脊髄腫瘍、ブラウンセカール症候群、カナパン病、手根管症候群、カウザルギー、中枢性疼痛症候群、橋中心髄鞘崩壊、橈側障害、脳動脈瘤、脳動脈硬化症、脳萎縮、脳性巨人症、脳性麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病、化学療法誘発性神経障害および神経因性疼痛、キアリ奇形、舞蹈病、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、慢性疼痛、慢性局所疼痛症候群、コフィンローリー症候群、遷延性植物状態を含む昏睡、先天性顔面麻痺、大脳皮質基底核変性症、頭蓋動脈炎、頭蓋骨癒合症、クロイツフェルト・ヤコブ病、蓄積外傷疾患、クッシング症候群、巨細封入体病、サイトメガロウイルス感染、傍腫瘍性眼球クローヌス・ミオクローヌス運動失調（dancing eyes - dancing feet syndrome）、ダンディ・ウォーカー症候群、ドーソン病、De Morsier症候群、Dejerine-Klumke麻痺、認知症、皮膚筋炎、糖尿病性神経障害、びまん性硬化症、自律神経障害、書字障害、失読症、ジストニア、早期乳児てんかん性脳症、エンブティセラ症候群、脳炎、脳ヘルニア、脳三叉神経領域血管腫症、てんかん、エルブ麻痺、本態性振戦、ファブリー病、ファール症候群、失神、家族性痙攣性麻痺、熱性けいれん、フィッシャー症候群、フリードライヒ失調症、前頭側頭認知症およびその他の「タウオパチー」、ゴーシェ病

30

40

50



、ゲルストマン症候群；巨細胞性動脈炎、巨細胞性封入体病、球様細胞白質萎縮症、ギラン・バレー症候群、H T L V - 1 関連脊髄症、ハレル・スパッツ病気、頭部外傷、頭痛、片側顔面けいれん、遺伝性痙性対麻痺、遺伝性多発神経炎失調、耳帯状疱疹、帯状疱疹、平山症候群、H I V 関連認知症および神経障害（どちらもエイズの神経症状）、全前脳症、ハンチントン病およびその他のポリグルタミンリピート病、水無脳症、水頭症、副腎皮質機能亢進症、低酸素症、免疫介在性脳脊髄炎、封入体筋炎、色素失調症、乳児フィタン酸蓄積症、乳児レフサム病、乳児痙攣、炎症性ミオパチー、頭蓋内嚢胞、頭蓋内圧亢進、ジュベール症候群、カーズ - セイヤー症候群、ケネディ病、傍腫瘍性眼球クローヌス・ミオクローヌス運動失調（K i n s b o u r n e s y n d r o m e）、クリッペルファイル症候群、クラッペ病、クーゲルベルク - ヴェランダー病、クーラー、ラフォラ病、ランパー・イトン筋無力症候群、ランドウ・クレフナー症候群、横延髄（ウォレンバーグ）症候群、学習障害、リー病、レノックス - ガスター症候群、レッシュ - ナイハン症候群、白質ジストロフィー、レビー小体型認知症、滑脳症、閉じ込め症候群、ルー・ゲーリック病（すなわち、運動ニューロン疾患または筋萎縮性側索硬化症）、腰椎椎間板疾患、ライム病 - 神経学的後遺症、マシャド・ジョセフ病、大脳症、巨大脳髄症、メルカーソン - ローゼンタール症候群、メニエール病、髄膜炎、メンケス病、異染性白質ジストロフィー、小頭症、片頭痛、フィッシャー症候群、ミニストローク、ミトコンドリアミオパチー、メビウス症候群、平山病、運動ニューロン疾患、もやもや病、ムコ多糖症、多発性梗塞性認知症、多巣性運動ニューロパチー、多発性硬化症やその他の脱髄疾患；起立性低血圧と多系統萎縮症、筋ジストロフィー、重症筋無力症、びまん性硬化症、乳児のミオクローニ  
脳症、ミオクローヌス、筋疾患、先天性筋緊張症、ナルコレプシー、神経線維腫症；悪性  
症候群、エイズの神経症状、ループスの神経学的後遺症、神経性筋緊張症、神経セロイド  
リポフスチン症、神経移動障害、ニーマンピック病、オサリバン・マクラウド症候群、後  
頭神経痛、オカルト脊髄癒合不全配列、大田原症候群、オリーブ橋小脳萎縮症、オブソク  
ローヌスミオクローヌス、視神経炎、起立性低血圧、使い過ぎ症候群、知覚障害、神経変  
性疾患または障害（パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索  
硬化症（A L S）、認知症、多発性硬化症、および神経細胞死に関連するその他の疾患お  
よび障害）、先天性筋緊張性痙攣、腫瘍随伴性疾患、発作、ペリツェウス・メルツバッハ  
ー病、定期的な麻痺、末梢神経障害、有痛性神経障害および神経因性疼痛、遷延性植物状  
態、広汎性発達障害、光くしゃみ反射、フィタン酸蓄積症、ピック病ロンベルグ症候群パ  
リー病、圧迫神経、下垂体腫瘍、多発性筋炎、孔脳症、ポリオ後症候群、帯状疱疹後神経  
痛、感染後脳脊髄炎、起立性低血圧、プラダー・ウィリー症候群、原発性側索硬化症、プ  
リオン病、進行性顔面片側萎縮症、進行性多病巣性白質脳症、進行性硬化ポリオジストロ  
フィー（p r o g r e s s i v e s c l e r o s i n g p o l i o d y s t r o p h y）、プログレッシブ性核上性麻痺、偽脳腫瘍、ラムゼイ・ハント症候群（I型およびI  
I型）、ラスムッセン脳炎、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、レフサム病、反復  
運動障害、反復運動損傷、むずむず脚症候群、レトロウイルス関連脊髄症、レット症候群  
、ライ症候群、舞蹈病、サンドホフ病、シルダー病、裂脳症、中隔視神経異形成症、揺さ  
ぶられっ子症候群、帯状疱疹、シャイ・ドレーガー症候群、シェーグレン症候群、睡眠時  
無呼吸、ソトス症候群、痙攣、二分脊椎症、脊髄損傷、脊髄腫瘍、脊髄性筋萎縮症、全身  
硬直症候群、脳卒中、スタージ・ウェーバー症候群、亜急性硬化性全脳炎、皮質下動脈硬  
化性脳症、シデナム舞蹈病、失神、脊髄空洞症、遅発性ジスキネジー、テイ・サックス病  
、側頭動脈炎、テザード脊髄症候群（t e t h e r e d s p i n a l c o r d s y n d r o m e）、トムセン病、胸郭出口症候群、疼痛性チック、トッド麻痺、トゥレット  
症候群、一過性脳虚血発作、感染性海綿状脳症、横断性脊髄炎、外傷性脳損傷、振戦、三  
叉神経痛、熱帯性痙性対麻痺、結節性硬化症、血管性認知症（多発梗塞性認知症）、側頭  
動脈炎を含む血管炎、フォン・ヒッペル・リンドウ病、バレンベリー症候群、ウエルドニ  
ツヒ・ホフマン病、ウエスト症候群、むち打ち症、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、  
ならびにゼルウィガー症候群が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

増殖性疾患または障害として、以下に限定されないが、骨髄、リンパ、または赤血球系統から生じる造血系由来の過形成/新生物細胞、またはその前駆細胞を含む造血器腫瘍性疾患が挙げられる。これらは、以下に限定されないが、赤芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病 (APML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、以下に限定されないが、B-lineage ALLおよびT-lineage ALLを含む急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病 (PLL)、有毛細胞白血病 (HLL)、およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (WM) を含むリンパ系腫瘍を含む。悪性リンパ腫のさらなる形態として、以下に限定されないが、非ホジキンリンパ腫およびその変異体、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATL)、皮膚T細胞リンパ腫 (CTCL)、大型顆粒リンパ球性白血病 (LGF)、ホジキン病、ならびにリード-シュテルンベルク病があげられる。

10

## 【0058】

[ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物および分子]

標的：一実施形態において、該標的は、限定することなく無調ホモログ1 (ATOH1) に関連するセンスおよび/またはアンチセンスの非コードおよび/またはコード配列を含めた、ATOH1の核酸配列を含む。

## 【0059】

Atoh1、またはMath1は、聴覚系の周辺および中央部での細胞の発達にとって重要な塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス転写因子である。後脳において、菱脳唇でのAtoh1発現前駆細胞は、小脳顆粒細胞、深部小脳核、腹側蝸牛神経核、内側および外側前庭神経核における細胞、ならびにprecerebellar nucleiのサブセットを生じさせる (Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005)。これらの前駆細胞は、分裂し損なう、またはAtoh1 nullマウスで生成されないかのいずれかである (Ben-Arie et al., 1997)。末梢聴覚系において、Atoh1は、蝸牛の有毛細胞の分化および維持を指示するために必要かつ十分であり (Bermingham et al., 1999)、これらの細胞型におけるその役割はとらえどころのないままであるが、メルケル細胞、および関節軟骨細胞のサブセットにおいて発現している (Ben-Arie et al., 2000)。脊髄において、Atoh1は、中間階調に移入し、脊髄小脳路の交連ニューロンとして機能する背側由来介在ニューロンのサブセットを特定する (Bermingham et al., 2001; Helms and Johnson, 1998)。

20

30

## 【0060】

中枢神経系において、Atoh1は、菱脳唇として知られる発達途上の胚後脳におけるAtoh1が発現する背側から主に派生する、背側外側毛帯およびCNの核におけるニューロンの集団の特定にとって必要である (Akazawa et al., 1995; Ben-Arie et al., 1996; Wang et al., 2005)。

## 【0061】

ある実施形態では、ATOH1ファミリーメンバーに関連する疾患または障害を予防または治療するためにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いる。該アンチセンス化合物を用いて得られた幹細胞から再生された細胞/組織で治療可能な典型的な無調ホモログ1 (ATOH1) 媒介疾患または障害としては、ATOH1の機能異常および/または発現異常に関連する疾患または障害、癌、欠陥のあるp53のシグナル伝達経路に関連する疾患または障害、増殖性疾患または障害、神経疾患または障害、聴覚系に関連する疾患または障害 (例えば、難聴、部分的な難聴、内耳有毛細胞等の損傷または損失による前庭欠陥)、前庭系に関連する疾患または障害 (例えば、前庭有毛細胞の喪失、平衡障害など)、変形性関節症、Notchシグナル伝達経路に関連する疾患または障害、腸の疾患または障害 (例えば、大腸炎、腸炎など)、歯牙形成障害、意識的固有感覚に関連する疾患または障害、内受容に関連する疾患または障害、呼吸に関連する疾患または障害などが挙げられる。

40

## 【0062】

ある実施形態では、正常な対照と比較したときのATOH1の発現、機能、活性の異常

50

に関連する疾病または障害の予防または治療のために、1以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドによるA T O H 1の調節が、それを必要とする患者に対して与えられる。

【0063】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、限定しないが非コード領域を含むものであるA T O H 1のポリヌクレオチドに特異的である。A T O H 1標的は、A T O H 1の変異型；SNPを含むA T O H 1の突然変異体；A T O H 1の非コード配列；アレル、断片などを含む。好ましくは、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスRNA分子である。

【0064】

本発明の実施形態によれば、標的核酸分子は、A T O H 1ポリヌクレオチドのみに限定されず、A T O H 1の任意のアイソフォーム、受容体、ホモログ、非コード領域などにも及ぶ。

10

【0065】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、以下に限定されないが変異型、アレル、ホモログ、突然変異体、誘導體、断片およびそれらの相補配列を含むA T O H 1標的の天然アンチセンス配列（コード領域および非コード領域の天然アンチセンス）を標的にする。好ましくは、該オリゴヌクレオチドはアンチセンスRNAまたはDNA分子である。

【0066】

ある実施形態では、本発明のオリゴマー化合物は、化合物における1以上のヌクレオチド位置に異なる塩基が存在する変異型も含む。例えば最初のヌクレオチドがアデニンである場合、この位置にチミジン、グアノシンまたはシチジンまたは他の天然または非天然ヌクレオチドを有する変異型が作られ得る。これは、アンチセンス化合物の任意の位置において行われ得ることができる。次にこれらの化合物を、標的核酸の発現を抑制するそれらの能力を測定するべく本明細書において記載の方法を使用して検査する。

20

【0067】

いくつかの実施形態において、アンチセンス化合物と標的との間の相同性、配列同一性または相補性は、約50%～約60%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約60%～約70%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約70%～約80%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約80%～約90%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%である。

30

【0068】

アンチセンス化合物は、化合物の標的核酸への結合が標的核酸の正常な機能に干渉して活性の消失を生じさせ、特異的な結合が望ま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が回避されるのに十分な程度の相補性がある場合に特異的にハイブリダイズできる。そのような条件は、すなわち生体内アッセイおよび治療的処置の場合での生理的条件、および体外アッセイの場合でのアッセイが実施される条件を含む。

【0069】

アンチセンス化合物は、DNA、RNA、キメラ、置換物などにかかわらず、化合物の標的DNAまたはRNA分子への結合が標的DNAまたはRNAの正常な機能に干渉して有用性の消失を生じさせ、特異的な結合が望まれる条件下（すなわち生体内アッセイおよび治療的処置の場合での生理的条件、および体外アッセイの場合でのアッセイが実施される条件）でアンチセンス化合物の非標的配列への非特異的結合が回避されるのに十分な程度の相補性がある場合に、特異的にハイブリダイズできる。

40

【0070】

ある実施形態では、以下に限定しないが、例えばPCR、ハイブリダイゼーションなどを用いて同定され伸張されたアンチセンス配列、配列番号2乃至5に記載される1以上の配列ほか、を含むA T O H 1の標的化は、A T O H 1の発現または機能を調節する。一実施形態において発現または機能は、対照と比較してアップレギュレートされる。他の好ましい実施形態において発現または機能は、対照と比較してダウンレギュレートされる。

50

## 【0071】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCR、ハイブリダイゼーションなどを使用して同定および増やされるアンチセンス配列を含む配列番号3および4に記載の核酸配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾されたヌクレオチド、より短いまたはより長い断片、修飾された結合などを含み得る。修飾された結合またはヌクレオチド間結合の例には、ホスホロオチオエート、ホスホロジチオエートなどを含まれる。ある実施形態では、該ヌクレオチドは、リン誘導体を含む。本発明の修飾されたオリゴヌクレオチド中の糖部分または糖類似成分に結合できるリン誘導体（または修飾されたリン酸基）は、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、アルキルリン酸塩、アルカンリン酸塩、ホスホロオチオエートなどであり得る。上に記載のリン酸類似体の調製およびそれらのヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドへの組み込みそれぞれは、周知であり、本明細書で説明する必要はない。

10

## 【0072】

アンチセンスの特異性および感受性も、治療的使用のために当業者が利用する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトでの病態の治療において治療用成分として使用されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、安全にかつ効果的にヒトに投与されており、多数の臨床検査が現在進行中である。したがってオリゴヌクレオチドが、細胞、組織および動物、特にヒトの治療のための治療レジメンにおいて有用であるように構成され得る有用な治療方法であり得ることが確立されている。

20

## 【0073】

本発明の実施形態においてオリゴマーアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドは、標的核酸分子に結合し、標的遺伝子によってコードされる分子の発現および/または機能を調節する。干渉されるDNAの機能には、例えば複製および転写が含まれる。干渉されるRNAの機能には、例えばタンパク質翻訳部位へのRNAの転移、RNAからのタンパク質の翻訳、1以上のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAが関与し得るまたはRNAによって促進され得る触媒活性などの全ての生体機能が含まれる。機能は、所望の機能に応じてアップレギュレートまたは抑制され得る。

## 【0074】

アンチセンス化合物は、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、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、プライマー、プローブおよび標的核酸の少なくとも一部分にハイブリダイズする他のオリゴマー化合物を含む。したがって、これらの化合物は1本鎖、2本鎖、部分的な1本鎖または環状オリゴマー化合物の形態に導入され得る。

