

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7127076号

(P7127076)

(45)発行日 令和4年8月29日(2022.8.29)

(24)登録日 令和4年8月19日(2022.8.19)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 3 0 Z

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 3

A 6 1 P 7/10 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 33/14 (2006.01)

A 6 1 P 7/10 Z N A

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 33/14

請求項の数 23 (全593頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-25372(P2020-25372)

(22)出願日 令和2年2月18日(2020.2.18)

(62)分割の表示 特願2016-565502(P2016-565502)
の分割

原出願日 平成27年5月1日(2015.5.1)

(65)公開番号 特開2020-96629(P2020-96629A)

(43)公開日 令和2年6月25日(2020.6.25)

審査請求日 令和2年3月6日(2020.3.6)

(31)優先権主張番号 61/987,478

(32)優先日 平成26年5月1日(2014.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/058,629

(32)優先日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(73)特許権者 595104323

アイオーニス ファーマシューティカル
ズ, インコーポレーテッドIonis Pharmaceutic
als, Inc.アメリカ合衆国カリフォルニア州920
10, カールズバッド, ガゼル コート
2855

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

中西 基晴

(74)代理人 100135415

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P K K発現を調節するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾オリゴヌクレオチド及びコンジュゲート基を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

核酸塩基：配列番号10の33183-33242

の長さが等しい部分に100%相補的な少なくとも12個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有し、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、プレカリクレイン(PKK)核酸の長さが等しい部分に少なくとも90%相補的であり、前記修飾オリゴヌクレオチドは、PKK mRNA及び/またはPKKタンパク質レベルを減少させることができる、前記化合物。

【請求項2】

修飾オリゴヌクレオチド及びコンジュゲート基を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

配列番号：705, 155-160, 261, 702-704, 706 及び 707

のいずれか一つから選択される配列の少なくとも12個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有し、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、プレカリクレイン(PKK)核酸の長さが等しい部分に少なくとも90%相補的であり、前記修飾オリゴヌクレオチドは、PKK mRNA及び/またはPKKタンパク質レベルを減少させることができる

、前記化合物。

【請求項 3】

前記修飾オリゴヌクレオチドが 15 ～ 30 個の連結されたヌクレオシドから成る、請求項 1 または 2 のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項 4】

前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 10 の長さが等しい部分に少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 相補的である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項 5】

前記修飾オリゴヌクレオチドが一本鎖修飾オリゴヌクレオチドである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一つに記載の化合物。

10

【請求項 6】

前記一本鎖修飾オリゴヌクレオチドがギャップマーである、請求項 5 の化合物。

【請求項 7】

前記修飾オリゴヌクレオチドは

10 個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；

5 個の連結されたヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント；及び

5 個の連結されたヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント、

を含み、

前記ギャップセグメントは、5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントに直接隣接して 5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントの間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾された糖を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一つに記載の化合物。

20

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一つに記載の化合物であって、

a. 前記修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合であり、該修飾ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合であってもよい、前記化合物；または

b. 前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合であり、該修飾ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合であってもよい、前記化合物。

30

【請求項 9】

前記修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの核酸塩基が修飾核酸塩基であり、該修飾核酸塩基は 5-メチルシトシンであってもよい、請求項 1 ～ 8 のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一つに記載の化合物であって、

a. 前記修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つのヌクレオシドが修飾された糖を含む、前記化合物；または、

b. 前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが修飾された糖を含む、前記化合物。

40

【請求項 11】

前記修飾された糖が二環式糖であり、該二環式糖は：

a. $4' - (CH_2)_n - O - 2'$ 橋 {ここで n は 1 または 2 である}；または

b. $4' - CH(CH_3) - O - 2'$ 橋

を含んでもよい、請求項 10 の化合物。

【請求項 12】

前記修飾された糖は 2'-修飾された糖であり、該 2'-修飾された糖は、2'-O-メトキシエチル、2'-F、及び 2'-O-メチルから選択される置換を含み得る、請求項 10 の化合物。

【請求項 13】

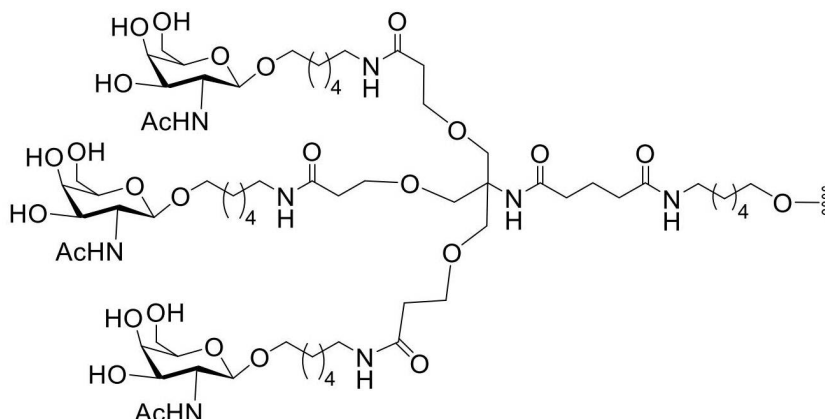
50

前記コンジュゲート基が、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）リガンドを含む、請求項1～12のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項14】

前記コンジュゲート基は以下を含む、請求項1～12のいずれか一つに記載の化合物。

【化1】



10

【請求項15】

前記コンジュゲート基は、前記修飾オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端で、該修飾オリゴヌクレオチドに共有結合で結合している、請求項1～14のいずれか一つに記載の化合物。

20

【請求項16】

前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が配列番号705を含むか、または配列番号705からなる、請求項1～15のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項17】

修飾オリゴヌクレオチド及びコンジュゲート基を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、5'ウイングセグメント、中央のギャップセグメント、及び3'ウイングセグメントから成るギャップマーであり：

5'ウイングセグメントは5個の2'-O-メトキシエチルヌクレオシドからなり、

30

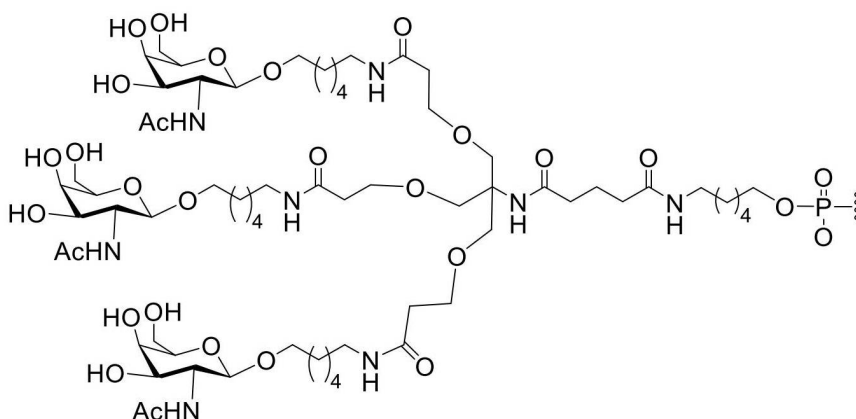
中央のギャップセグメントは10個のβ-D-デオキシリボヌクレオシドからなり、

3'ウイングセグメントは5個の2'-O-メトキシエチルヌクレオシドからなり、

前記修飾オリゴヌクレオチドは、核酸塩基配列 5'CCCCCTTCTTTATAGCCAGC-3' (配列番号705)を有し、ここで、各シトシンは5メチルシトシンであり、前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、及び

前記コンジュゲート基は、以下の化学構造：

【化2】



40

50

で表され、前記修飾オリゴヌクレオチドの5'末端は該コンジュゲート基に直接結合している、前記化合物。

【請求項18】

前記修飾オリゴヌクレオチドが二本鎖修飾オリゴヌクレオチドである、請求項1～4及び7～17のいずれか一つに記載の化合物。

【請求項19】

請求項1～18のいずれかに記載の化合物、及び医薬的に許容される担体または希釈剤を含む組成物。

【請求項20】

請求項19に記載の組成物であって、

a. 前記医薬上許容される希釈剤が、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)である；及び／または

b. 前記化合物の前記修飾オリゴヌクレオチドが、塩である、
前記組成物。

【請求項21】

請求項1～18のいずれかに記載の化合物、または請求項19または20の組成物を含む、PKK関連疾患、障害または病態を予防、治療、または改善するための医薬組成物。

【請求項22】

前記PKK関連疾患、障害または病態は、

(i) 浮腫、黄斑浮腫、眼の浮腫、脳浮腫、血管浮腫、遺伝性血管浮腫(HAE)、または目蓋の血管浮腫；

(ii) 腫脹；

(iii) 血栓症、または深部静脈血栓症；

(vi) 塞栓症、または肺塞栓症；

(v) 血栓塞栓症；または

(vi) 梗塞、心筋梗塞、または脳卒中

を含む、請求項21に記載の医薬組成物。

【請求項23】

請求項1～18のいずれかに記載の化合物、または請求項19または20の組成物を含む、炎症性疾患、障害または病態を予防、治療、または改善するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本願は、電子形式の配列表とともに出願されている。この配列表は、2015年4月27日に作成されたサイズ約636kbのBIOL0252WOSEQ_ST25.txtという名称のファイルとして提供される。この配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本明細書は、動物においてヒト血漿プレカリクレイン(PKK)mRNA及びタンパク質の発現を減少させるための化合物、組成物、及び方法を提供する。当該組成物及び方法は、炎症性及び血栓塞栓症病態を治療、予防、または改善するのに有用である。

【背景技術】

【0003】

血漿プレカリクレイン(PKK)は、血漿カリクレイン(PK)の前駆体であり、KLKB1遺伝子によってコードされる。PKKは、血液凝固、フィブリン溶解、キニン生成、及び炎症の表面依存性活性化に関与する糖タンパク質である。PKKは、内部のArg-Ileのペプチド結合の切断によって、第XIIa因子によってPKに変換される。PKはキニノーゲンからキニンを遊離し、また、プラスミノーゲンからプラスミンを生成す

10

20

30

40

50

る。PKは、炎症、血圧のコントロール、凝固、及び疼痛において役割を果たすいくつかのタンパク質からなる、キニン-カリクレイン経路のメンバーである。

【発明の概要】

【0004】

本明細書はPKK mRNA及びタンパク質の発現を調節するための化合物、組成物、及び方法を提供する。ある特定の実施形態では、PKK mRNA及びタンパク質の発現を調節するのに有用な化合物は、アンチセンス化合物である。ある特定の実施形態では、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である。

【0005】

ある特定の実施形態では、細胞または組織で調節を行うことができる。ある特定の実施形態では、細胞または組織は動物内に存在する。ある特定の実施形態では、動物はヒトである。ある特定の実施形態では、PKK mRNAレベルが減少する。ある特定の実施形態では、PKKタンパク質レベルが減少する。そのような減少は、時間依存的または用量依存的に生じ得る。