30

## 【0075】

本発明の文脈においてアンチセンス化合物を特定の核酸分子に標的化することは、多段階プロセスであり得る。通常、このプロセスは、機能が調節される標的核酸の同定で始まる。この標的核酸は、例えばその発現が特定の障害または病態に関連する細胞遺伝子（または遺伝子から転写されたmRNA）または感染病原体由来の核酸分子であり得る。本発明において標的核酸は、無調ホモログ1(A TO H 1)をコードする。

## 【0076】

通常、標的化プロセスは所望の効果、例えば発現の調節が得られるようなアンチセンス相互作用が生じる標的核酸中の少なくとも1つの標的領域、セグメントまたは部位の決定も含む。本発明の文脈において用語「領域」は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能または特徴を有する標的核酸の一部分と定義される。標的核酸の領域内は、セグメントである。「セグメント」は、標的核酸内の領域のより小さな部分すなわちサブ部分と定義される。本発明において使用される「部位」は、標的核酸内の位置として定義される。

40

## 【0077】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1(A TO H 1)の天然アンチセンス配列に結合し、A TO H 1(配列番号1)の発現および/または機能を調節する。アンチセンス配列の例は、配列番号2乃至4を含む。

50

## 【0078】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドの1以上のセグメントに結合し、A T O H 1の発現および/または機能を調節する。セグメントは、A T O H 1のセンスまたはアンチセンスポリヌクレオチドの少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含む。

## 【0079】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、A T O H 1の天然アンチセンス配列に特異的であり、該オリゴヌクレオチドのA T O H 1の天然アンチセンス配列への結合はA T O H 1の発現および/または機能を調節する。

## 【0080】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチド化合物は配列番号3乃至6に記載の配列、例えばPCR、ハイブリダイゼーションなどを使用して同定および伸張されるアンチセンス配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾されたヌクレオチド、より短いまたはより長い断片、修飾された結合などを含み得る。修飾された結合またはヌクレオチド間結合の例には、ホスホロオチオエート、ホスホロジチオエートなどを含む。他の好ましい実施形態においてヌクレオチドは、リン誘導体を含まれる。本発明の修飾されたオリゴヌクレオチド中の糖部分または糖類似成分に結合できるリン誘導体(または修飾されたリン酸基)は、一リン酸塩、二リン酸塩、三リン酸塩、アルキルリン酸塩、アルカンリン酸塩、ホスホロオチオエートなどであり得る。上に記載のリン酸類似体の調製およびそれらのヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドへの組み込みそれ自体は、周知であり、本明細書で説明する必要はない。

## 【0081】

当技術分野において周知であるとおり、翻訳開始コドンが典型的には5' - A U G (転写されたmRNA分子における場合; 対応するDNA分子においては5' - A T G)であることから、翻訳開始コドンは、「A U Gコドン」、「開始コドン」または「A U G開始コドン」とも称される。少数の遺伝子は、RNA配列5' - G U G、5' - U U Gまたは5' - C U Gを有する翻訳開始コドンを有し、5' - A U A、5' - A C Gおよび5' - C U Gは生体内において機能することが示されている。したがって用語「翻訳開始コドン」および「開始コドン」は、開始アミノ酸は各例において典型的にはメチオニン(真核生物において)またはホルミルメチオニン(原核生物において)であるが、多数のコドン配列を包含し得る。真核生物および原核生物の遺伝子は、2以上の選択的開始コドンを有し、そのいずれでも特定の細胞型または組織において、または特定の条件下で翻訳開始のために優先的に利用され得る。本発明の文脈において「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、そのようなコドンの配列にかかわらず、無調ホモログ1 (A T O H 1)をコードする遺伝子から転写されたmRNAの翻訳を開始するために生体内で使用される1以上のコドンを意味する。遺伝子の翻訳終止コドン(または「終止コドン」)は、3つの配列、すなわち5' - U A A、5' - U A Gおよび5' - U G A (対応するDNA配列は、それぞれ5' - T A A、5' - T A Gおよび5' - T G Aである)のうちの1つを有し得る。

## 【0082】

用語「開始コドン領域」および「翻訳開始コドン領域」は、翻訳開始コドンからいずれかの方向(すなわち5'または3')での連続する約25から約50ヌクレオチドを包含するそのようなmRNAまたは遺伝子の一部分を指す。同様に、用語「終止コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」は、翻訳終止コドンからいずれかの方向(すなわち5'または3')での連続する約25から約50ヌクレオチドを包含するそのようなmRNAまたは遺伝子の一部分を指す。結局、「開始コドン領域」(または「翻訳開始コドン領域」)および「終止コドン領域」(または「翻訳終止コドン領域」)は、本発明のアンチセンス化合物で効果的に標的化され得る全ての領域である。

## 【0083】

当技術分野において翻訳開始コドンと翻訳終止コドンとの間の領域を意味することが周知のオープンリーディングフレーム(ORF)すなわち「コード領域」も、効果的に標的

10

20

30

40

50

化され得る領域である。本発明の文脈において標的化された領域は、遺伝子のオープン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含む遺伝子内領域である。

【0084】

他の標的領域は、当技術分野において翻訳開始コドンから5'方向にあるmRNAの一部を意味することが周知の5'非翻訳領域（5'UTR）を含み、したがって5'キャップ部位とmRNA（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）の翻訳開始コドンとの間のヌクレオチドを含む。さらに他の標的領域は、当技術分野において翻訳終止コドンから3'方向にあるmRNAの一部を指すことが周知の3'非翻訳領域（3'UTR）を含み、したがって翻訳終止コドンとmRNA（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）の3'末端との間のヌクレオチドを含む。mRNAの5'キャップ部位は、5'-5'トリリン酸結合を介してmRNAの最も5'側の残基に結合したN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造それ自体およびキャップ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。本発明の他の標的領域は、5'キャップ領域である。

10

【0085】

いくつかの真核生物mRNA転写物は、直接翻訳されるが、大部分は、それが翻訳される前に転写物から切除される「イントロン」として周知の1以上の領域を含む。残りの（したがって翻訳される）領域は「エクソン」として周知であり、連続的なmRNA配列を形成するように一緒にスプライスされる。一実施形態において標的スプライス部位、すなわちイントロン-エクソン接合部またはエクソン-イントロン接合部は、異常なスプライシングが疾患に関与するまたは特定のスプライス産物の過剰産生が疾患に関与する状況において特に有用である。再配置または欠失による異常な融合接合は、標的部位の他の実施形態である。異なる遺伝子源由来の2つ（またはそれ以上）のmRNAのスプライシングのプロセスを介して生成されたmRNA転写物は、「融合転写物」として周知である。イントロンは、例えばDNAまたはプレmRNAを標的化するアンチセンス化合物を使用して効果的に標的化され得る。

20

【0086】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドのコード領域および/または非コード領域に結合し、標的分子の発現および/または機能を調節する。

30

【0087】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然アンチセンスポリヌクレオチドに結合し、標的分子の発現および/または機能を調節する。

【0088】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、センスポリヌクレオチドに結合し、標的分子の発現および/または機能を調節する。

【0089】

選択的RNA転写物は、DNAの同じ遺伝子領域から生成され得る。これらの選択的転写物は、一般に「変異型」として周知である。より詳細には「プレmRNA変異型」は、同じゲノムDNAから生成される転写物であり、同じゲノムDNAから生成される他の転写物とはそれらの開始または終止位置のいずれかにおいて異なり、イントロンおよびエクソン配列の両方を含む。

40

【0090】

スプライシングでの1以上のエクソンまたはイントロン領域またはそれらの一部分の切除において、プレmRNA変異型は、より小さな「mRNA変異型」を生成する。結果としてmRNA変異型は、プレmRNA変異型にプロセッシングされ、それぞれ特有なプレmRNA変異型はスプライシングの結果として特有なmRNA変異型を常に生成する。これらのmRNA変異型は、「選択的スプライス変異型」としても周知である。プレmRNA変異型のスプライシングが生じない場合は、プレmRNA変異型はmRNA変異型と同一

50

である。

【0091】

変異型は、転写を開始するまたは終止するための選択的シグナルの使用を通じても生成され得る。プレmRNAおよびmRNAは、2以上の開始コドンまたは終止コドンを有し得る。選択的開始コドンを使用するプレmRNAまたはmRNA由来の変異型は、プレmRNAまたはmRNAの「選択的開始変異型」として周知である。選択的終止コドンを使用するこれらの転写物は、プレmRNAまたはmRNAの「選択的終止変異型」として周知である。選択的終止変異型の特定の1種類は、機械的な転写による「ポリA終止シグナル」のうちの1つの代替選択から生じる、多数の転写物が生成される「ポリA変異型」であり、それにより特有なポリA部位で終結する転写物が生成される。本発明の文脈において、本明細書に記載される種類の変異型も標的核酸の実施形態である。

10

【0092】

アンチセンス化合物がハイブリダイズする標的核酸上の位置は、活性アンチセンス化合物が標的化される標的領域の少なくとも5ヌクレオチド長の部分として定義される。

【0093】

特定の典型的な標的セグメントの特定の配列が本明細書に記載されているが、当業者はこれらが本発明の範囲内の具体的実施形態を例示し説明するために利用できることを理解されよう。追加の標的セグメントは、本開示を考慮して当業者によって容易に特定される。

【0094】

例示的な好ましい標的セグメント内から選択された少なくとも5つ(5個)の連続的ヌクレオチド範囲を含む長さ5~100ヌクレオチドの標的セグメントは、同様に標的化に適すると考えられる。

20

【0095】

標的セグメントは、例示的な好ましい標的セグメントの1つの5'末端由来の少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含むDNAまたはRNA配列を含み得る(残りのヌクレオチドは、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が約5~約100ヌクレオチドを含むまで続く同じDNAまたはRNAの連続的範囲である)。同様に好ましい標的セグメントは、例示的な好ましい標的セグメントの1つの3'末端由来の少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含むDNAまたはRNA配列によって表される(残りのヌクレオチドは、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が約5~約100ヌクレオチドを含むまで続く同じDNAまたはRNAの連続的範囲である)。本明細書において例示される標的セグメントを用いる当業者は、過度の実験を行うことなくさらなる好ましい標的セグメントを特定できよう。

30

【0096】

一旦1以上の標的領域、セグメントまたは部位が特定されると、所望の効果を得るために標的に十分に相補的である、すなわち十分にハイブリダイズし、かつ十分な特異性を有するアンチセンス化合物が選択される。

【0097】

本発明の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、特定の標的のアンチセンス鎖に結合する。オリゴヌクレオチドは、長さ少なくとも5ヌクレオチドであり、各オリゴヌクレオチドが重複する配列を標的化するように合成することができ、したがってオリゴヌクレオチドは標的ポリヌクレオチドの長さ全体に及ぶように合成される。標的はコード領域および非コード領域も含む。

40

【0098】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって特定の核酸を標的化することは好ましい。特定の核酸に対するアンチセンス化合物の標的化は、多段階プロセスである。通常、このプロセスは、その機能が調節される核酸配列の同定で始まる。これは、例えばその発現が特定の障害または病態に関連する細胞遺伝子(または遺伝子から転写されるmRNA)または例えば非翻訳RNA(ncRNA)などの非翻訳ポリヌクレオチ

50

ドであり得る。

【0099】

RNAは、(1)タンパク質に翻訳されるメッセンジャーRNA(mRNA)、および(2)非タンパク質コードRNA(ncRNA)に分類され得る。ncRNAはマイクロRNA、アンチセンス転写物および高密度の終止コドンを含んでおり、いかなる「オープンリーディングフレーム」も欠いている他の転写単位(TU)を含む。多くのncRNAは、タンパク質コード遺伝子座の3'非翻訳領域(3'UTR)中の開始部位から始まると考えられる。ncRNAはまれにしかなく、FANTOMコンソーシアムによって配列決定されているncRNAの少なくとも半分はポリアデニル化されていないと考えられている。明らかな理由により大部分の研究者は、プロセシングされ、細胞質に排出されるポリアデニル化されたmRNAに注目している。近年、一連のポリアデニル化されていない核内RNAが非常に多い場合があり、そのような転写物の多くがいわゆる遺伝子間領域から生じることが示された。ncRNAが遺伝子発現を制御し得る機構は、標的転写物との塩基対形成によるものである。塩基対形成によって機能するRNAは、(1)作用するRNAと同じ遺伝子座だが反対の鎖上にコードされ、したがってそれらの標的に対して完全な相補性を示すシスコードの(cis-encoded)RNA、および(2)作用するRNAとは異なる染色体上の位置にコードされ、一般にそれらの標的と完全な塩基対形成可能性を示さないトランスコードの(trans-encoded)RNAに分類され得る。

10

【0100】

理論による束縛を意図しないが、本明細書に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドによるアンチセンスポリヌクレオチドの変化は、対応するセンスメッセンジャーRNAの発現を変化させ得る。しかしこの制御は、不調和性(アンチセンスノックダウンがセンスメッセンジャーRNAの増加を生じる)または調和性(アンチセンスノックダウンが付随するセンスメッセンジャーRNAの減少を生じる)のいずれであっても良い。これらの場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖の重複したまたは重複していない部分に標的化され得、そのノックダウンまたは隔離を生じる。コードおよび非コードアンチセンスは、同一の手段で標的化でき、どちらの分類も対応するセンス転写物を、調和性または不調和性の手段のいずれかで制御できる。標的に対する使用のための新規オリゴヌクレオチドを同定することに使用される戦略は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるアンチセンスRNA転写物のノックダウンまたは所望の標的を調節するための任意の他の手段に基づき得る。

20

30

【0101】

戦略1:不調和性調節の場合、アンチセンス転写のノックダウンが、通常(センス)遺伝子の発現を増加させる。後者の遺伝子が周知のまたは推定上の薬物標的をコードする場合は、そのアンチセンス対応物のノックダウンは受容体アゴニストまたは酵素刺激物質の作用をおそらく模倣し得よう。

【0102】

戦略2:調和性調節の場合、アンチセンスおよびセンス転写物の両方を同時にノックダウンすることができ、従って通常(センス)遺伝子発現の相乗的低減を達成する。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドがノックダウンを達成するために使用される場合、この戦略は、センス転写物に標的化された1つのアンチセンスオリゴヌクレオチドと対応するアンチセンス転写物に対する他のアンチセンスオリゴヌクレオチドとに、または重複しているセンスおよびアンチセンス転写物を同時に標的化する単一のエネルギー的に対称なアンチセンスオリゴヌクレオチドに適用するために使用することができる。

40

【0103】

本発明によれば、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、siRNA化合物などの1本鎖または2本鎖RNA干渉(RNAi)化合物、および標的核酸の少なくとも一部分にハイブリダイズし、その機能を調節する他のオリゴマー化合物を含む。したが

50



ってそれらはDNA、RNA、DNA様、RNA様、またはそれらの混合物であり得る、またはこれらの1つまたは複数の模倣物であり得る。これらの化合物は、1本鎖、2本鎖、環状またはヘアピンオリゴマー化合物であって良く、内部または末端の膨隆部、ミスマッチまたはループなどの構造要素を含み得る。アンチセンス化合物は、通常は直鎖状に調製されるが、環状および/または分枝状に結合されるかまたはそうでなければ調製される。アンチセンス化合物は、例えば全体的または部分的な2本鎖化合物を形成するようにハイブリダイズした2本の鎖、または全体的または部分的な2本鎖化合物のハイブリダイゼーションおよび形成を可能にするために十分な自己相補性を有する1本鎖などの構築物を含み得る。2本鎖は、遊離の3'または5'末端を残すように内部で結合され得るか、または連続的ヘアピン構造またはループを形成するように結合され得る。ヘアピン構造は、5'または3'末端のいずれかにオーバーハングを含み得、1本鎖形質の伸長を生じる。場合により2本鎖化合物は、両末端にオーバーハングを含み得る。さらなる修飾は、末端のうちの1つ、選択されたヌクレオチド位置、糖位置またはヌクレオチド間結合のうちの1つに結合した複合基を含み得る。あるいは、本鎖は、非核酸成分またはリンカー基を介して連結され得る。1本だけの鎖から形成される場合dsRNAは、2重鎖を形成するためにそれ自体の上に折りたたまれる自己相補性ヘアピン型分子の形態を取り得る。したがってdsRNAは、完全にまたは部分的に2本鎖であり得る。遺伝子発現の特異的な調節は、遺伝子導入細胞系におけるdsRNAヘアピンの安定な発現によって達成され得るが、いくつかの実施形態においては、遺伝子の発現または機能は、アップレギュレートされる。2本鎖、または2重鎖を形成するためにそれ自体の上に折りたたまれる自己相補性ヘアピン型分子の形態を取る1本鎖から形成される場合、2本鎖（または1本鎖の2重鎖形成領域）は、ワトソン-クリック型と同様に塩基対形成する相補的RNA鎖である。