【0006】

また、PKK関連疾患、障害及び病態を予防、治療及び改善するための化合物、組成物、及び方法が提供される。ある特定の実施形態では、そのようなPKK関連疾患、障害、及び病態は、炎症性疾患である。ある特定の実施形態では、この炎症性疾患は、急性または慢性の炎症性疾患であってもよい。ある特定の実施形態では、当該炎症性疾患は、遺伝性血管浮腫（HAE）、浮腫、血管浮腫、腫脹、目蓋の血管浮腫、眼の浮腫、黄斑浮腫、脳浮腫を含んでもよい。ある特定の実施形態では、当該PKK関連疾患、障害、及び病態は、血栓塞栓性疾患である。ある特定の実施形態では、当該血栓塞栓性疾患は、血栓症、塞栓症、血栓塞栓症、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、脳卒中、及び心筋梗塞を含んでもよい。

【0007】

当該疾患、障害、及び病態は、共通の2つ以上のリスク因子、原因、または結果を有する可能性がある。

【0008】

炎症性疾患の発症のある特定のリスク因子及び原因は、炎症性疾患に対する遺伝的素因及び環境因子を含む。ある特定の実施形態では、対象は、変異補体1エステラーゼ阻害剤（C1-INH）遺伝子または変異因子12遺伝子を有する。ある特定の実施形態では、当該対象は、アンジオテンシン変換酵素阻害剤（ACE阻害剤）、またはアンジオテンシンII受容体遮断薬（ARB）を摂取したことがあるか、摂取している。ある特定の実施形態では、対象は、血管性浮腫を引き起こすアレルギー反応があった。ある特定の実施形態では、対象は、I型HAEを有している。ある特定の実施形態では、対象は、II型HAEを有している。ある特定の実施形態では、対象は、III型HAEを有している。

【0009】

炎症性疾患の発症に関連するある特定の転帰として、四肢（すなわち、手、足、腕、脚）、腸（腹部）、顔、性器、喉頭（すなわち、発声器）を含む様々な身体部分の浮腫／腫脹、血管透過性、血管漏出、一般的な炎症、腹痛、膨満感、嘔吐、下痢、皮膚のかゆみ、呼吸器（喘息）反応、鼻炎、アナフィラキシー、気管支収縮、低血圧、昏睡、及び死が挙げられる。

【0010】

血栓塞栓性疾患の発症のある特定のリスク因子及び原因として、血栓塞栓性疾患に対する遺伝的素因、不動、手術（特に整形外科）、悪性腫瘍、妊娠、高齢、経口避妊薬の使用、心房細動、以前の血栓塞栓性病態、慢性炎症性疾患、及び遺伝性または獲得性プロトロンビン凝固障害が挙げられる。血栓塞栓症の病態の発症に関連するある特定の転帰として、病変血管の血流の減少、組織の死、及び死亡が挙げられる。

【0011】

ある特定の実施形態では、治療方法は、治療を必要とする個体にPKKアンチセンス化

10

20

30

40

50

合物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、治療方法は、治療を必要とする個体にPKKアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】実施例124に記載する、血液試料からの、HMWKのウエスタンブロット定量を示す。

【図2】実施例127に記載する、血液試料からの、HMWKのウエスタンブロット定量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

詳細な説明

当該一般的な説明及び以下の詳細な説明はどちらも例示的かつ説明的であるにすぎず、本願に係る発明を限定するものではないと理解すべきである。本明細書において、単数形の使用は、別段の明示がある場合を除き、複数形を含む。本明細書において「または（or）」の使用は、別段の言明がある場合を除き、「及び／または（and/or）」を意味する。さらに、「～を含む（including）」という用語、ならびに「～を含む（includes）」及び「含まれる（included）」などの他の形態の使用は、限定的ではない。また、「要素」または「成分」などの用語は、別段の明示がある場合を除き、1つのユニットを含む要素及び成分と2つ以上のサブユニットを含む要素及び成分をどちらも包含する。

【0014】

特別な定義が与えられない限り、本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、ならびに医化学及び製薬化学に関連して用いられる術語、ならびにそれらの手順及び技法は、周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。化学合成及び化学分析には、標準的技法を使用することができる。そのような技法及び手順のうちある特定のものは、例えば「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」Sangvi及びCook編，American Chemical Society，ワシントンD.C.，1994、「Remington's Pharmaceutical Sciences」Mack Publishing Co.，ペンシルベニア州イーストン，第21版，2005、及び「Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications」Stanley T. Crooke編，CRC Press，フロリダ州ボカラトン、ならびにSambrook et al.，「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989に見いだすことができ、これらは、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。許容される場合、本開示の全体を通して言及する特許、出願、公開された出願、及び他の出版物、ならびに他のデータはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0015】

本明細書で使用する節の見出しは、構成上の目的のためだけにあり、記述の主題を限定するものとして解釈されるべきではない。本願に挙げるすべての文書、または文書の部分は、これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍、及び論文を含み、本明細書で検討する文書の部分を参照することにより、その全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【0016】

定義

特定の定義が与えられない限り、本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、ならびに医化学及び製薬化学に関連して用いられる術語、ならびにそれらの手順及び技法は、周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。化学合成及び化学分析には、標準的技法を使用することができる。許可されている場合、本明細書出の開示全般を参照する

10

20

30

40

50

すべての特許、出願、公開された出願及び他の刊行物、GENBANK寄託番号及び国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）及び他のデータ等のデータベースにより得られる関連の配列情報は、本明細書で検討する文書の部分を参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0017】

別段の表示がある場合を除き、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0018】

「2'-O-メトキシエチル」（または2'-MOE、2'-OCH₂CH₂-OCH₃及びMOE）は、フラノース環の2'位のO-メトキシエチル修飾を指す。2'-O-メトキシエチル修飾糖は修飾糖である。

【0019】

「2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド」（または「2'-MOEヌクレオシド」）は、2'-MOEヌクレオシド糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0020】

「2'-置換ヌクレオシド」は、HまたはOH以外のフラノース環の2'位に置換基を含むヌクレオシドを意味する。ある特定の実施形態において、2'置換ヌクレオシドは、二環式糖修飾を有するヌクレオシドを含む。

【0021】

「2'-デオキシヌクレオシド」は、ヌクレオシドの糖部分の2'位に水素を含むヌクレオシドを意味する。

【0022】

「3'標的部位」とは、特定のアンチセンス化合物の最も3'側のヌクレオチドに相補的な標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0023】

「5'標的部位」とは、特定のアンチセンス化合物の最も5'側のヌクレオチドに相補的な標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0024】

「5-メチルシトシン」とは、5位に取り付けられたメチル基で修飾されたシトシンを意味する。5-メチルシトシンは修飾核酸塩基である。

【0025】

「約」とは、ある値の±7%以内を意味する。例えば、「PKKの少なくとも約70%阻害を達成する化合物」と言明した場合、それは、PKKレベルが63%～77%の範囲内で阻害されることを含意する。

【0026】

「同時に投与される」は、両方の薬理学的効果が同時に患者に現れる任意の方法で、2つの治療薬の同時投与を指す。同時投与は、両剤が、単一の医薬組成物、同じ投与形態で、または同じ投与経路で、投与されることを必要としない。両方の治療薬の効果が同時に現れる必要はない。効果は一定時間、重複する必要があるだけで、同一の広がりを持つ必要はない。

【0027】

「投与」は、動物に医薬品を提供することを意味し、医療専門家及び自己投与することによって投与することを含むが、これに限定されない。

【0028】

本明細書にいう「アルキル」とは、最大24個の炭素原子を含有する飽和直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。アルキル基の例として、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、n-ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルキル基は、典型的には、1～約24個の炭素原子、より典型的には、1～約12個の炭素原子（C₁-C₁₂アルキル）を含み、1～約6個の炭素原子がより好ましい。

【0029】

10

20

30

40

50

本明細書にいう「アルケニル」とは、最大24個の炭素原子を含有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。アルケニル基の例として、エテニル、プロペニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イル、1,3-ブタジエンなどのジエンなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基は、典型的には、2~約24個の炭素原子、より典型的には、2~約12個の炭素原子を含み、2~約6個の炭素原子がより好ましい。本明細書にいうアルケニル基は、場合によっては、2つ以上のさらなる置換基を含みうる。

【0030】

本明細書にいう「アルキニル」とは、最大24個の炭素原子を含有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有する直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。アルキニル基の例として、エチニル、1-プロピニル、1-ブチニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルキニル基は、典型的には、2~約24個の炭素原子、より典型的には、2~約12個の炭素原子を含み、2~約6個の炭素原子がより好ましい。本明細書にいうアルキニル基は、場合によっては、2つ以上のさらなる置換基を含みうる。

10

【0031】

本明細書にいう「アシル」とは、有機酸からヒドロキシル基を除去することによって形成されるラジカルを意味し、一般式-C(O)-Xを有し、式中、Xは、典型的には、脂肪族、脂環式、または芳香族である。例として、脂肪族カルボニル、芳香族カルボニル、脂肪族スルホニル、芳香族スルフィニル、脂肪族スルフィニル、芳香族ホスフェート、脂肪族ホスフェートなどが挙げられる。本明細書にいうアシル基は、さらなる置換基の場合によっては含みうる。

20

【0032】

本明細書にいう「脂環式」とは、環式環系を意味し、当該環は、脂肪族である。当該環系は、2つ以上の環を含むことができ、少なくとも1つの環は脂肪族である。好ましい脂環式基は、環内に約5~約9個の炭素原子を有する環を含む。本明細書にいう脂環式基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

【0033】

本明細書にいう「脂肪族」とは、最大24個の炭素原子を含有する直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味し、任意の2つの炭素原子の間の飽和度は、一重、二重、または三重結合である。脂肪族基は、好ましくは、1~約24個の炭素原子、より典型的には、1~約12個の炭素原子を含有し、1~約6個の炭素原子がより好ましい。脂肪族基の直鎖または分岐鎖は、窒素、酸素、硫黄、及びリンを含む2つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよい。ヘテロ原子によって中断されているそのような脂肪族基には、ポリアルコキシ、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアミン、及びポリイミンが含まれるが、これらに限定されない。本明細書にいう脂肪族基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

30

【0034】

本明細書にいう「アルコキシ」とは、アルキル基と酸素原子とで形成されるラジカルを意味し、アルコキシ基は当該酸素原子を使って親分子に取り付けられる。アルコキシ基の例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、nブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、n-ペントキシ、ネオペントキシ、n-ヘキソキシなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書にいうアルコキシ基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

40

【0035】

本明細書にいう「アミノアルキル」とは、アミノ置換されたC₁-C₁₂アルキルラジカルを意味する。当該ラジカルのアルキル部分は、親分子と共有結合を形成する。アミノ基は、任意の位置に位置することができ、アミノアルキル基は、アルキル部分及び／またはアミノ部分を、さらなる置換基で置換することができる。

【0036】

本明細書にいう「アラルキル」及び「アリールアルキル」とは、C₁-C₁₂アルキ

50

ルラジカルに共有結合で連結されている芳香族基を意味する。結果として生じるアラルキル（またはアリールアルキル）基のアルキルラジカル部分は、親分子と共有結合を形成する。例として、ベンジル、フェネチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書にいうアラルキル基は、場合によっては、当該ラジカル基を形成するアルキル基、アリール基、またはそれら両方の基に取り付けられたさらなる置換基を含みうる。

【0037】

本明細書にいう「アリール」及び「芳香族」とは、2つ以上の芳香族環を有する単環式または多環式炭素環式環系ラジカルを意味する。アリール基の例として、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、イデニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいアリール環系は、2つ以上の環内に約5～約20個の炭素原子を有する。本明細書にいうアリール基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