10

20

30

40

50

#### 【0104】

一旦系に導入されると本発明の化合物は、標的核酸の切断または他の修飾に影響する1種以上の酵素または構造タンパク質の作用を誘発できる、または占有に基づく機構を介して作用できる。一般に核酸（オリゴヌクレオチドを含む）は、「DNA様」（すなわち一般に1つまたは複数の2'-デオキシ糖を有し、一般にU塩基よりもT塩基を有する）または「RNA様」（すなわち一般に1つまたは複数の2'-ヒドロキシ糖または2'-修飾糖を有し、一般にT塩基よりもU塩基を有する）と記載され得る。核酸ヘリックスは、1つより多い種類の構造を、最も通例ではA-形態およびB-形態をとり得る。一般にB-形態様構造を有するオリゴヌクレオチドは「DNA様」であり、A-形態様構造を有するものは「RNA様」であると考えられる。いくつかの（キメラ）実施形態においてアンチセンス化合物は、A-およびB-形態領域の両方を含み得る。

#### 【0105】

ある実施形態では、所望のオリゴヌクレオチドまたはアンチセンス化合物は、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド；修飾された結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド；干渉RNA（RNAi）、低分子干渉RNA（siRNA）；マイクロ干渉RNA（miRNA）；低分子一過的RNA（stRNA）；または低分子ヘアピンRNA（shRNA）；低分子RNA誘導遺伝子活性化（RNAa）；低分子活性化RNA（saRNA）またはこれらの組み合わせのうちの少なくとも1つを含む。

#### 【0106】

dsRNAは、遺伝子発現、「低分子RNA誘導遺伝子活性化」またはRNAaと称されている機構も活性化できる。遺伝子プロモーターを標的化するdsRNAは、関連する遺伝子の強力な転写活性化を誘導する。RNAaは、合成dsRNAを使用してヒト細胞において実証され、「低分子活性化RNA」（saRNA）と称された。RNAaが他の生体においても保存されているのか否かは現在のところ不明である。

#### 【0107】

低分子干渉RNA（siRNA）およびマイクロRNA（miRNA）などの低分子2本鎖RNA（dsRNA）は、RNA干渉（RNAi）として周知の進化的に保存された

機構のトリガであることが見出されている。RNA<sub>i</sub>は、クロマチンの再構築を介して遺伝子発現抑制を導きそれにより転写を抑制し、相補的mRNAを分解し、またはタンパク質翻訳を遮断する。しかし、下の実施例の節において詳細に記載される例においては、オリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドおよびそれにコードされる産物の発現および/または機能を増加させることが示されている。dsRNAは低分子活性化RNA (saRNA) としても作用できる。理論に束縛されることなく、遺伝子プロモーター中の配列を標的化することによって、saRNAはdsRNA誘発転写活性化 (RNA<sub>a</sub>) と称される現象において標的遺伝子発現を誘導する。

**【0108】**

さらなる実施形態において、本明細書において同定する「好ましい標的セグメント」は、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチドの発現を調節する追加的化合物の選別において使用され得る。「調節物質」は、A T O H 1をコードする核酸分子の発現を減少または増加させ、好ましい標的セグメントに相補的である少なくとも5個のヌクレオチド部分を含む化合物である。選別方法は、A T O H 1のセンスまたは天然アンチセンスポリヌクレオチドをコードする核酸分子の好ましい標的セグメントを1つまたは複数の候補調節物質に接触させる工程、およびA T O H 1ポリヌクレオチド、例えば配列番号3および4をコードする核酸分子の発現を減少または増加させる1つまたは複数の候補修飾物質を選択する工程を含む。1以上の候補調節物質が、A T O H 1ポリヌクレオチドをコードする核酸分子の発現を調節できる (例えば減少させるまたは増加させる) ことが一度示されれば、次いで調節物質は、A T O H 1ポリヌクレオチドの機能のさらなる調査研究において、または本発明による研究、診断または治療剤としての使用のために使用され得る。

10

20

**【0109】**

天然アンチセンス配列のターゲティングは、例えばA T O H 1遺伝子 (例えば受託番号NM\_\_005172) の機能を調節する。ある実施形態において、標的は、A T O H 1遺伝子のアンチセンスポリヌクレオチドである。ある実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、A T O H 1ポリヌクレオチド (受託番号NM\_\_005172) のセンスおよび/または天然アンチセンス配列、変異型、アレル、アイソフォーム、ホモログ、突然変異体、誘導體、断片およびそれらの相補配列を標的化する。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンス分子であり、標的はアンチセンスおよび/またはセンスA T O H 1ポリヌクレオチドのコード領域および非コード領域を含む。

30

**【0110】**

本発明の好ましい標的セグメントは、本発明のそれぞれの相補的アンチセンス化合物と安定化された2本鎖 (2重鎖) オリゴヌクレオチドを形成するように組み合わせられ得る。

**【0111】**

そのような2本鎖オリゴヌクレオチド成分は、当技術分野において標的発現を調節し、アンチセンス機構を介して翻訳およびRNAプロセッシングを制御すると示されている。さらに2本鎖成分は化学修飾に供され得る。例えばその様な2本鎖成分は、2重鎖アンチセンス鎖の標的への古典的ハイブリダイゼーションによって標的を抑制することが示されており、それにより標的の酵素的分解のトリガとなる。

40

**【0112】**

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチド (例えば受託番号NM\_\_005172)、変異型、アレル、アイソフォーム、ホモログ、突然変異体、誘導體、断片およびそれらの相補配列を標的化する。好ましくはオリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。

**【0113】**

本発明の実施形態によれば、標的核酸分子は、A T O H 1だけに限定されず、任意のアイソフォーム、受容体、ホモログおよびA T O H 1分子に及ぶ。

**【0114】**

ある実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、A T O H 1ポリヌクレオチドの天然アンチセンス配列、例えば配列番号2に記載のポリヌクレオチドおよび任意の変異型、アレル

50

、ホモログ、突然変異体、誘導體、断片およびそれらの相補配列を標的化する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、配列番号3および4として記載されている。

【0115】

一実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、これに限定しないがA T O H 1ポリヌクレオチドに関連する非コードセンス配列および/またはアンチセンス配列が含まれる、A T O H 1アンチセンスの核酸配列に相補的であるかまたは結合し、A T O H 1分子の発現および/または機能を調節する。

【0116】

ある実施形態では、該オリゴヌクレオチドは、配列番号2に記載のA T O H 1天然アンチセンスの核酸配列に相補的であるかまたは結合し、A T O H 1分子の発現および/または機能を調節する。

10

【0117】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号3および4の少なくとも5個の連続する核酸塩基の配列を含み、A T O H 1分子の発現および/または機能を調節する。

【0118】

ポリヌクレオチド標的は、そのファミリーメンバーを含めたA T O H 1、A T O H 1の変異型；SNPを含むA T O H 1の突然変異体；A T O H 1の非コード配列；A T O H 1のアレル；種の変異型、断片などを含む。好ましくはオリゴヌクレオチドはアンチセンス分子である。

【0119】

ある実施形態では、A T O H 1ポリヌクレオチドを標的化するオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNA、干渉RNA (RNAi)、低分子干渉RNA (siRNA)；マイクロ干渉RNA (miRNA)；低分子一過的RNA (stRNA)；または短いヘアピンRNA (shRNA)；低分子RNA誘導遺伝子活性化 (RNAa)；または低分子活性化RNA (saRNA)を含む。

20

【0120】

ある実施形態では、無調ホモログ1 (A T O H 1) ポリヌクレオチド、例えば配列番号2乃至4の標的化は、これらの標的の発現または機能を調節する。一実施形態において発現または機能は対照と比較してアップレギュレートされる。ある実施形態において、発現または機能は対照と比較してダウンレギュレートされる。

30

【0121】

ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号3および4に記載の配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾された核酸塩基、より短いまたはより長い断片、修飾された結合などを含み得る。

【0122】

ある実施形態では、配列番号3および4は、1つまたは複数のLNAヌクレオチドを含む。表1は、本発明の方法において有用な典型的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを示す。

【表1】

配列番号	アミノ酸配列名	配列
配列番号NO3	CUR-1488	A*G*C*C*A*A*C*T*G*C*C*C*T*T*G*T*T*A
配列番号NO4	CUR-1489	T*C*T*A*G*T*A*G*T*G*T*C*A*A*A*C*G*C*A

40

【0123】

所望の標的核酸の調節は、当技術分野において周知のいくつかの方法において実施され得る。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAなど。酵素的核酸分子(例えばリボザイム)は、ヌクレオチド塩基配列に特異的な方式で他の別々の核酸分子を繰り返し切断する能力を含む種々の反応の1以上を触媒できる核酸分子である。そのような酵素的核酸分子は、例えば実質的にいかなるRNA転写物を標的化するのにも使用され得る。

50

## 【0124】

それらの配列特異性により、トランス切断酵素的核酸分子は、ヒト疾患に対する治療剤としての有望さを示。酵素的核酸分子は、細胞性RNA背景中で特定のRNA標的を切断するために設計され得る。そのような切断事象はmRNAを非機能的にし、かつそのRNAからのタンパク質発現を抑制する。このようにして、病態に関連するタンパク質の合成は選択的に抑制され得る。

## 【0125】

通常、RNA切断活性を有する酵素的核酸は、最初に標的RNAに結合することによって作用する。そのような結合は、標的RNAを切断するために作用する分子の酵素的部分に近接に保持される酵素的核酸の標的結合部分を通じて生じる。したがって酵素的核酸分子は、最初に標的RNAを認識し、次いで相補的塩基対形成を通じて結合し、一旦正確な部位に結合すると標的RNAを切断するために酵素的に作用する。そのような標的RNAの戦略的切断は、コードされているタンパク質の合成を方向付けるその能力を破壊する。酵素的核酸がそのRNA標的に結合および切断した後、それはRNAから解離し、別の標的を探して反復して新たな標的に結合し、切断できる。

10

## 【0126】

体外選択(進化的)戦略(Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B205, 435)などのいくつかの手法が、ホスホジエステル結合およびアミド結合の切断および連結などの種々の反応を触媒できる新規核酸触媒を発展させるために使用されている。

20

## 【0127】

触媒活性のために最適ナリボザイムの開発は、遺伝子発現制御の目的のためにRNA切断リボザイムを使用するいかなる戦略にも顕著に貢献する。例えばハンマーヘッド型リボザイムは、飽和(10mM)濃度のMg<sup>2+</sup>補助因子の存在下で触媒速度(kcat)約1分<sup>-1</sup>で機能する。人工的「RNAリガーゼ」リボザイムは、対応する自己修飾反応を約100分<sup>-1</sup>の速度で触媒することが示されている。加えてDNAから作られた基質結合腕を有するある種の修飾されたハンマーヘッド型リボザイムは、約100分<sup>-1</sup>に近い多重代謝回転速度でRNA切断を触媒することが周知である。最後にハンマーヘッドの触媒コア中の特定の残基の特定のヌクレオチド類似体での置換は、触媒速度に10倍程度の改善を示す修飾されたリボザイムをもたらす。これらの発見は、リボザイムが、ほとんどの天然の自己切断リボザイムによって体外で示されるものより顕著に大きな触媒速度での化学的形質転換を促進できることを示す。それにより、ある種の自己切断リボザイムの構造は、最大の触媒活性をもたらすように最適化され得る、またはRNAホスホジエステル切断について顕著に早い速度を示す完全に新規のRNAモチーフが作製され得ることが可能である。

30

## 【0128】

「ハンマーヘッド」モデルにあてはまるRNA触媒によるRNA基質の分子間切断は、1987年に最初に示された(Uhlenbeck, O.C. (1987) Nature, 328: 596-600)。RNA触媒は、回収され、複数のRNA分子と反応し、それが真に触媒作用的であることを示した。

40

## 【0129】

「ハンマーヘッド」モチーフに基づいて設計された触媒RNAは、標的配列に必要な塩基対形成を維持するために触媒RNA中に適切な塩基変更を作製することによって特定の標的配列を切断するために使用されている。これは、特定の標的配列を切断するための触媒RNAの使用を可能にし、「ハンマーヘッド」モデルによって設計された触媒RNAが生体内で特定の基質RNAを切断できる可能性があることを示している。

## 【0130】

RNA干渉(RNAi)は、哺乳動物および哺乳動物細胞における遺伝子発現を調節するための強力な手段になっている。この手法は、発現プラスミドまたはウイルスおよび、siRNAにプロセッシングされる低分子ヘアピンRNAのコード配列を使用するRNAそ

50

れ自体としてまたはDNAとしてのいずれかでの低分子干渉RNA ( siRNA ) の送達を必要とする。この系は、presRNAのそれらが活性である細胞質への効率的な輸送を可能にし、遺伝子発現のために制御された組織特異的なプロモーターの使用を可能にする。

#### 【0131】

ある実施形態では、オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス化合物は、リボ核酸 ( RNA ) および / 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またはそれらの模倣物、キメラ、アナログまたはホモログを含む。この用語は、天然に存在するヌクレオチド、糖およびヌクレオチド間 ( 骨格 ) 共有結合ならびに同様に機能する天然に存在しない部分を含むオリゴヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾されたまたは置換されたオリゴヌクレオチドは、例えば細胞への増強された取り込み、標的核酸に対する増強された親和性およびヌクレアーゼの存在下での増大した安定性などの望ましい特性からしばしば天然形態よりも望ましい。

10

#### 【0132】

本発明により、オリゴヌクレオチドまたは「アンチセンス化合物」は、アンチセンスオリゴヌクレオチド ( 例えばRNA、DNA、それらの模倣物、キメラ、アナログまたはホモログ )、リボザイム、外部ガイド配列 ( EGS ) オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、siRNA化合物などの1本鎖または2本鎖RNA干渉 ( RNAi ) 化合物、saRNA、aRNAおよび標的核酸の少なくとも一部分にハイブリダイズしその機能を調節する他のオリゴマー化合物を含む。そのようにそれらは、DNA、RNA、DNA様、RNA様またはそれらの混合物であり得るか、またはこれらの1つまたは複数の模倣物であり得る。これらの化合物は、1本鎖、2本鎖、環状またはヘアピンオリゴマー化合物であることができ、内部または末端の膨隆部、ミスマッチまたはループなどの構造要素を含み得る。アンチセンス化合物は、通常は直鎖状に調製されるが、環状および / または分枝状に結合されるかまたはそうでなければ調製され得る。アンチセンス化合物は、例えば全体的または部分的な2本鎖化合物を形成するようにハイブリダイズした2本の鎖、または全体的または部分的な2本鎖化合物のハイブリダイゼーションおよび形成を可能にするために十分な自己相補性を有する1本鎖などの構築物を含み得る。2本の鎖は、遊離の3'または5'末端を残すように内部で結合され得るか、または連続的ヘアピン構造またはループを形成するように結合され得る。ヘアピン構造は、1本鎖形質の伸長を生じさせるために5'または3'末端のいずれかにオーバーハングを含有できる。場合により2本鎖化合物は、両末端にオーバーハングを含み得る。さらなる修飾は、末端のうちの1つ、選択されたヌクレオチド位置、糖位置またはヌクレオチド間結合のうちの1つに結合した複合基を含み得る。代替として2本の鎖は、非核酸成分またはリンカー基を介して結合できる。1本鎖だけから形成される場合dsRNAは、2重鎖を形成するためにそれ自体の上に折りたたまれる自己相補性ヘアピン型分子の形態を取り得る。したがってdsRNAは、完全にまたは部分的に2本鎖であり得る。遺伝子発現の特異的な調節は、遺伝子導入細胞系におけるdsRNAヘアピンの安定な発現によって達成され得る。2本鎖、または2重鎖を形成するためにそれ自体の上に折りたたまれる自己相補性ヘアピン型分子の形態をとる1本鎖から形成される場合、2本鎖 ( または1本鎖の2重鎖形成領域 ) は、ワトソン - クリック型の形で塩基対形成する自己相補的RNA鎖である。