10

【0038】

「改善」とは、病態または疾患の重症度の少なくとも1つの指標の軽減、遅延、停止、または逆転を指す。指標の重症度は、当業者に知られている主観的尺度または客観的尺度によって決定することができる。

【0039】

「動物」とは、ヒトまたはヒト以外の動物を指し、これには、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、及び非ヒト霊長類（サル及びチンパンジーを含むが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。

【0040】

「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物によるその標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因する任意の検出可能な活性または測定可能な活性を意味する。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性が、標的核酸またはそのような標的核酸がコードするタンパク質の量または発現の減少である。「アンチセンス化合物」とは、水素結合によって標的核酸へのハイブリダイゼーションを起こすことができるオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物の例として、一本鎖化合物及び二本鎖化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*ssRNA*、及び占有に基づく（*occupancy-based*）化合物が挙げられる。

20

【0041】

「アンチセンス化合物」は、水素結合によって標的核酸へのハイブリダイゼーションを受けることができるオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物の例として、一本鎖化合物及び二本鎖化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*ssRNA*、及び占有に基づく（*occupancy-based*）化合物が挙げられる。

30

【0042】

「アンチセンス阻害」とは、アンチセンス化合物が存在しない場合の標的核酸レベルとの比較で、または標的核酸に相補的なアンチセンス化合物の存在下での標的核酸レベルの低減を意味する。「アンチセンス機序」は化合物と標的核酸とのハイブリダイゼーションを伴うすべての機序をいう。当該ハイブリダイゼーションの結果または効果は、標的の分解または標的の占有であり、これに付随して、例えば転写またはスプライシングに関わる細胞機構の停止が起こる。

40

【0043】

「アンチセンス機序」は、化合物と標的核酸とのハイブリダイゼーションに関与するすべての機序をいう。当該ハイブリダイゼーションの結果または効果は、標的の分解または標的の占有であり、例えば転写またはスプライシングに関わる細胞機構の停止が付随する。

【0044】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的核酸の対応するセグメントへのハイブリダイゼーションを可能にする核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。「塩基相補性」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基と標的核酸中の対応する核酸塩基との正確な塩基対合（すなわちハイブリダイゼーション）を起こす能力を

50

指し、これは、対応する核酸塩基間のワトソン-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によって媒介される。

【0045】

「塩基相補性」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基が標的核酸中の対応する核酸塩基と正確な塩基対合（すなわちハイブリダイゼーション）を起こす能力を指し、これは、対応する核酸塩基間のワトソン-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によって媒介される。

【0046】

「二環式糖」は、2つの原子の架橋によって修飾されるフラノース環を意味する。二環式糖は修飾された糖である。

【0047】

「二環式ヌクレオシド」（または、BNA）は、糖環の2つの炭素原子をつなぐ橋を含む糖部分を有するヌクレオシドを意味し、それによって二環式糖系を形成する。ある特定の実施形態では、当該架橋は、糖環の4'-炭素及び2'-炭素を接続する。

【0048】

「キャップ構造」または「末端キャップ部分」とは、アンチセンス化合物のどちらかの末端に組み込まれた化学修飾を意味する。

【0049】

「炭水化物」とは、天然に存在する炭水化物、修飾炭水化物、または炭水化物誘導体を意味する。

【0050】

「炭水化物クラスター」とは、足場基またはリンカー基に取り付けられた2つ以上の炭水化物残基を有する化合物を意味する（例えば、炭水化物共役クラスターの例として、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Maier et al., 「Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting」 Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29、または Rensen et al., 「Design and Synthesis of Novel N-Acetylglactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor」 J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808を参照のこと）。

【0051】

「炭水化物誘導体」とは、出発物質または中間体として炭水化物を用いて合成される任意の化合物を意味する。

【0052】

「cEt」または「拘束エチル」とは、4'-炭素と2'-炭素とをつなぐ橋を含む糖部分を有する二環式ヌクレオシドを意味し、この橋は4'-CH(CH₃)-O-2'という式を有する。

【0053】

「cEt修飾ヌクレオシド」（または「拘束エチルヌクレオシド」）は、4'-CH(CH₃)-O-2'橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0054】

「化学的に異なる領域」は、同じアンチセンス化合物の別な領域よりも化学的に異なるいくつかの方法にあるアンチセンス化合物の領域を指す。例えば、2'-O-メトキシエチルヌクレオシドを有する領域は、2'-O-メトキシエチル修飾のないヌクレオシドを有する領域と化学的に異なる。

【0055】

「化学修飾」とは、天然に存在する対応物と比較した場合の化合物の化学的相違を意味

10

20

30

40

50

する。オリゴヌクレオチドの化学修飾は、ヌクレオシド修飾（糖部分修飾及び核酸塩基修飾を含む）ならびにヌクレオシド間連結部修飾を含む。オリゴヌクレオチドの場合、核酸塩基配列だけの相違は、化学修飾には含まれない。

【0056】

「キメラアンチセンス化合物」は、少なくとも2つの化学的に異なる領域を有するアンチセンス化合物を意味し、各位置は複数のサブユニットを有する。

【0057】

「切断可能な結合」とは、開裂されうる任意の化学結合を意味する。ある特定の実施形態では、切断可能な結合は、アミド、ポリアミド、エステル、エーテル、ホスホジエステルの一方もしくは両方のエステル、リン酸エステル、カルバメート、ジスルフィド、またはペプチドのなかから選択される。