20

30

40

#### 【0133】

一旦系に導入されると本発明の化合物は、標的核酸の切断または他の修飾をもたらす1種以上の酵素または構造タンパク質の作用を誘発できる、または占有に基づく機構を介して作用できる。一般に核酸 ( オリゴヌクレオチドを含む ) は、「DNA様」 ( すなわち一般に1以上の2'-デオキシ糖を有し、一般にU塩基よりもT塩基を有する ) または「RNA様」 ( すなわち一般に1つまたは複数の2'-ヒドロキシ糖または2'-修飾糖を有し、一般にT塩基よりもU塩基を有する ) と記載され得る。核酸ヘリックスは、2種以上の構造を、最も通例ではA-形態およびB-形態をとり得る。一般にB-形態様構造を有するオリゴヌクレオチドは「DNA様」であると、A-形態様構造を有するものは「RN

50

A様」であると考えられる。いくつかの(キメラ)実施形態においてアンチセンス化合物は、A - および B - 形態領域の両方を含み得る。

【0134】

本発明によるアンチセンス化合物は、長さ約5～約80ヌクレオチド(すなわち約5～約80個連結したヌクレオシド)由来のアンチセンス部分を含み得る。これは、アンチセンス化合物のアンチセンス鎖または一部分の長さを意味する。言い換えると、本発明の1本鎖アンチセンス化合物は、5～約80個のヌクレオチドを含み、本発明の2本鎖アンチセンス化合物(例えばdsRNAなど)は、長さ5～約80ヌクレオチドのセンスおよびアンチセンス鎖または一部分を含む。当業者であれば、これが長さ5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80ヌクレオチドまたはこれらの範囲内の任意の長さのアンチセンス部分を内包することを理解されよう。

10

【0135】

一実施形態において本発明のアンチセンス化合物は、長さ10～50ヌクレオチドのアンチセンス部分を有する。当業者であれば、これが長さ10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドまたはこれらの範囲内の任意の長さのアンチセンス部分を有するオリゴヌクレオチドを具体化することを理解されよう。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは長さ15ヌクレオチドである。

20

【0136】

一実施形態において、本発明のアンチセンスまたはオリゴヌクレオチド化合物は、長さ12または13～30ヌクレオチドのアンチセンス部分を有する。当業者であれば、これが長さ12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドまたはこれらの範囲内の任意の長さのアンチセンス部分を有するアンチセンス化合物を具体化することを理解されよう。

30

【0137】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は、化合物中の1以上のヌクレオチド位置に異なる塩基が存在する変異型も含む。例えば、最初のヌクレオチドがアデノシンである場合、この位置にチミジン、グアノシンまたはシチジンを含有する変異型が生成され得る。これは、アンチセンスまたはdsRNA化合物の任意の位置においてなされ得る。次いでこれらの化合物は、標的核酸の発現を抑制するそれらの能力を測定するために本明細書に記載の方法を使用して検査される。

【0138】

いくつかの実施形態において、アンチセンス化合物と標的との間の相同性、配列同一性または相補性は、約40%～約60%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約60%～約70%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約70%～約80%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約80%～約90%である。いくつかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%である。

40

【0139】

ある実施形態において、例えば配列番号3および4に記載の核酸分子などのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1以上の置換または修飾を含む。一実施形態においてヌクレオ

50

チドはロクト核酸 (LNA) で置換される。

【0140】

ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、A T O H 1 に関連するコードおよび / または非コード配列ならびに配列番号 1 および配列番号 2 として記載の配列の、核酸分子センスおよび / またはアンチセンスの 1 以上の領域を標的化する。オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 および配列番号 2 の重複領域にも標的化される。

【0141】

本発明の特定の好ましいオリゴヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドである。本発明の文脈において「キメラオリゴヌクレオチド」または「キメラ」は、それぞれ少なくとも 1 つのヌクレオチドからなる 2 つ以上の化学的に異なる領域を含むオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、1 種以上の有益な特性 (例えばヌクレアーゼ耐性の増大、細胞への取り込みの増大、標的に対する結合親和性の増大など) を付与する修飾されたヌクレオチドの少なくとも 1 つの領域、および RNA : DNA または RNA : RNA ハイブリッドを切断できる酵素の基質である領域を典型的には含む。例として、RNAse H は、RNA : DNA 2 重鎖の RNA 鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。したがって RNAse H の活性化は、RNA 標的の切断を生じ、それにより遺伝子発現のアンチセンス調節の効率を非常に増強する。結果としてキメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して低分子オリゴヌクレオチドで同程度の結果がしばしば得られる。RNA 標的の切断は、ゲル電気泳動および必要に応じて当技術分野において周知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって通常通りに検出できる。一実施形態において、キメラオリゴヌクレオチドは、標的結合親和性を増大させる少なくとも 1 つの領域、および RNAse H の基質として作用する領域を通常含む。オリゴヌクレオチドのその標的 (この場合、ras をコードする核酸) に対する親和性は、オリゴヌクレオチド / 標的対の T<sub>m</sub> (オリゴヌクレオチドと標的とが解離する温度であり、解離は分光光度的に検出される) を測定することによって通常通りに決定される。T<sub>m</sub> が高くなるほど、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性は大きい。

【0142】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、2 つ以上のオリゴヌクレオチド、修飾されたオリゴヌクレオチド、上に記載のオリゴヌクレオチドおよび / またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合構造として形成され得る。そのような化合物は、当技術分野においてハイブリッドまたはギャップマー (gapmer) とも称されている。そのようなハイブリッド構造の調製について記載した代表的な米国特許としては、以下に限定しないが、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 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 号および第 5, 700, 922 号が挙げられる。

【0143】

ある実施形態では、修飾されたオリゴヌクレオチドの領域は、糖の 2' 位置で修飾された少なくとも 1 つのヌクレオチド、最も好ましくは 2' - O - アルキル、2' - O - アルキル - O - アルキル、または 2' - フルオロ修飾ヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、RNA 修飾は、ピリミジン、脱塩基残基または RNA の 3' 末端の反転塩基 (inverted base) のリボース上の 2' - フルオロ、2' - アミノおよび 2' - O - メチル修飾を含む。そのような修飾は、通常通りにオリゴヌクレオチドに組み込まれ、これらのオリゴヌクレオチドは、所与の標的に対して 2' - デオキシオリゴヌクレオチドよりもより高い T<sub>m</sub> (すなわちより高い標的結合親和性) を有することが示されている。そのような増大した親和性の効果は、遺伝子発現の RNAi オリゴヌクレオチド抑制を非常に増強する。RNAse H は、RNA : DNA 2 重鎖の RNA 鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼであり、したがってこの酵素の活性化は、RNA 標的の切断を生じ、そ

10

20

30

40

50

れによりRNAi抑制の効率を非常に増強できる。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動によって通常通り実証され得る。別の実施形態では、キメラオリゴヌクレオチドもヌクレアーゼ耐性を増強するべく修飾される。細胞は、核酸を分解できる種々のエキソ-およびエンド-ヌクレアーゼを含有する。多数のヌクレオチドおよびヌクレオシド修飾が、それが組み込まれるオリゴヌクレオチドを天然のオリゴヌクレオチドよりもヌクレアーゼ消化に対してより耐性にすることが示されている。ヌクレアーゼ耐性は、オリゴヌクレオチドを細胞抽出物または単離されたヌクレアーゼ溶液とインキュベートし、一定時間後に残っている未変化オリゴヌクレオチドの量を、通常は電気泳動によって、測定することにより通常通り測定される。ヌクレアーゼ耐性を増強するべく修飾されているオリゴヌクレオチドは、未修飾オリゴヌクレオチドよりも長時間未変化で残存する。種々のオリゴヌクレオチド修飾がヌクレアーゼ耐性を増強するまたは付与することが実証されている。現在のところ少なくとも1つのホスホロオチオエート修飾を含有するオリゴヌクレオチドはより好ましい。いくつかの場合に標的結合親和性を増強するオリゴヌクレオチド修飾も、単独で、ヌクレアーゼ耐性を増強できる。

#### 【0144】

本発明のために想定されるいくつかの好ましいオリゴヌクレオチドの具体的な例としては、修飾された骨格、例えばホスホロオチオエート、リン酸トリエステル、メチルホスホネート、短鎖アルキルまたはシクロアルキル糖部分間結合または短鎖ヘテロ原子または複素環糖間結合を含むものが挙げられる。最も好ましいのは、ホスホロオチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子骨格、特に $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$  [メチレン(メチルイミノ)またはMMI骨格として周知]、 $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$  および $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$  骨格、式中天然のホスホジエステル骨格は $\text{O-P-O-CH}$ と表される)を有するものである。De Mesmaekerら(1995)Acc.Chem.Res.28:366-374)によって開示されたアミド骨格も好ましい。同様に好ましいのは、モルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドである(Summer-tonおよびWeller、米国特許第5,034,506号)。他の実施形態において、ペプチド核酸(PNA)骨格、オリゴヌクレオチドのホスホジエステル骨格などは、ポリアミド骨格で置換され、ヌクレオチドは直接または間接的にポリアミド骨格のアザ窒素原子に結合される。オリゴヌクレオチドは、1以上の置換された糖部分も含み得る。好ましいオリゴヌクレオチドは、以下のもの: OH、SH、SCH<sub>3</sub>、F、OCN、OCH<sub>3</sub>OCH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>またはO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>(nは1~約10); C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>低級アルキル、アルコキシアルコキシ、置換された低級アルキル、アルカリルまたはアラリル; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-、S-、またはN-アルキル; O-、S-、またはN-アルケニル; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>; CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; ヘテロシクロアルキル; ヘテロシクロアルカリル; アミノアルキルアミノ; ポリアルキルアミノ; 置換されたシリル; RNA切断基; レポーター基; 干渉物質; オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基; またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善する基および同様の特性を有する他の置換基のうちの1つを2'位置に含む。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ[2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、2'-O-(2-メトキシエチル)としても周知]を含む。他の好ましい修飾は2'-メトキシ(2'-O-CH<sub>3</sub>)、2'-プロポキシ(2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)および2'-フルオロ(2'-F)を含む。同様に修飾は、オリゴヌクレオチドの他の位置、詳細には3'末端ヌクレオチドの糖の3'位および5'末端ヌクレオチドの5'位でも作製され得る。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル基の代わりにシクロブチルなどの糖類似体も有し得る。

#### 【0145】

オリゴヌクレオチドは、追加的または代替的に核酸塩基(当技術分野において単に「塩基」と称されることも多い)修飾または置換も含み得る。本明細書において使用される「未修飾」または「天然」ヌクレオチドは、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T

10

20

30

40

50



)、シトシン(C)およびウラシル(U)を含む。修飾されたヌクレオチドは、天然の核酸においてまれに、または一過的にだけ見出されるヌクレオチド、例えばヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン、詳細には5-メチルシトシン(5-メチル-2'-デオキシシトシンとも称され、5-Me-Cとも当技術分野においてしばしば称される)、5-ヒドロキシメチルシトシン(HMC)、グリコシルHMCおよびゲントピオシルHMCならびに合成ヌクレオチド、例えば2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニンまたは他のヘテロ置換アルキルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N6(6-アミノヘキシル)アデニンおよび2,6-ジアミノプリンを含む。当技術分野において周知の「ユニバーサル」塩基、例えばイノシン、も含まれ得る。5-Me-C置換は、核酸2重鎖の安定性を0.6~1.2増大させることが示されており、現在好ましい塩基置換である。

#### 【0146】

本発明のオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性または細胞への取り込みを増強する1以上の成分またはコンジュゲートのオリゴヌクレオチドへの化学的結合を含む。そのような成分として、以下に限定されないが、コレステロール成分、コレステリル成分、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、あるいはアダマンタン酢酸などの脂質成分が含まれる。親油性成分を含むオリゴヌクレオチドおよびそのようなオリゴヌクレオチドを調製する方法は、当技術分野、例えば米国特許第5,138,045号、第5,218,105号および第5,459,255号において公知である。

#### 【0147】

所与のオリゴヌクレオチドにおけるすべての位置が一律に修飾される必要はなく、実際に前述の修飾のうち2種以上が単一のオリゴヌクレオチド中に、またはオリゴヌクレオチド中の単一のヌクレオチド中にさえも組み込まれ得る。本発明は、本明細書中以前に定義したキメラオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドも含む。

#### 【0148】

他の実施形態において本発明の核酸分子は、限定されないが脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質またはポリ炭化水素化合物を含む他の成分と結合される。当業者であれば、これらの分子が、糖、塩基またはリン酸基のいくつかの位置に核酸分子を含む1以上の任意のヌクレオチドに連結され得ることを理解されよう。

#### 【0149】

本発明により使用されるオリゴヌクレオチドは、好都合におよび通常通り固相合成の十分に周知な技術を通じて作製される。そのような合成のための装置は、Applied Biosystemsを含むいくつかのベンダーから販売されている。そのような合成のための任意の他の手段も使用され得る；オリゴヌクレオチドの実際の合成は、十分に当業者の能力の範囲内である。ホスホロオチオエートおよびアルキル化誘導体などの他のオリゴヌクレオチドを調製するために類似技術を使用することもよく知られている。類似技術ならびに商業的に入手可能な修飾されたアミダイトおよび多孔質ガラス(CPG)製品(ピオチン、フルオレsein、アクリジンまたはソラレン修飾アミダイトなど)および/または蛍光標識、ピオチン化または、コレステロール修飾オリゴヌクレオチドなどの他の修飾オリゴヌクレオチドを合成するためのCPG(Glen Research, Sterling VAから入手可能)の使用もよく知られている。

#### 【0150】

本発明により、強度、特異性および作用期間の増強のため、およびオリゴヌクレオチドの投与経路を拡げるためのLNAモノマーの利用などの修飾の使用には、MOE、ANA、FANA、PSなど現在のケミストリが含まれる。これは現在のオリゴヌクレオチド中のいくつかのモノマーのLNAモノマーによる置換によって達成され得る。LNA修飾オ

リゴヌクレオチドは、親化合物に類似する大きさを有する場合があります、またはより大きいものもよいが、好ましくは小さいものである。そのようなLNA修飾オリゴヌクレオチドが約70%より少ない、より好ましくは約60%より少ない、最も好ましくは約50%より少ないLNAモノマーを含むことは好ましく、それらの大きさは約5から25ヌクレオチドの間であることが好ましく、より好ましくは約12から20ヌクレオチドの間の大きさである。

#### 【0151】

好ましい修飾されたオリゴヌクレオチド骨格は、以下に限定されないが、ホスホロオチオエート、キラルホスホロオチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルホスホネートおよび他のアルキルホスホネート(3'アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む)、ホスフィネート、ホスホラミデート(3'アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートを含む)、チオホスホラミデート、チオアルキルホスホネート、チオアルキルホスホトリエステルおよび通常の3'-5'結合を有するボラノホスフェート、これらの2'-5'結合類似体、および逆転した方向性を有する(ヌクレオチド単位の隣接する対が3'-5'から5'-3'にまたは2'-5'から5'-2'に連結している)ものを含む。種々の塩、塩混合物および遊離酸の形態も含まれる。

10

#### 【0152】

上記のリン含有結合の作製を説明する代表的な米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許第3,687,808号;4,469,863号;第4,476,301号;第5,023,243号;第5,177,196号;第5,188,897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;第5,455,233号;第5,466,677号;第5,476,925号;第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;および第5,625,050号が挙げられ、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0153】

好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格はリン原子を含まず、単鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルまたはシクロアルキルヌクレオチド間結合、または1つまたは複数の単鎖ヘテロ原子または複素環ヌクレオチド間結合によって形成された骨格を有する。これらは、モルホリノ結合(ヌクレオチドの糖部分から部分的に形成される);シロキサン骨格;スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格;ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格;メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格;アルケン含有骨格;スルファメート骨格;メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格;スルホネートおよびスルホンアミド骨格;アミド骨格;ならびに他のN、O、SおよびCH<sub>2</sub>が混合した構成成分部分を有するものを含む。

30

#### 【0154】

上記のオリゴヌクレオチドの調製を説明する代表的な米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許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;および第5,677,439号が挙げられ、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

40

50

## 【0155】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣物において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオチド間結合（すなわち骨格）の両方は新たな基で置換される。塩基単位は、適切な核酸ターゲティング化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。そのようなオリゴマー化合物の1つ、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが判明しているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、詳細にはアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は、保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合される。PNA化合物の調製について開示している代表的米国特許は、以下に限定されないが、米国特許第5,539,082号、米国特許第5,714,331号および米国特許第5,719,262号が挙げられ、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる。PNA化合物のさらなる説明は、Nielsenら(1991) Science 254, 1497-1500にみられる。

10

## 【0156】

本発明のある実施形態において、ホスホロオチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオチド、特に、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ （メチレン（メチルイミノ）またはMMI骨格として周知）、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2$ 、 $CH_2N(CH_3)-N(CH_3)CH_2$  および  $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ （天然のホスホジエステル骨格は、以前に引用した米国特許第5,489,677号の  $-O-P-O-CH_2-$  として表される）、および以前に引用した米国特許第5,602,240号のアミド骨格。同様に好ましいのは、以前に引用した米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドである。

20

## 【0157】

修飾されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上の置換された糖部分を含み得る。好ましいオリゴヌクレオチドは、以下のもの：OH；F；O-、S-、またはN-アルキル；O-、S-、またはN-アルケニル；O-、S-またはN-アルキニル；またはOアルキル-O-アルキル（式中アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、CからCOアルキルに、またはC2からCOアルケニルおよびアルキニルに、置換されるまたは置換されない場合がある）のうちの1つを2'位置に含む。特に好ましいのは、 $O(CH_2)_nO_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_n$ 、 $OCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$  および  $O(CH_2)_nON(CH_2)_nCH_3$  2であり、式中nおよびmは1から約10であり得る。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、以下：CからCO、（低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH3、OCN、Cl、Br、CN、CF3、OCF3、SOCH3、SO2CH3、ONO2、NO2、N3、NH2、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、RNA切断基、レポーター基、干渉物質、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善する基および同様の特性を有する他の置換基のうちの1つを2'位置に含む。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ（2'-O-CH2CH2OCH3、2'-O-（2-メトキシエチル）または2'-MOEとしても知られる）すなわちアルコキシアルコキシ基を含む。さらなる好ましい修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$  基、本明細書以下の実施例において記載のとおり2'-DMAOEとしても周知、ならびに2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（当技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても当分野で周知）すなわち、 $2'-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-N(CH_2)_2$  を含む。

30

40

## 【0158】

他の好ましい修飾は、2'-メトキシ（2'-O-CH3）、2'-アミノプロポキシ（2'-O-CH2CH2CH2NH2）および2'-フルオロ（2'-F）を含む。同

50

様の修飾は、オリゴヌクレオチドの他の位置、詳細には3'末端ヌクレオチドの糖の3'位置または2'-5'連結オリゴヌクレオチドおよび5'末端ヌクレオチドの5'位置にも作製され得る。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル成分などの糖類似体も有し得る。そのような修飾糖構造の調製について開示した代表的米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許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;および第5,700,920号などが挙げられ、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0159】

オリゴヌクレオチドは、核酸塩基(当技術分野において単に「塩基」と称されることが多い)修飾または置換も含み得る。本明細書において使用される「未修飾」または「天然」ヌクレオチドは、プリン塩基アデニン(A)およびグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)を含む。修飾ヌクレオチドは、5-メチルシトシン(5-Me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ特に5-臭化、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの他の合成および天然ヌクレオチドを含む。

20

#### 【0160】

さらに、ヌクレオチドは、米国特許第3,687,808号に開示のもの、'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示のもの、Englisch, 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613に開示のもの、Sanghvi, Y. S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993に開示のものを含む。特定のこれらのヌクレオチドは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増大させるために特に有用である。これらは、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびに、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含むN-2、N-6およびO-6置換プリンを含む。5-メチルシトシン置換物は、0.6~1.2の核酸2重鎖安定性における増大を示しており(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. および Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、現在のところ好ましい置換であり、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられるとより好ましい。

30

40

#### 【0161】

上記の修飾ヌクレオチドおよび他の修飾ヌクレオチドの作製について開示した代表的米国特許は、以下に限定されないが、米国特許第3,687,808号、ならびに同第4,

50

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, 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, 596, 091号; 第5, 614, 617号; 第5, 750, 692号, および第5, 681, 941号などが挙げられ、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0162】

本発明のオリゴヌクレオチドの他の修飾は、活性、細胞性分布またはオリゴヌクレオチドの細胞への取り込みを増強する1以上の成分またはコンジュゲートのオリゴヌクレオチドへの化学的連結を含む。

10

#### 【0163】

そのような成分としては、以下に限定されないが、コレステロール成分、コール酸、チオエーテル(例えばヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル成分、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-tオキシコレステロール成分などが挙げられる。

#### 【0164】

そのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの作製について記載した代表的な米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許第4, 828, 979号; 第4, 948, 882号; 第5, 218, 105号; 第5, 525, 465号; 第5, 541, 313号; 第5, 545, 730号; 第5, 552, 538号; 第5, 578, 717、5, 580, 731号; 第5, 580, 731号; 第5, 591, 584号; 第5, 109, 124号; 第5, 118, 802号; 第5, 138, 045号; 第5, 414, 077号; 第5, 486, 603号; 第5, 512, 439号; 第5, 578, 718号; 第5, 608, 046号; 第4, 587, 044号; 第4, 605, 735号; 第4, 667, 025号; 第4, 762, 779号; 第4, 789, 737号; 第4, 824, 941号; 第4, 835, 263号; 第4, 876, 335号; 第4, 904, 582号; 第4, 958, 013号; 第5, 082, 830号; 第5, 112, 963号; 第5, 214, 136号; 第5, 082, 830号; 第5, 112, 963号; 第5, 214, 136号; 第5, 245, 022号; 第5, 254, 469号; 第5, 258, 506号; 第5, 262, 536号; 第5, 272, 250号; 第5, 292, 873号; 第5, 317, 098号; 第5, 371, 241、5, 391, 723号; 第5, 416, 203、5, 451, 463号; 第5, 510, 475号; 第5, 512, 667号; 第5, 514, 785号; 第5, 565, 552号; 第5, 567, 810号; 第5, 574, 142号; 第5, 585, 481号; 第5, 587, 371号; 第5, 595, 726号; 第5, 597, 696号; 第5, 599, 923号; 第5, 599, 928号および第5, 688, 941号などがあり、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

#### 【0165】

[創薬]: 本発明の化合物は、創薬および標的検証の分野にも応用され得る。本発明は、無調ホモログ1(ATOH1)ポリヌクレオチドと、病態、表現型または状態との間に存在する関係を解明するための創薬の試みにおける、本明細書において特定された化合物および好ましい標的セグメントの使用を包含する。これらの方法は、試料、組織、細胞または生体を本発明の化合物と接触させる工程、ATOH1ポリヌクレオチドの核酸またはタンパク質レベルおよび/または関連する表現型または化学的な評価項目を処置後のある時期に測定する工程、ならびに選択に応じて測定値を未処置試料または本発明のさらなる化合物で処置した試料と比較する工程を含む、ATOH1ポリヌクレオチドの検出または調節を含む。これらの方法は、標的検証のプロセスのために未知の遺伝子の機能を決定するため、または特定の疾患、状態または表現型の治療または予防のための標的としての特

40

50

定の遺伝子産物の妥当性を決定するために他の実験と並行して、または組み合わせて実施され得る。

【0166】

[ 遺伝子発現のアップレギュレートまたは阻害の評価 ]

外来性核酸の宿主細胞または生体内への輸送は、細胞中または生体中の核酸を直接検出する工程によって評価され得る。そのような検出は、当技術分野において周知のいくつかの方法によって達成し得る。例えば、外来性核酸の存在は、サザンブロットまたは核酸に関連するヌクレオチド配列を特異的に増幅するプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術によって検出し得る。外来性核酸の発現も遺伝子発現分析を含む従来の方法を使用して測定し得る。例えば外来性核酸から生成される mRNA はノーザンブロットおよび逆転写 PCR (RT-PCR) を使用して検出および定量し得る。

10

【0167】

外来性核酸からの RNA の発現も、酵素活性またはレポータータンパク質活性を測定することによって検出し得る。例えば、アンチセンス調節活性は、外来性核酸がエフェクター RNA を生成していることの指標としての標的核酸発現の増減により間接的に測定し得る。配列保存に基づいてプライマーは設計可能であり、標的遺伝子のコード領域を増幅するために使用し得る。任意の翻訳または非コード領域が使用され得るが、最初に各遺伝子から最も高く発現されるコード領域がモデル制御遺伝子を構築するために使用され得る。各制御遺伝子は、各コード領域をレポーターコード領域とそのポリ (A) シグナルとの間に挿入することによって組み立てられる。これらのプラスミドは、レポーター遺伝子を遺伝子上流部分に、および潜在的 RNA i 標的を 3' 非コード領域に有する mRNA を生成する。個々のアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果は、レポーター遺伝子の調節によって評価される。本発明の方法において有用なレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸合成酵素 (AHS)、アルカリホスファターゼ (AP)、ベータガラクトシダーゼ (LacZ)、ベータグルクロニダーゼ (GUS)、クロラムフェニコールアセチル基転移酵素 (CAT)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP)、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、ルシフェラーゼ (Luc)、ノバリン合成酵素 (NOS)、オクトピン合成酵素 (OCS)、およびそれらの誘導体などが挙げられる。アンピシリン、プレオマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、ピューロマイシンおよびテトラサイクリンに耐性を付与する多重選択マーカーを利用可能である。レポーター遺伝子の調節を測定するための方法は、当技術分野においてよく知られており、以下に限定されないが蛍光定量的方法 (例えば蛍光分光法、蛍光励起細胞分取 (FACS)、蛍光顕微鏡)、抗生物質耐性判別法が含まれる。

20

30

【0168】

ATOH1 タンパク質および mRNA の発現は、当業者に周知の本明細書の他の場所に記載する方法を用いてアッセイすることができる。例えば、ELISA などのイムノアッセイを用いてタンパク質レベルを測定することができる。ATOH1 の ELISA アッセイキットは、例えば R & D Systems (Minneapolis, MN) から市販されている。

40

【0169】

いくつかの実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて処置したサンプル (例えば生体内または体外の細胞または組織) 中の ATOH1 の発現 (例えば mRNA の発現すなわちタンパク質) は、対照サンプルにおける ATOH1 の発現との比較によって評価する。例えば、タンパク質すなわち核酸の発現を、当業者に周知の方法を用いて、擬似処置したすなわち未処置のサンプルにおける発現と比較することができる。あるいは、必要な情報に応じて、対照アンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、変化した配列すなわち異なる配列を有するもの) で処置したサンプルとの比較を行うことができる。別の実施形態では、処置したサンプル対未処置のサンプルにおける ATOH1 タンパク

50

質すなわち核酸の発現の差異を、処置したサンプル対未処置のサンプルにおける異なる核酸（研究者が適切とみなした任意の標準的な核酸、例えばハウスキーピング遺伝子）の発現の差異と比較することができる。

【0170】

観察された差異は、対照との比較に用いるために、望ましい形式、例えば比率すなわち割合の形式で表現することができる。いくつかの実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置したサンプル中のA T O H 1のmRNAの発現すなわちタンパク質のレベルは、未処置のサンプルまたは対照の核酸で処置したサンプルと比較して約1.25倍～約10倍以上の割合で増減する。いくつかの実施形態では、A T O H 1のmRNAの発現すなわちタンパク質のレベルは、少なくとも約1.25倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約4.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約5.5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約6.5倍、少なくとも約7倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約8倍、少なくとも約8.5倍、少なくとも約9倍、少なくとも約9.5倍、少なくとも約10倍かそれ以上の割合で増減する。

10

【0171】

[キット、研究用試薬、診断、および治療]

本発明の化合物は、診断、治療および予防のためにならびに研究用試薬およびキットの構成要素として利用され得る。さらに、優れた特異性をもって遺伝子発現を阻害できるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当業者によって特定の遺伝子の機能を解明するため、または生物学的経路の種々のメンバー間の機能を区別するために使用されることが多い。

20

【0172】

キットおよび診断ならびに種々の生物学的系における使用のために、本発明の化合物は、単独でまたは他の化合物または治療薬との併用のいずれかで、細胞中および組織中で発現される遺伝子の部分的または全体的な相補配列の発現パターンを解明するためのディファレンシャルおよび/またはコンビナトリアル解析でのツールとして有用である。

【0173】

本明細書において使用される用語「生物学的系」または「系」は、無調ホモログ1（A T O H 1）遺伝子の産物を発現するまたは発現できるようにされる任意の生体、細胞、細胞培養物または組織として定義される。これらは、以下に限定されないが、ヒト、遺伝子導入動物、細胞、細胞培養物、組織、異種移植片、移植体およびそれらの組み合わせを含む。

30

【0174】

非限定的な一例として、1以上のアンチセンス化合物で処置した細胞中または組織中の発現パターンを、アンチセンス化合物で処置していない対照細胞または組織と比較して、生じたパターンを遺伝子発現レベルの差異について分析する。それらが、例えば検査される遺伝子の疾患関連性、シグナル伝達経路、細胞内局在性、発現レベル、大きさ、構造または機能などに関連するからである。これらの分析は、刺激されたまたは刺激されていない細胞で、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実施することができる。

40

【0175】

当技術分野において周知の遺伝子発現分析方法の例としては、DNAアレイまたはマイクロアレイ、SAGE（遺伝子発現の連続的分析）、READS（消化cDNAの制限酵素増幅）、TOGA（総遺伝子発現分析）、タンパク質アレイおよびプロテオミクス、発現された配列タグ（EST）配列決定、サブトラクティブRNAフィンガープリンティング（SuRF）、サブトラクティブクローニング、ディファレンシャルディスプレイ（DD）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、FISH（蛍光in situハイブリダイゼーション）技術および質量分析法などが挙げられる。

【0176】

50

本発明の化合物は、これらの化合物が無調ホモログ1 (A T O H 1) をコードする核酸にハイブリダイズすることから、研究および診断のために有用である。例えば、本明細書において開示のとおり効率および条件下で効果的なA T O H 1 調節物質としてハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、遺伝子増幅または検出に好都合な条件下でそれぞれ効果的なプライマーまたはプローブである。これらのプライマーまたはプローブは、A T O H 1 をコードする核酸分子の特異的検出を必要とする方法において、およびA T O H 1 のさらなる研究における検出または使用のための前記核酸分子の増幅のために有用である。A T O H 1 をコードする核酸と、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、詳細にはプライマーおよびプローブとのハイブリダイゼーションは当技術分野において周知の手段によって検出し得る。そのような手段としては、オリゴヌクレオチドへの酵素のコンジュゲーション、オリゴヌクレオチドの放射標識、または任意の他の適切な検出手段などを挙げることができる。試料中のA T O H 1 のレベルを検出するためにそのような検出手段を使用するキットも用意することができる。

10

20

30

40

50

**【0177】**

アンチセンスの特異性および感度は、治療用使用のために当業者によって利用される。アンチセンス化合物は、ヒトを含む動物の病態の治療における治療用成分として使用されてきた。アンチセンスオリゴヌクレオチド薬は、ヒトに安全かつ効果的に投与されており、多数の臨床試験が現在進行中である。したがって、アンチセンス化合物が細胞、組織および動物、特にヒトの治療用のための治療レジメンにおいて有用であるように構成され得る有用な治療方法となり得ることは確立されている。