10

【0058】

「切断可能部分」とは、生理学的条件下で開裂されうる結合または基を意味する。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、細胞の内部またはリソソームなどの細胞内コンパートメントの内部で切断される。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、ヌクレアーゼなどの内在性酵素によって切断される。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、1個、2個、3個、4個、または5個以上の切断可能な結合を有する原子団を含む。

【0059】

「同時投与」は、個体に2つ以上の治療薬を投与することを意味する。2つ以上の治療薬は、単一の医薬組成物であっても、別々の医薬組成物であってもよい。2つ以上の治療薬の各々は、同一または異なる投与経路を介して投与してもよい。同時投与は、並行または逐次投与を含む。

20

【0060】

「相補性」は、第一の核酸及び第二の核酸の核酸塩基間で対形成する能力を意味する。

【0061】

「含む」は、定められたステップもしくは要素、またはステップもしくは要素のグループを含むが、いかなる他のステップもしくは要素、またはステップもしくは要素のグループを排除しないことが理解される。

【0062】

「共役体」または「共役基」とは、オリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に結合される原子または原子団を意味する。概して、共役基は、それらに取り付けられた化合物の2つ以上の特性、例えば限定するわけではないが、薬力学的特性、薬物動態学的特性、結合特性、吸収特性、細胞分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性、及び／またはクリアランス特性などを修飾する。

30

共役基に関連して「共役リンカー」または「リンカー」とは、任意の原子または原子団を含む共役基の一部であって、（1）オリゴヌクレオチドを共役基の別の部分と共有結合で連結するか、または（2）共役基の2つ以上の部分を共有結合で連結するものを意味する。

【0063】

共役基は、本明細書においてはラジカルとして示され、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴマー化合物への共有結合を形成するための結合を提供する。ある特定の実施形態では、オリゴマー化合物における結合点が、オリゴマー化合物の3'末端ヌクレオシドの3'-ヒドロキシル基の3'-酸素原子である。ある特定の実施形態では、オリゴマー化合物における結合点が、オリゴマー化合物の5'末端ヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基の5'-酸素原子である。ある特定の実施形態では、オリゴマー化合物への結合を形成するための結合は、切断可能な結合である。特定のそのような実施形態において、そのような切断可能な結合は、切断可能部分のすべてまたは一部を構成する。

40

【0064】

ある特定の実施形態では、共役基が、切断可能部分（例えば、切断可能な結合または切断可能なヌクレオシド）と、G a l N A cクラスター部分などの炭水化物クラスター部分

50

とを含む。そのような炭水化物クラスター部分は、標的部分と、場合によっては、共役リンカーとを含む。あるある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が、リガンドの数及びその実体によって特定される。例えば、あるある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が3個のGalNAc基を含み、「GalNAc₃」と表記される。あるある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が4個のGalNAc基を含み、「GalNAc₄」と表記される。具体的な炭水化物クラスター部分（具体的なテザー基、分岐基、及び共役リンカー基を有するもの）を、本明細書では、ローマ数字と、それに続く下付き文字「a」で説明し、表記する。したがって、「GalNAc_{3-1a}」とは、3個のGalNAc基、ならびに具体的に特定されたテザー基、分岐基、及び連結基を有する共役基の具体的な炭水化物クラスター部分を指す。そのような炭水化物クラスター断片は、切断可能な結合または切断可能なヌクレオシドなどの切断可能部分を介してオリゴマー化合物に取り付けられる。

10

【0065】

「共役化合物」とは、共役基としての使用に好適な任意の原子、原子団、または連結された原子団を意味する。あるある特定の実施形態では、共役化合物は、2つ以上の特性、例えば限定するわけではないが、薬力学的特性、薬物動態学的特性、結合特性、吸収特性、細胞分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性、及び／またはクリアランス特性などを有しうるか、または付与しうる。

【0066】

「連続する核酸塩基」とは、互いに直接隣り合っている核酸塩基を意味する。

20

【0067】

「設計」または「設計された」とは、選ばれた核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴマー化合物を作製するプロセスを指す。

【0068】

「希釈剤」は、薬理学的活性を欠いているが、医薬的に必要または望まれる組成物中の成分を意味する。例えば、注射される薬品中に、希釈剤は液体、例えば生理食塩水の溶液であってもよい。

【0069】

「用量」は、単回投与で、または指定された時間に提供される治療薬の特定の量を意味する。ある特定の実施形態では、用量は、1回、2回、またはそれ以上のボーラス、錠剤または注射で投与してもよい。例えば、皮下投与が所望されるある特定の実施形態では、単回の注射では容易に収まらない容量を必要とするため、所望の用量を達成するために2回以上注射してもよい。ある特定の実施形態では、治療薬は長期間または連続して注入することによって投与される。用量は1時間、1日、1週間、1カ月あたりの治療薬の量として示してもよい。

30

【0070】

「下流」とは、核酸の3'末端またはC末端に向かう相対的な方向を意味する。

【0071】

活性を調節するまたは病態を治療もしくは予防することに関して、「有効量」は、このような調節、治療もしくは予防を必要とする対象に、単回用量もしくはシリーズの部分として、効果の調節、または病態の治療もしくは予防もしくは改善に効果のある治療薬の量の投与を意味する。有効量は、処置される個体の健康状態及び身体状態、処置される個体の分類群、組成物の製剤、個体の医学的状态の評価、及び他の関連因子に依存して個体間で変動しうる。

40

【0072】

「効力」とは、所望の効果を生じさせる能力を意味する。

【0073】

「発現」には、遺伝子にコードされている情報を、細胞中に存在し細胞中で作動する構造物へと変換する機能のすべてが含まれる。そのような構造物として、転写産物及び翻訳産物が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0074】

「完全に相補的」または「100%相補的」とは、第1核酸の各核酸塩基が第2核酸中に相補的核酸塩基を有することを意味する。ある特定の実施形態では、第1核酸がアンチセンス化合物であり、標的核酸が第2核酸である。