**【0178】**

治療については、A T O H 1 ポリヌクレオチドの発現を調節することによって治療され得る疾患または障害を有すると疑われる動物（好ましくはヒト）は、本発明によるアンチセンス化合物を投与することによって治療される。例えば、限定を意図しない一実施形態において、該方法は、治療を必要とする動物に治療上有効な量のA T O H 1 調節物質を投与する工程を含む。本発明のA T O H 1 調節物質は、A T O H 1 の活性を効果的に調節するか、またはR A T O H 1 タンパク質の発現を調節する。一実施形態においては、動物におけるA T O H 1 の活性または発現は、対照と比較して約10%阻害される。好ましくは、動物におけるA T O H 1 の活性または発現が、約30%阻害される。より好ましくは動物におけるA T O H 1 の活性または発現が、50%またはそれを超えて阻害される。したがってオリゴマー化合物は、無調ホモログ1 (A T O H 1) のmRNAの発現を対照と比較して少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%調節する。

**【0179】**

一実施形態において、無調ホモログ1 (A T O H 1) の活性または発現および/または動物においては、対照と比較して少なくとも約10%増加する。好ましくは動物におけるA T O H 1 の活性または発現は、約30%増加する。より好ましくは動物におけるA T O H 1 の活性または発現は、約50%またはそれを超えて増加する。したがってオリゴマー化合物は、A T O H 1 のmRNAの発現を、対照と比較して少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%調節する。

**【0180】**

例えば無調ホモログ1 (A T O H 1) の発現の低下は、動物の血清、血液、脂肪組織、肝臓または任意の他の体液、組織または器官において測定し得る。好ましくは、分析される前記体液、組織または器官中に含まれる細胞は、A T O H 1 ペプチドをコードする核酸分子および/またはA T O H 1 タンパク質それ自体を含む。



## 【0181】

本発明の化合物は、有効量の化合物を適切な薬学的に許容される希釈剤または担体に加えることによって医薬組成物において利用され得る。本発明の化合物および方法の使用は、予防的にも有用であり得る。

## 【0182】

## [コンジュゲート]

本発明のオリゴヌクレオチドの他の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞への取り込みを増強する1以上の成分またはコンジュゲートへのオリゴヌクレオチドの化学的連結を含む。これらの成分またはコンジュゲートは、1級または2級ヒドロキシル基などの官能基に共有結合したコンジュゲート基を含み得る。本発明のコンジュゲート基は、干渉物質、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学特性を増強する基、およびオリゴマーの薬物動態特性を増強する基を含む。典型的なコンジュゲート基は、コレステロール、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、および色素を含む。本発明の文脈において薬力学特性を増強する基は、取り込みを改善し、分解への耐性を増強し、および/または標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基を含む。本発明の文脈において薬物動態特性を増強する基は、本発明の化合物の取り込み、分散、代謝または排出を改善する基を含む。代表的コンジュゲート基は、1992年10月23日出願の国際特許出願PCT/US92/09196および米国特許第6,287,860号、「Antisense inhibition of MEKK2 expression」において開示されており、これらはともに参照により本明細書に組み込まれる。コンジュゲート成分は、以下に限定されないが、コレステロール成分、コール酸、チオエーテル(例えばヘキシル-S-トリチルチオール)、チオコレステロール、脂肪族鎖(例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基)、リン脂質(例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホネート)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、あるいはアダマンタン酢酸、パルミチル成分、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール成分などを含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、活性原薬、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、フォリン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジアジド、ジアセピン、インドメチシン、バルビツール酸、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤または抗生物質ともコンジュゲート形成され得る。

## 【0183】

そのようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの作製について記載した代表的米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許第4,828,979号;第4,948,882号;第5,218,105号;第5,525,465号;第5,541,313号;第5,545,730号;第5,552,538号;第5,578,717、5,580,731号;第5,580,731号;第5,591,584号;第5,109,124号;第5,118,802号;第5,138,045号;第5,414,077号;第5,486,603号;第5,512,439号;第5,578,718号;第5,608,046号;第4,587,044号;第4,605,735号;第4,667,025号;第4,762,779号;第4,789,737号;第4,824,941号;第4,835,263号;第4,876,335号;第4,904,582号;第4,958,013号;第5,082,830号;第5,112,963号;第5,214,136号;第5,082,830号;第5,112,963号;第5,214,136号;第5,245,022号;第5,254,469号;第5,258,506号;第5,262,536号;第5,272,250号;第5,292,873号;第5,317,098

10

20

30

40

50

号；第5, 371, 241、5, 391, 723号；第5, 416, 203、5, 451, 463号；第5, 510, 475号；第5, 512, 667号；第5, 514, 785号；第5, 565, 552号；第5, 567, 810号；第5, 574, 142号；第5, 585, 481号；第5, 587, 371号；第5, 595, 726号；第5, 597, 696号；第5, 599, 923号；第5, 599, 928号および第5, 688, 941号などが挙げられる。

【0184】

[製剤]

本発明の化合物は、取り込み、分散および/または吸収の補助ために、例えばリポソーム、受容体 - 標的分子、経口、直腸、局所または他の製剤として、他の分子、分子構造または化合物と、混合物と混合、封入、コンジュゲート化または他の方法で結合され得る。そのような取り込み、分散および/または吸収を補助する製剤の調製について記載した代表的米国特許としては、以下に限定されないが、米国特許第5, 108, 921号；第5, 354, 844号；第5, 416, 016号；第5, 459, 127号；第5, 521, 291号；第5, 543, 165号；第5, 547, 932号；第5, 583, 020号；第5, 591, 721号；第4, 426, 330号；第4, 534, 899号；第5, 013, 556号；第5, 108, 921号；第5, 213, 804号；第5, 227, 170号；第5, 264, 221号；第5, 356, 633号；第5, 395, 619号；第5, 416, 016号；第5, 417, 978号；第5, 462, 854号；第5, 469, 854号；第5, 512, 295号；第5, 527, 528号；第5, 534, 259号；第5, 543, 152号；第5, 556, 948号；第5, 580, 575号；および第5, 595, 756号が挙げられ、それぞれが本明細書に参照として組み込まれる。

10

20

【0185】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的の発現および/または機能を調節するためにベクターと関連付けられて投与される必要はないが、本発明の実施形態は、プロモーター、ハイブリッドプロモーター遺伝子配列を含み、強い構成的プロモーター活性または所望の場合に誘導され得るプロモーター活性を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチドの発現のための発現ベクター構築物に関する。

30

【0186】

一実施形態においては、本発明の実施には、上述のアンチセンスオリゴヌクレオチドのうち少なくとも1つを適切な核酸送達系と共に投与する工程が含まれる。一実施形態において、その系は、ポリヌクレオチドに機能的にリンクされた非ウイルス性ベクターを含む。そのような非ウイルス性ベクターの例としては、オリゴヌクレオチド単独（例えば、配列番号3および4のなかの任意のもの1つ以上）または適切なタンパク質、多糖類または脂質配合物との組み合わせが挙げられる。

【0187】

他の適切な核酸デリバリーシステムにはウイルスベクター、典型的にはアデノウイルス、アデノウイルス関連ウイルス(AAV)、ヘルパー依存性アデノウイルス、レトロウイルスまたはセンダイウイルス(HVJ) - リポソーム複合体の少なくとも1つに由来する配列のものが挙げられる。好ましくは、ウイルスベクターには、ポリヌクレオチドに機能的にリンクされた強力な真核生物プロモーター、例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターが含まれる。

40

【0188】

他の好ましいベクターには、ウイルスベクター、融合タンパク質および化学的コンジュゲートが含まれる。レトロウイルスベクターには、モロニー Maus 白血病ウイルスおよび HIV ベースのウイルスが含まれる。好ましい HIV ベースのウイルスベクターの1つは、gag および pol 遺伝子が HIV ゲノム由来であり、env 遺伝子が他のウイルス由来である少なくとも2つのベクターを含む。DNAウイルス性ベクターが好ましい。これらのベクターには、オルソボックスベクターまたはトリボックスベクターなどのボックス

50

ベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターなどのヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ関連ウイルスベクターが含まれる。

【0189】

本発明のアンチセンス化合物は、ヒトを含む動物への投与において生物学的に活性な代謝産物またはその残渣を(直接または間接的に)提供できる、任意の薬学的に許容される塩、エステルまたはそのようなエステルの塩、または任意の他の化合物を包含する。

【0190】

用語「薬学的に許容される塩」は、本発明の化合物の生理学的かつ薬学的に許容される塩：すなわち親化合物の所望の生物学的活性を保持しており、望ましくない毒物学的な効果を与えない塩を指す。オリゴヌクレオチドについて、薬学的に許容される塩の好ましい例およびそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0191】

本発明は、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。本発明の医薬組成物は、局所または全身処置のいずれが望ましいかおよび治療される場所に依りて種々の方法で投与され得る。投与は、局所(点眼および腔および直腸を含む粘膜送達を含む)、肺、例えば噴霧吸入器による場合を含む粉末剤またはエアロゾルの吸入または吹送法によって；気管内、鼻腔内、上皮性および経皮性)、経口または非経口の投与であり得る。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入；または頭蓋内、例えば髄腔内または脳室内投与を含む。

20

【0192】

中枢神経系の組織の治療のために、例えば脳脊髄液への注射または注入によって投与を行うことができる。アンチセンスRNAの脳脊髄液への投与については、米国特許出願公開第2007/011777号、「Methods for slowing familial ALS disease progression」にも記載されており、この全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0193】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを中枢神経系の細胞に投与することが意図される場合、投与は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの血液脳関門通過を促進できる1種以上の薬剤を用いて行うことができる。注射は、例えば嗅内皮質または海馬に対して行うことができる。筋肉組織の運動ニューロンへのアデノウイルスベクターの投与による神経栄養因子の送達は、例えば、米国特許第6,632,427号、「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」に記載されており、この全内容は参照により本明細書に組み込まれる。脳、例えば、線条体、視床、海馬、または黒質へのベクターの直接の送達については公知で、例えば米国特許第6,756,523号、「Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain」に記載されており、これはその全内容が参照により本明細書に組み入れられる。投与は、注射により速やかに行うことも、あるいは遅い速度での注入または徐放製剤の投与によって一定時間にわたって行うこともできる。

30

40

【0194】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、望ましい医薬品や薬力学的特性を与える薬剤とリンクしたもの、または結合したものとすることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、トランスフェリン受容体に対する抗体などの血液脳関門の通過または輸送を促進するための当技術分野で公知の任意の物質に結合させて、静脈注射によって投与することができる。アンチセンス化合物は、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にし、かつ/または血液脳関門を越えたアンチセンス化合物の輸送を増加させるウイルスベクターにリンクさせることができる。浸透圧による血液脳関門の破壊は、例え

50

ば、以下に限定されないが、メソエリスリトール、キシリトール、D (+) ガラクトース、D (+) ラクトース、D (+) キシロース、ズルシトール、ミオイノシトール、L (-) フルクトース、D (-) マンニトール、D (+) グルコース、D (+) アラビノース、D (-) アラビノース、セロピオース、D (+) マルトース、D (+) ラフィノース、L (+) ラムノース、D (+) メリピオース、D (-) リボース、アドニトール、D (+) アラビトール、L (-) アラビトール、D (+) フコース、L (-) フコース、D (-) リキソース、L (+) リキソース、およびL (-) リキソースを含む糖の注入、または、以下に限定されないが、グルタミン、リジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、チロシン、バリン、タウリンを含むアミノ酸の注入によって達成することができる。血液脳関門の通過を容易にするための方法および材料は、例えば米国特許第4,866,042号、「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier」、第6,294,520号、「Material for passage through the blood-brain barrier」、および第6,936,589号、「Parenteral delivery systems」に記載されており、これらは参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる。

10

## 【0195】

本発明のアンチセンス化合物は、その取り込み、分散および/または吸収を助けるため、他の分子、分子構造、または化合物の混合物（例えば、リボソーム、受容体を標的化した分子、経口製剤、直腸製剤、局所製剤、または他の製剤）と混合、カプセル化、結合、または会合させ得る。例えば、カチオン性脂質は、オリゴヌクレオチドの取り込みを容易にする製剤に含まれ得る。取り込みを容易にすることが判明している組成物の1つは、LIPOFECTIN (GIBCO-BRL、ベセスダ、Bethesda, MDから入手可能)である。

20

## 【0196】

少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられている。局所投与のための医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴薬、坐薬、噴霧剤、液薬および粉末剤を含み得る。従来薬学的担体、液剤、粉末剤または油性基剤、増粘剤などは必要であるかまたは望ましい場合がある。コーティングされたコンドーム、手袋なども有用である場合がある。

30

## 【0197】

本発明の医薬製剤は、便利に単位投与の形態で提供されてもよく、製薬業界において周知の技術により調製され得る。そのような技術は、活性成分を、1種以上の薬学的担体または一種以上の賦形剤と結合させる工程を含む。一般に製剤は、活性成分を均一かつ均質に液体担体または微粉化した固体担体またはその両方と結合させる工程、次いで必要な場合は生成物を成形する工程によって製する。

## 【0198】

本発明の組成物は、以下に限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐薬および浣腸などの任意の多くの可能な剤形に製剤され得る。本発明の組成物は、水性懸濁剤、非水性または混合媒体としても製剤され得る。水性懸濁剤は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含む懸濁剤の粘度を上げる物質をさらに含めることができる。懸濁剤は、安定剤も含み得る。

40

## 【0199】

本発明の医薬組成物は、限定しないが、液剤、乳剤、泡状製剤およびリボソーム含有製剤を含む。本発明の医薬組成物および製剤は、1以上の浸透促進剤、担体、賦形剤または他の活性成分または不活性成分を含み得る。

50

## 【0200】

典型的には乳剤は、1つの液剤が他に通常直径0.1 $\mu$ mを超える液滴の形態で分散された不均一系である。乳剤は、分散相に加えて追加の成分を含有でき、活性剤は水相中、油相中またはそれ自体としての分離相中に溶液として存在できる。マイクロエマルジョンは、本発明の実施形態として含まれる。乳剤およびそれらの使用は、当技術分野においてよく知られており、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

## 【0201】

本発明の製剤は、リポソーム製剤を含む。本発明において使用される用語「リポソーム」は、球状の1層以上の二重層に配置された両親媒性脂質から成る小胞を意味する。リポソームは、親油性物質および送達される組成物を含有する水性の内部から形成された膜を有する単層膜または多重膜ビヒクルである。カチオン性リポソームは、負に荷電したDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成すると考えられる正に荷電したリポソームである。pH感受性または負に荷電したリポソームは、複合体化するよりもDNAを捕捉すると考えられる。カチオン性および非カチオン性の両方のリポソームは、DNAを細胞に送達するために使用されている。

10

## 【0202】

リポソームは、「立体的に安定化された」リポソームも含み、用語は本明細書における使用で1種以上の特殊な脂質を含むリポソームを意味する。リポソームに組み込まれた場合、これらの特殊化された脂質は、そのような特殊な脂質を欠いているリポソームと比較して増強された循環寿命を有するリポソームを生じる。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームのビヒクル形成脂質部分の一部が1種以上の糖脂質を含むか、またはポリエチレングリコール(PEG)成分などの1種以上の親水性ポリマーで誘導体化されていたものである。リポソームおよびそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。

20

## 【0203】

本発明の医薬製剤および組成物は、界面活性剤もさらに含み得る。薬剤製品、製剤および乳剤における界面活性剤の使用は、当技術分野においてよく知られている。界面活性剤およびのそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載され、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0204】

一実施形態において本発明は、核酸、具体的にはオリゴヌクレオチドの効率的な送達を行うために各種浸透促進剤を使用する。非親油性薬剤の細胞膜を超える拡散の補助に加えて、浸透促進剤は親油性薬剤の浸透性も促進する。浸透促進剤は、5つの広いカテゴリ、すなわち界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤および非キレート非界面活性剤のうちの1つに属するものとして分類され得る。浸透促進剤およびそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0205】

当業者であれば、製剤がそれらの目的とする使用法、すなわち投与経路に応じて通常通り設計されることを理解されよう。

40

## 【0206】

局所投与のための好ましい製剤には、本発明のオリゴヌクレオチドが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤などの局所送達剤と混合されているものを含まれる。好ましい脂質およびリポソームには、中性のもの(例えばジオレオイル-ホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンDMPC、ジステアロイルホスファチジルコリン)、陰性のもの(例えばジミリストイルホスファチジルグリセロールDMPG)、およびカチオン性のもの(例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミンDOTMA)が含まれる。

## 【0207】

50

局所または他の投与のため、本発明のオリゴヌクレオチドを、リボソーム中に包入するか、またはそれらリボソーム、特にカチオン性リボソームと複合体を形成させ得る。あるいは、オリゴヌクレオチドを、脂質中に、具体的にはカチオン性脂質と複合体化させ得る。好ましい脂肪酸およびエステル、薬学的に許容されるそれらの塩ならびにそれらの使用は、米国特許第 6, 287, 860 号にさらに記載されている。

#### 【0208】

経口投与用の組成物および製剤は、粉剤または顆粒剤、微粒子剤、ナノ粒子剤、水溶液中または非水溶液中の懸濁剤または液剤、カプセル、ゲルカプセル、サシェ剤、錠剤またはミニ錠剤を含む。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤が、望ましい場合がある。好ましい経口製剤は、本発明のオリゴヌクレオチドが 1 種以上の浸透促進界面活性剤およびキレート剤と共に投与されるものである。好ましい界面活性剤は、脂肪酸および / またはエステル、またはそれらの塩、胆汁酸および / またはそれらの塩を含む。好ましい胆汁酸 / 塩および脂肪酸ならびにそれらの使用は、米国特許第 6, 287, 860 号にさらに記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。同様に好ましいのは、浸透促進剤の組み合わせ、例えば胆汁酸 / 塩との組み合わせでの脂肪酸 / 塩である。特に好ましい組み合わせは、ラウリン酸ナトリウム塩、カプリン酸および UDC A である。さらなる浸透促進剤は、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルを含む。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥された粒子を含む顆粒形態またはマイクロまたはナノ粒子を形成するように複合体化されて経口送達され得る。オリゴヌクレオチド複合剤およびそれらの使用は、米国特許第 6, 287, 860 号にさらに記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

#### 【0209】

非経口、髄腔内または脳室内投与のための組成物および製剤は、バッファ剤、希釈剤および他の適切な添加剤（限定しないが浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体または賦形剤など）も含んでいてもよい滅菌水性溶液を含み得る。

#### 【0210】

本発明の特定の実施形態は、1 種以上のオリゴマー化合物および非アンチセンス機構により機能発揮する 1 種以上の他の化学療法剤を含有する医薬組成物を提供する。そのような化学療法剤の例としては、以下に限定されないが、ダウノルピシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、エソルピシン、プレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチル - ニトロソウレア、ブスルファン、ミトマイシン C、アクチノマイシン D、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプレゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバシン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロランブシル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラピン、5 - アザシチジン、ヒドロキシウレア、デオキシコホルマイシン、4 - ヒドロキシベルオキシシクロ - ホスホラミド、5 - フルオロウラシル (5 - FU)、5 - フルオロデオキシウリジン (5 - FUDR)、メトトレキサート (MTX)、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド (VP - 16)、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタピン、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベステロール (DES) などの癌化学療法剤が含まれる。本発明の化合物と併用する場合、そのような化学療法剤は、別々に（例えば、5 - FU とオリゴヌクレオチド）、連続して（例えば、一定期間の 5 - FU とオリゴヌクレオチドに続いて MTX とオリゴヌクレオチド）、または 1 種以上のそのような化学療法と併用して（例えば、5 - FU、MTX とオリゴヌクレオチドまたは 5 - FU、放射線療法とオリゴヌクレオチド）使用され得る。限定しないが非ステロイド性抗炎症剤および副腎皮質ステロイドを含む抗炎症剤、および限定しないがリビリン (ribivirin)、ピダラピン、アシクロビルおよびガンシクロビルを含む抗ウイルス剤も本発明の組成物に組み合わせることができる。アンチセンス化合物と他の非アンチセンス剤との組み合わせも本発

30

40

50

明の範囲内である。2種以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは連続的に使用することができる。

【0211】

他の関連する実施形態において、本発明の組成物は、第1の核酸に標的化される1以上のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第2の核酸標的に標的化される1以上の追加のアンチセンス化合物を含み得る。例えば、第1の標的は、無調ホモログ1 (A T O H 1) の特定のアンチセンス配列であり得、第2の標的は他のヌクレオチド配列由来の領域であり得る。あるいは、本発明の組成物は、同じ無調ホモログ1 (A T O H 1) 核酸標的の異なる領域に標的化される2種以上のアンチセンス化合物を含有できる。アンチセンス化合物の多くの例は、本明細書中に例示され、他は当技術分野において周知の適切な化合物中から選択され得る。2種以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは連続的に使用することができる。

10

【0212】

[投薬]

治療用組成物の処方およびそれらの続く投与(投薬)は、当業者の技能の範囲内であると考えられる。投薬は、数日間から数カ月間継続する、または治療が効果的になるかまたは病態の減退が達成されるまでの治療過程において、治療される病態の重症度および応答性に依りて決まる。最適な投薬レジメンは、患者の身体での薬剤蓄積の測定値から算出され得る。当業者であれば、最適投与量、投薬方法および反復頻度を容易に決定できる。最適な投与量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的効力に依りて変動し得、一般に体外および生体内動物モデルにおいて効果的であると判明したEC50に基づいて推定され得る。一般に投与量は、体重1kgあたり0.01μg~100gであり、1日に、1週間に、1カ月にまたは1年に1回または複数回またはさらに2~20年ごとに1回である場合がある。当業者であれば、測定された滞留時間および体液または組織における薬剤の濃度に基づいて投薬の反復頻度を容易に推定できる。治療の成功に依りて、病態の再発を予防するために患者に維持療法を受けさせることが望ましい場合があり、ここでオリゴヌクレオチドは維持投与において体重1kgあたり0.01μg~100g、1日1回または複数回から20年ごとに1回の範囲で投与される。

20

【0213】

いくつかの実施形態では、患者は、体重1kg当たり少なくとも約1mg、少なくとも約2mg、少なくとも約3mg、少なくとも約4mg、少なくとも約5mg、少なくとも約6mg、少なくとも約7mg、少なくとも約8mg、少なくとも約9mg、少なくとも約10mg、少なくとも約15mg、少なくとも約20mg、少なくとも約25mg、少なくとも約30mg、少なくとも約35mg、少なくとも約40mg、少なくとも約45mg、少なくとも約50mg、少なくとも約60mg、少なくとも約70mg、少なくとも約80mg、少なくとも約90mg、または少なくとも約100mgの用量の薬剤で処置される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの特定の注射用量については、米国特許第7,563,884号、「Antisense modulation of PTP1B expression」に記載されており、これは参照によりその全内容が本明細書に組み入れられる。

30

40

【0214】

本発明の種々の実施形態が上記されているが、それらは単に例示の目的で提示されたものであって、限定を意図したものでないことは理解されるべきである。本発明の精神および範囲から逸脱することなく本明細書における開示内容にもとづいて、開示された実施形態に対してさまざまな変更を加えることができる。したがって本発明の範囲は、上記の実施形態のいずれによっても限定されるべきではない。

【0215】

本明細書中で言及される全ての文書は、参照により本明細書に組み込まれる。本出願中で引用する全ての刊行物および特許文書は、それぞれ個々の刊行物または特許文書が個々に記載された場合と同程度にあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

50

出願人らは、本明細書における種々の参考文献の引用によって、いずれかの特定の参考文献が出願人らの発明の「先行技術」であることを認めるものではない。発明の組成物および方法の実施形態は、以下の実施例において例示される。

#### 実施例

##### 【0216】

以下の限定を意図しない実施例は、本発明の選択された実施形態を例示するものである。提示される構成部分の要素の割合を変えることや代替物は当業者に明らかであり、本発明の実施形態の範囲内であることは理解されよう。

##### 【0217】

[実施例1：A T O H 1のポリヌクレオチドに対する核酸分子アンチセンスおよび/または無調ホモログ1 ( A T O H 1 ) ポリヌクレオチドのセンス鎖に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計]

上記の通り用語「に特異的なオリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド標的」は、( i ) 標的遺伝子の一部分と安定な複合体を形成できる配列、または( i i ) 標的遺伝子のm R N A 転写物の一部分と安定な2重鎖を形成できる配列を有するオリゴヌクレオチドを指す。

##### 【0218】

適切なオリゴヌクレオチドの選択は、各所与の配列において、所望の融解温度(通常50~60)で標的ポリヌクレオチド配列とハイブリッドを形成し、自己二量体または他の複雑な二次構造を形成しない、19~25のヌクレオチドの部分配列を、自動的に識別するコンピュータプログラム(例：I D T A n t i S e n s e D e s i g n、I D T O l i g o A n a l y z e r)を使用することにより促進される。

##### 【0219】

適切なオリゴヌクレオチドの選択は、核酸配列を自動的に配列比較し、同一または相同な領域を示すコンピュータプログラムを使用することによってさらに容易に行える。そのようなプログラムは、例えばG e n b a n k などのデータベースを検索することによって、またはP C R の産物を配列決定することによって得られた核酸配列を比較するために使用される。遺伝子領域と所与の遺伝子の遺伝子間領域由来の核酸配列の比較により、適切な程度の特異性を外来遺伝子に対して示す核酸配列の選択が可能になる。これらの手順によって、標的核酸配列への高い程度の相補性、および所与の遺伝子での他の核酸配列への低い程度の相補性を示すオリゴヌクレオチドの選択が可能となる。当業者であれば、本発明における使用のために遺伝子の適切な領域を選択することには相当な自由度が存在することを理解されよう。

##### 【0220】

アンチセンス化合物は、標的核酸への化合物の結合が標的核酸の通常機能に干渉し、機能および/または活性の調節を生じる場合で、かつ特異的結合が望まれる条件下(すなわち生体内アッセイまたは治療的処置の場合での生理的条件下および体外アッセイの場合でのアッセイが実施される条件下)で、非標的核酸配列へのアンチセンス化合物の非特異的結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合に、「特異的にハイブリダイズ可能」である。

##### 【0221】

本明細書において記載するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性は、当技術分野において周知の1以上の体外アッセイによって決定され得る。例えば本明細書に記載するオリゴヌクレオチドの特性は、標的天然アンチセンスと潜在的薬剤分子との間の結合強度を融解曲線アッセイを使用して測定することによって得られる。

##### 【0222】

標的天然アンチセンスと潜在的薬剤分子(「分子」)との間の結合強度は、分子間相互作用の強度を測定する任意の確立された方法、例えば融解曲線アッセイを使用して推定することができる。

##### 【0223】

10

20

30

40

50



融解曲線アッセイは、天然アンチセンス / 「分子」複合体に関して2本鎖立体構造から1本鎖立体構造への急速な移行が生じる温度を決定する。この温度は、2分子間の相互作用強度の信頼できる測定値として広く認められている。

#### 【0224】

融解曲線アッセイは、実際の天然アンチセンスRNA分子のcDNA複製物または「分子」の結合部位に対応する合成DNAまたはRNAヌクレオチドを使用して実施され得る。このアッセイを実行するために必要な全ての試薬を含むマルチプルキットが利用可能である(例えば、Applied Biosystems Inc. Melt Doctor kit)。これらのキットは、2本鎖DNA(dsDNA)結合色素(ABI HRM dyes、SYBR Green、SYTOなど)の1つを含有する適切なバッファーを含む。dsDNA色素の特性は、それらは遊離形態ではほとんど蛍光を発光しないが、dsDNAに結合した場合は高度に蛍光性であるものである。

10

#### 【0225】

アッセイを実施するために、cDNAまたは対応するオリゴヌクレオチドを「分子」と特定の製造者のプロトコルに定められた濃度で混合する。混合物をすでに形成された全てのdsDNA複合体を解離させるため95℃に加熱し、次いでDNA分子をアニールさせるために室温またはキット製造者によって定められた他の低い温度まで徐冷する。新たに形成された複合体を、次いで反応によって産生される蛍光量についてのデータを連続に収集しながら同時にゆっくりと95℃まで加熱する。蛍光強度は、反応物中に存在するdsDNAの量に反比例する。データは、キットに適合するリアルタイムPCR装置(例えば、ABIのStepOne Plus Real Time PCR SystemまたはLightTyper instrument、Roche Diagnostics、Lewes、UK)を使用して収集できる。

20

#### 【0226】

融解ピークは、適切なソフトウェア(例えば、LightTyper (Roche)またはSDS Dissociation Curve、ABI)を使用して、温度に関する蛍光の負の微分係数( $-d(\text{蛍光})/dT$ )y軸)を温度(x軸)に対してプロットすることによって作図する。dsDNA複合体から単鎖分子への急速な移行の温度を特定するべくデータを分析する。この温度を $T_m$ と称し、2分子間の相互作用の強度に正比例する。典型的には $T_m$ は40℃を超える。

30

#### 【0227】

[実施例2: ATOH1ポリヌクレオチドの調節]

[Hep G2細胞のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置]

実施例2で使用されるすべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、実施例1に記載のように設計した。メーカー(アイオワ州、コーラルのIDT社)に、設計されたホスホオチオエート結合オリゴヌクレオチドを製造するように指示し、表1に示される設計されたホスホオチオエート類似体が提供された。ヌクレオチド間のアスタリスクの記号はホスホオチオエート結合が存在することを示す。実施例2での実験に必要なオリゴヌクレオチドは、例えばIDTが使用する方法といった任意の従来の方法における適切な状態を用いて合成することができる: 固体担体、例えば5ミクロン孔制御ガラスビーズ(CPG)などにて、ホスホアミダイトモノマー(保護基、例えば糖でのトリチル基、AとCでのベンゾイル、およびGでのN-2-イソブチリルなどで保護されるすべての活性基を有する通常のヌクレオチド)を使用して合成する。保護基は、オリゴヌクレオチド合成中の不要な反応を防止する。保護基は、合成プロセスの終了時に除去する。最初のヌクレオチドは、3'炭素と3'5'方向における合成のプロセスを介して固体担体と連結する。伸展するオリゴヌクレオチド鎖への新しい塩基の追加は、4つの工程で行われる: 1) 保護基を、トリクロロ酢酸を使用して、固定化されたヌクレオチドの5'位の酸素から除去する; 2) 固定化された、配列中次のヌクレオチドを、テトラゾールを使用して相互に結合する; 反応は、テトラゾリルホスホアミダイト中間体を介して進行する; 3) 未反応の遊離ヌクレオチドと反応副生成物を除去し、未反応の固定化されたオリゴヌクレオチドを

40

50

、次回の合成への関与を防止するためキャップする；キャッピングは、遊離5'位ヒドロキシル基を無水酢酸とN-メチルイミダゾールを用いてアセチル化することにより達成される；4)ヌクレオチド間の結合を安定化させるために、ホスホジエステル結合が生成される場合は、ヨウ素と水を使用して、またはホスホロオチオエート結合が所望される場合、Beaucage試薬(3H-1、2-ベンゾジチオール-3-オン-1、1-ジオキシド)を使用して、リンを酸化する。2つの酸化剤を交替で使用することにより、キメラ骨格を構成することができる。上記の4つの工程のサイクルは、配列内のすべてのヌクレオチドに対して繰り返される。完全な配列が合成される際に、オリゴヌクレオチドを固体担体から切断し、水酸化アンモニウムを用いて高温で脱保護する。保護基を、脱塩により除去し、残りのオリゴヌクレオチドを、凍結乾燥する。