【0075】

「ギャップマー」とは、キメラアンチセンス化合物であって、RNase H切断を支持する複数のヌクレオシドを有する内側領域が、2つ以上のヌクレオシドを有する外側領域の間に配置されており、内側領域を構成するヌクレオシドが、外側領域を構成する1または複数のヌクレオシドと化学的に異なっているものを意味する。当該内側領域を「ギャップ」と呼び、当該外側領域を「ウイング」と呼ぶことができる。

10

【0076】

「ハロ」及び「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素から選択される原子を意味する。

【0077】

「ヘテロアリアル」及び「ヘテロ芳香族」とは、単環式もしくは多環式芳香族環、環系、または縮合環系を含むラジカルであって、当該環のうちの少なくとも1つが芳香族であり、かつ2つ以上のヘテロ原子を含むものを意味する。ヘテロアリアルは、縮合環のうちの2つ以上がヘテロ原子を含有していない系を含む縮合環系も包含するものとする。ヘテロアリアル基は、典型的には、硫黄、窒素、または酸素から選択される1つの環原子を含む。ヘテロアリアル基の例として、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、チオフェニル、フラニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、キノキサリニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロアリアルラジカルは、親分子に直接取り付けるか、または脂肪族基もしくはヘテロ原子などの連結部分を介して取り付けることができる。本明細書にいうヘテロアリアル基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

20

【0078】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。ある特定の実施形態では、相補的核酸分子に、アンチセンス化合物と標的核酸が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、相補的核酸分子に、アンチセンスオリゴヌクレオチドと核酸標的が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0079】

「炎症性疾患を有する動物を識別すること」は、炎症性疾患と診断された動物、または炎症性疾患を発症しやすい動物を識別することを意味する。炎症性疾患を発症しやすい個体として、環境要因、個人的もしくは家族歴を有すること、または2つ以上の疾患に対する遺伝的素因を含む炎症性疾患を発現する2つ以上のリスク因子を有する個体が挙げられる。このような識別は、個体の病歴の評価、遺伝子検査等の標準的な臨床検査または評価を含む方法によって達成することができる。

【0080】

「PKK関連疾患を有する動物を識別すること」は、PKK関連疾患であると診断された動物、またはPKK関連疾患を発症しやすい動物を識別することを意味する。PKK関連疾患を発症しやすい個体として、2つ以上のPKK関連疾患の個人的もしくは家族歴を有すること、または遺伝的素因を含むPKK関連疾患を発症するリスク要因を2つ以上有する個体が挙げられる。そのような識別は、個体の病歴の評価、遺伝子検査等の標準的な臨床検査または評価を含む方法によって達成することができる。

40

【0081】

「血栓塞栓性疾患を有する動物を識別すること」は、血栓塞栓性疾患であると診断された動物、または血栓塞栓性疾患を発症しやすい動物を識別することを意味する。血栓塞栓性疾患を発症しやすい個体として、血栓塞栓性疾患を発症するリスク要因を2つ以上有する個体が挙げられ、例えば、血栓塞栓性疾患の家族歴、または2つ以上の遺伝的素因、不

50

動、手術（特に整形外科）、悪性腫瘍、妊娠、高齢、経口避妊薬の使用、心房細動、血栓塞栓症の病歴、慢性炎症性疾患、及び遺伝性または獲得性プロトロンビン凝固障害を有することを含む。そのような識別は、個体の病歴の評価、遺伝子検査等の標準的な臨床検査または評価を含む方法によって達成することができる。

【0082】

「直接隣り合っている」とは、直接隣り合っている要素の間に介在する要素が存在しないことを意味する。「個体」とは、処置または治療のために選ばれたヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

【0083】

「個体」とは、処置または治療のために選ばれたヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

10

【0084】

「PKKを阻害すること」はPKK mRNA及び／またはタンパク質のレベルまたは発現を低下させることを意味する。ある特定の実施形態では、PKK mRNA及び／またはタンパク質レベルは、PKKを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むPKKを標的とする化合物の存在下のほうが、アンチセンスオリゴヌクレオチド等のPKKアンチセンス化合物の非存在下におけるPKK mRNA及び／またはタンパク質レベルの発現より阻害される。

【0085】

「発現または活性を阻害する」とは、発現または活性の低減または遮断を指し、必ずしも発現または活性の完全な排除を示すわけではない。

20

【0086】

「ヌクレオシド間連結部」とは、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0087】

「ヌクレオシド間中性連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結する中性連結基を意味する。

【0088】

「ヌクレオシド間リン連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結するリン連結基を意味する。

【0089】

「連結部モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域における連結部修飾のパターンを意味する。そのようなオリゴヌクレオチドのヌクレオシドは修飾されていても無修飾でもよい。別段の表示がある場合を除き、連結部の説明しかない本明細書におけるモチーフは、連結部モチーフであるものとする。したがって、そのような事例では、ヌクレオシドは限定されない。

30

【0090】

「連結されたヌクレオシド」とは、ヌクレオシド間連結部によって一つに連結された隣り合うヌクレオシドを意味する。

【0091】

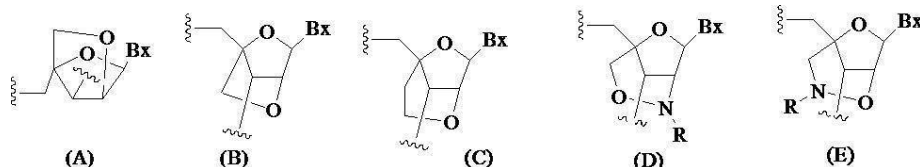
「ロクト核酸」または「LNA」または「LNAヌクレオシド」は、ヌクレオシド糖単位の4'位と2'位の間に2個の炭素原子を連結する架橋を有する核酸モノマーを意味し、それによって二環式糖を形成する。そのような二環式糖の例として、以下に限定されないが、以下に示す、A) α -L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') LNA、(B) β -D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') LNA、(C) エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2') LNA、(D) アミノオキシ(4'-CH₂-ON(R)-2') LNA及び(E) オキシアミノ(4'-CH₂-N(R)-O-2') LNAが挙げられる。