10

#### 【0228】

実施例2で設計された実験を実行するために、ATCC(cat HB 8065)由来のHepG2細胞を、増殖培地(MEM/EBS(Hyclone cat #SH 30024、または、Mediatech cat # MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech cat # MT35-011-CV)+ペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech cat # MT30-002-CI))で、37、5%CO<sub>2</sub>にて増殖した。実験の前日に、細胞を0.5×10<sup>4</sup>/mlの密度で6ウエルプレートに再播種し、37、5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。実験の当日に、6ウエルプレート内の培地を新鮮な増殖培地に交換した。該オリゴヌクレオチド溶液の代わりに水2μlを含む同様の混合物を偽トランスフェクト対照に使用した。37、5%CO<sub>2</sub>での3~18時間のインキュベーション後、培地を新鮮増殖培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの添加の48時間後、培地を除去し、Promega製のSV Total RNA Isolation System(cat # Z3105)またはQiagen製のRNeasy Total RNA Isolation kit(cat # 74181)を製造者の説明書に従って使用して、RNAを細胞から抽出した。抽出した600ngのRNAを、Thermo Scientific製のVerso cDNAキット(cat # AB1453B)またはHigh Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット(cat # 4368813)を製造者の説明書に記載のとおり使用して得た逆転写反応物に加えた。この逆転写反応からのcDNAを使用して、ABI Taqman gene Expression Mix(cat # 4369510)およびABI(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs 00245453\_s1(ATOH1): Applied Biosystems Inc., Foster City CA)によって設計されたプライマー/プローブを使用するリアルタイムPCRによって遺伝子発現をモニタリングした。使用したPCRサイクルは次の通り:50で2分間、95で10分間、(95で15秒間、60で1分間)を40サイクル、StepOne PlusリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を使用。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した後の遺伝子発現の変化率を、処置サンプルと偽トランスフェクトサンプルの間の18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

20

30

40

#### 【0229】

[結果]:

リアルタイムPCR結果によれば、ATOH1アンチセンスHs.611058と表記されたオリゴの1つでの処置の48時間後に、HepG2細胞中のATOH1のmRNAレベルは有意に上昇している(図2)。

#### 【0230】

本発明は、1以上の実施形態に関して例示および説明してきたが、本明細書および添付図面の解釈および理解にもとづき当業者は均等な変更および改変に想到できよう。加えて、本発明の特定の特性がいくつかの実施形態のうちの一つにだけ関連して開示されている場合があるが、そのような特性は、他の実施形態の1以上の他の特性と、任意の所与のま

50

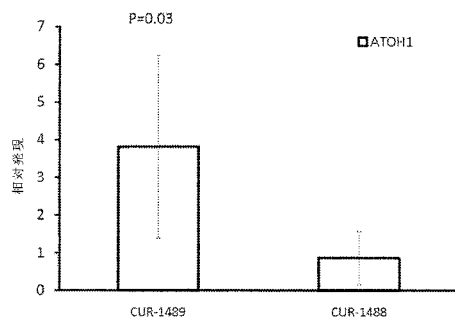
たは特定の用途のために望ましくかつ有利であり得るように組み合わせることができる。

【0231】



開示内容の要約により、技術的開示内容の性質を読者が速やかに確認できるであろう。この要約は、以下の特許請求の範囲の範囲または意味を解釈または限定するために使用されないとの理解を前提として提示されたものである。

【図1】

対照と比較したmRNAのコピー数についての倍数



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2011/037833</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/113(2010.01); C12N 15/63(2006.01); A61K 48/00(2006.01); A61K 31/7088(2006.01)</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/113; A61K 31/15; C12N 5/00; C12N 5/06; C07H 21/02; C12N 5/02; A61K 35/12; A61K 48/00; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: modified oligonucleotide, siRNA, antisense, natural antisense transcript, ATOH1, PNA, LNA		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHI, F. et al. " $\beta$ -Catenin upregulates ATOH1 expression in neural progenitor cells by interaction with an ATOH1 3' enhancer" J. Biol. Chem., 28 October 2009, Vol. 285, No. 1, pp. 392-400	18,32
A	See the whole document, especially Abstract; Page 393.	19-31,33-36,39
Y	US 2004-0203024 A1 (BAKER, B. F. et al.) 14 October 2004	18,32
A	See the whole document, especially Abstract; Pages 17-18; Claims 1, 48-56.	19-31,33-36,39
A	ZHAO, H. et al. "Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development" Genes & Development, 15 March 2008, Vol. 22, No. 6, pp. 722-727 See the whole document, especially Abstract.	18-36,39
A	US 2010-0105760 A1 (COLLARD, J. et al.) 29 April 2010 See the whole document, especially Abstract; Claims 9-12.	18-36,39
A	US 2009-0232780 A1 (EDGE, A. et al.) 17 September 2009 See the whole document, especially Abstract; Claim 1.	18-36,39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 FEBRUARY 2012 (09.02.2012)		Date of mailing of the international search report <b>10 FEBRUARY 2012 (10.02.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer NOH, Eun Joo Telephone No. 82-42-481-8368 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2011/037833**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0064049 A1 (CLARKE, M. F. et al.) 13 March 2008 See the whole document, especially Abstract; Claim 1.	18-36,39

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/037833

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

## a. a sequence listing filed or furnished

- on paper  
 in electronic form

## b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/037833

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 1-17,37-38  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1-17 and 37-38 pertain to a method comprising the step of contacting a biological system or patient tissues with one antisense oligonucleotide or administering to a patient an antisense oligonucleotide. The said methods are thus considered therapeutic methods falling into the category of methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods [Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(i)].
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/037833**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004-0203024 A1	14. 10. 2004	AU 2003-213120 A1	09. 09. 2003
		AU 2003-213120 A8	09. 09. 2003
		AU 2003-248708 A1	31. 12. 2003
		AU 2003-251524 A1	31. 12. 2003
		AU 2003-287464 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-287464 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-287501 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-287502 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-287502 B2	09. 12. 2010
		AU 2003-287503 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-287504 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-287504 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-287505 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-290573 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-290573 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-290596 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-290596 A2	03. 06. 2004
		AU 2003-290596 B2	12. 05. 2011
		AU 2003-290597 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-290597 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-290598 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-290598 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-291682 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-291682 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-291721 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-291721 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-291751 A1	07. 06. 2004
		AU 2003-291751 A8	07. 06. 2004
		AU 2003-291753 A1	07. 06. 2004
		AU 2003-291753 B2	08. 07. 2010
		AU 2003-291755 A1	07. 06. 2004
		AU 2003-291755 A8	07. 06. 2004
		AU 2003-295387 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-295387 A8	03. 06. 2004
		AU 2003-295388 A1	03. 06. 2004
		AU 2003-295389 A1	03. 06. 2004
		AU 2004-274021 A1	31. 03. 2005
		AU 2004-274021 B2	13. 08. 2009
		AU 2005-252662 A1	22. 12. 2005
		AU 2005-252662 B2	18. 08. 2011
		AU 2005-252663 A1	22. 12. 2005
		AU 2005-252663 B2	07. 07. 2011
		CA 2488842 A1	24. 12. 2003
		CA 2504554 A1	27. 05. 2004
		CA 2504694 A1	21. 05. 2004
		CA 2504701 A1	27. 05. 2004
		CA 2504720 A1	27. 05. 2004
		CA 2504929 A1	27. 05. 2004
		CA 2505090 A1	27. 05. 2004



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/037833**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2505330 A1	27.05.2004
		CA 2538252 A1	31.03.2005
		CA 2568735 A1	22.12.2005
		CA 2569036 A1	22.12.2005
		CA 2569419 A1	22.12.2005
		EP 0928290 A1	02.02.2005
		EP 0928290 B1	30.03.2005
		EP 0928290 B9	09.11.2005
		EP 1485400 A2	15.12.2004
		EP 1485400 A4	30.11.2005
		EP 1515971 A2	23.03.2005
		EP 1562971 A2	17.08.2005
		EP 1563070 A2	17.08.2005
		EP 1578761 A2	28.09.2005
		EP 1578765 A2	28.09.2005
		EP 1600506 A2	30.11.2005
		EP 1600506 A3	09.07.2008
		EP 1621545 A2	01.02.2006
		EP 1621545 A3	06.08.2008
		EP 1677822 A2	12.07.2006
		EP 1765074 A2	28.03.2007
		EP 1765415 A2	28.03.2007
		EP 1765416 A2	28.03.2007
		EP 1766052 A1	28.03.2007
		EP 1766071 A2	28.03.2007
		EP 2361923 A2	31.08.2011
		JP 2000-510446 A	15.08.2000
		JP 2005-533777 A	10.11.2005
		JP 2007-514643 A	07.06.2007
		JP 2008-501335 A	24.01.2008
		JP 2008-501693 A	24.01.2008
		JP 2008-501694 A	24.01.2008
		JP 2011-142911 A	28.07.2011
		US 05898031A A	27.04.1999
		US 06107094A A	22.08.2000
		US 2002-0164601 A1	07.11.2002
		US 2002-0165189 A1	07.11.2002
		US 2003-0044941 A1	06.03.2003
		US 2003-0096286 A1	22.05.2003
		US 2003-0096287 A1	22.05.2003
		US 2003-0096784 A1	22.05.2003
		US 2003-0119777 A1	26.06.2003
		US 2004-0126867 A1	01.07.2004
		US 2004-0146902 A1	29.07.2004
		US 2004-0147022 A1	29.07.2004
		US 2004-0147023 A1	29.07.2004
		US 2004-0147470 A1	29.07.2004
		US 2004-0161777 A1	19.08.2004
		US 2004-0161844 A1	19.08.2004
		US 2004-0171028 A1	02.09.2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/037833**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2004-0171029 A1	02.09.2004
		US 2004-0171030 A1	02.09.2004
		US 2004-0171031 A1	02.09.2004
		US 2004-0171032 A1	02.09.2004
		US 2004-0171033 A1	02.09.2004
		US 2004-0171570 A1	02.09.2004
		US 2004-0175828 A1	09.09.2004
		US 2004-0191773 A1	30.09.2004
		US 2004-0254358 A1	16.12.2004
		US 2004-0266706 A1	30.12.2004
		US 2005-0032067 A1	10.02.2005
		US 2005-0032068 A1	10.02.2005
		US 2005-0032069 A1	10.02.2005
		US 2005-0037370 A1	17.02.2005
		US 2005-0042647 A1	24.02.2005
		US 2005-0053976 A1	10.03.2005
		US 2005-0059016 A1	17.03.2005
		US 2005-0130923 A1	16.06.2005
		US 2005-0159384 A1	21.07.2005
		US 2005-118605 A9	02.06.2005
		US 2007-0123484 A1	31.05.2007
		US 2007-0172948 A1	26.07.2007
		US 2007-0173474 A1	26.07.2007
		US 2007-0173475 A1	26.07.2007
		US 2007-0179106 A1	02.08.2007
		US 2007-0179107 A1	02.08.2007
		US 2007-0179108 A1	02.08.2007
		US 2007-0179109 A1	02.08.2007
		US 2007-0185046 A1	09.08.2007
		US 2007-0185047 A1	09.08.2007
		US 2007-0275921 A1	29.11.2007
		US 2008-0039618 A1	14.02.2008
		US 2008-0119427 A1	22.05.2008
		US 2009-0270486 A1	29.10.2009
		US 2010-0151458 A1	17.06.2010
		US 2010-0216982 A1	26.08.2010
		US 2010-0324277 A1	23.12.2010
		US 6737512 B2	18.05.2004
		US 7432249 B2	07.10.2008
		US 7432250 B2	07.10.2008
		US 7491524 B2	17.02.2009
		US 7629321 B2	08.12.2009
		US 7695902 B2	13.04.2010
		US 7696345 B2	13.04.2010
		US 7812149 B2	12.10.2010
		US 7875733 B2	25.01.2011
		US 7919612 B2	05.04.2011
		US 7939677 B2	10.05.2011
		WO 03-070904 A2	28.08.2003
		WO 03-070904 A3	28.08.2003

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/037833**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 03-105770 A2	24.12.2003
		WO 03-105770 A3	24.12.2003
		WO 03-106477 A1	24.12.2003
		WO 2004-041889 A2	21.05.2004
		WO 2004-041889 A3	21.05.2004
		WO 2004-041924 A2	21.05.2004
		WO 2004-041924 A3	21.05.2004
		WO 2004-042029 A2	21.05.2004
		WO 2004-042029 A3	21.05.2004
		WO 2004-043977 A2	27.05.2004
		WO 2004-043977 A3	27.05.2004
		WO 2004-043978 A2	27.05.2004
		WO 2004-043978 A3	27.05.2004
		WO 2004-043979 A2	27.05.2004
		WO 2004-043979 A3	27.05.2004
		WO 2004-044131 A2	27.05.2004
		WO 2004-044131 A3	27.05.2004
		WO 2004-044132 A2	27.05.2004
		WO 2004-044132 A3	27.05.2004
		WO 2004-044133 A2	27.05.2004
		WO 2004-044133 A3	27.05.2004
		WO 2004-044134 A2	27.05.2004
		WO 2004-044134 A3	27.05.2004
		WO 2004-044135 A2	27.05.2004
		WO 2004-044135 A3	27.05.2004
		WO 2004-044136 A2	27.05.2004
		WO 2004-044136 A3	27.05.2004
		WO 2004-044137 A2	27.05.2004
		WO 2004-044137 A3	27.05.2004
		WO 2004-044138 A2	27.05.2004
		WO 2004-044138 A3	27.05.2004
		WO 2004-044139 A2	27.05.2004
		WO 2004-044139 A3	27.05.2004
		WO 2004-044140 A2	27.05.2004
		WO 2004-044140 A3	27.05.2004
		WO 2004-044141 A2	27.05.2004
		WO 2004-044141 A3	27.05.2004
		WO 2004-044245 A1	27.05.2004
		WO 2005-027962 A1	31.03.2005
		WO 2005-027962 A2	31.03.2005
		WO 2005-027962 A3	31.03.2005
		WO 2005-120230 A2	22.12.2005
		WO 97-46570 A1	11.12.1997
US 2010-0105760 A1	29.04.2010	CA 2739464 A1	08.04.2010
		EP 2352830 A2	10.08.2011
		KR 20110065522A	15.06.2011
		WO 2010-040112 A2	08.04.2010
		WO 2010-040112 A3	15.07.2010
		WO 2010-040112 A3	08.04.2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2011/037833**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2010-129799 A2	11.11.2010
		WO 2010-129799 A3	11.11.2010
US 2009-0232780 A1	17.09.2009	AU 2009-212135 A1	13.08.2009
		CA 2714370 A1	13.08.2009
		CN 101990433 A	23.03.2011
		EP 2254572 A2	01.12.2010
		JP 2011-511806 A	14.04.2011
		JP 2011-511806 T	14.04.2011
		WO 2009-100438 A2	13.08.2009
		WO 2009-100438 A3	22.04.2010
		WO 2009-100438 A3	13.08.2009
US 2008-0064049 A1	13.03.2008	AU 2006-308847 A1	10.05.2007
		AU 2006-308847 B2	15.09.2011
		CA 2628255 A1	10.05.2007
		EP 1945754 A2	23.07.2008
		EP 1945754 A4	24.06.2009
		JP 2009-513161 A	02.04.2009
		JP 2009-513161 T	02.04.2009
		US 2010-0169990 A1	01.07.2010
		US 7723112 B2	25.05.2010
		WO 2007-053648 A2	10.05.2007
		WO 2007-053648 A3	12.07.2007
		WO 2007-053648 A3	10.05.2007

## 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 27/16	(2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 1/02	(2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 31/7088	(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7125	(2006.01)	A 6 1 K 31/7125	

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

(72) 発明者 コルコワ シャーマン, オルガ  
 アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 4 6 9, テキサス, 1 8 2 8 8 エスイー ヘリテイジ ドラ  
 イブ

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 DA02 GA11 HA17  
 4C084 AA13 NA14 ZA011 ZA341 ZA591 ZA661 ZA671 ZA961 ZB211 ZB261  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA34 ZA59 ZA66  
 ZA67 ZA96 ZB21 ZB26