40

【0092】

50

【化1】



【0093】

本明細書で使用されるように、LNA化合物として、以下に限定されないが、糖の4'と2'位の間に少なくとも1つの架橋を有する化合物が挙げられ、ここで各架橋は独立して、
 $[C(R_1)(R_2)]_n-$ 、 $-C(R_1)=C(R_2)-$ 、 $-C(R_1)=N-$ 、 $-C(=NR_1)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_1)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 及び $N(R_1)-$ から選択される1または2～4の連結基を含み、ここで、
 x は0、1または2であり、 n は1、2、3、または4であり、各 R_1 と R_2 は独立して、
 H、保護基、ヒドロキシル、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 C_5-C_7 脂環式ラジカル、置換 C_5-C_7 置換式ラジカル、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、 CN 、スルホニル($S(=O)_2-J_1$)、またはスルホキシル($S(=O)-J_1$)であり、ここで、各 J_1 と J_2 は独立して、
 H、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、 C_1-C_{12} アミノアルキル、置換 C_1-C_{12} アミノアルキルまたは保護基である。

【0094】

LNAの定義に含まれる4'-2'架橋基の例として、以下に限定されないが、 $-[C(R_1)(R_2)]_n-$ 、 $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$ 、 $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ または $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$ が挙げられる。さらに、LNAの定義に含まれる他の架橋基は、4'- C_2H_2-2' 、4'- $(C_2H)_2-2'$ 、4'- $(CH_2)_3-2'$ 、4'- C_2H_2O-2' 、4'- $(C_2H)_2O-2'$ 、4'- $C_2H_2O-N(R_1)-2'$ 及び4'- $C_2H_2N(R_1)-O-2'$ 架橋であり、各 R_1 と R_2 は独立して、
 H、保護基、または C_1-C_{12} アルキルである。

【0095】

また、本発明に記載のLNAの定義に含まれるLNAでは、リボシル糖環の2'-ヒドロキシル基が、糖環の4'炭素原子に接続され、それによってメチレンオキシ(4'- C_2H_2O-2')架橋を形成し、二環式糖部分を形成する。当該架橋はまた、2'酸素原子と4'炭素原子を接続するメチレン(CH_2-)基であることができ、メチレンオキシ(4'- CH_2O-2')LNAという用語を使用する。さらに、この位置のエチレン架橋基を有する二環式糖部分の場合では、エチレンオキシ(4'- CH_2CH_2O-2')LNAという用語を使用する。 α -L-メチレンオキシ(4'- CH_2O-2')、メチレンオキシ(4'- CH_2O-2')LNAもまた、本明細書で使用するLNAの定義に含まれる。

【0096】

「ミスマッチ」または「非相補的核酸塩基」とは、第1核酸の核酸塩基が第2核酸または標的核酸の対応する核酸塩基と対合できない場合を指す。

【0097】

「修飾ヌクレオシド間連結部」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合(すなわちホスホジエステルヌクレオシド間結合)からの置換または何らかの改変を指す。

【0098】

「修飾核酸塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン(5-メチルウラシ

ルとしても知られる)、またはウラシル以外の任意の核酸塩基を意味する。「無修飾核酸塩基」とは、プリン塩基で(A)及びグアニン(G)、ならびにピリミジン塩基であるチミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を意味する。

【0099】

「修飾ヌクレオシド」とは、修飾糖部分及び／または修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオシドを意味する。

【0100】

「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間連結部、及び／または修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオチドを意味する。

【0101】

「修飾オリゴヌクレオチド」とは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部、修飾糖、及び／または修飾核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

【0102】

「修飾糖」とは、天然糖部分からの置換及び／または何らかの改変を意味する。

【0103】

「単環式または多環式の環系」という用語は、単環式または縮合されもしくは連結された多環式のラジカル環系から選択されるすべての環系を包含するものとし、脂肪族、脂環式、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、アリールアルキル、複素環式、ヘテロアリール、ヘテロ芳香族、及びヘテロアリールアルキルから個別に選択される単一の環系及び混成環系を包含するものとする。そのような単環式及び多環式の構造は、それぞれが同一のレベルの飽和を有する環を含有するか、またはそれぞれが独立して、完全飽和、部分飽和、もしくは完全不飽和を含むさまざまな飽和度を有する環を含有することができる。各環は、複素環式環が生じるように、そしてまた、例えば一方の環が炭素環原子のみを有しかつ縮合している環が2つの窒素原子を有するベンズイミダゾールなどの混合モチーフに存在しうるC環原子のみを含む環が生じるように、C、N、O、及びSから選択される環原子を含むことができる。単環式または多環式の環系は、例えば一方の環に2つの=O基が取り付けられているフタリイミドのように、さらに置換基で置換することができる。単環式または多環式の環系は、環原子を介した直接結合、複数の環原子を介した縮合、置換基を介した結合、または二機能性連結部分を介した結合などといったさまざまな戦略を用いて、親分子に取り付けることができる。

【0104】

「モノマー」は、オリゴマーの単一の単位を意味する。モノマーとして、限定されないが、天然に存在するか修飾された、ヌクレオシドが挙げられる。

【0105】

「モチーフ」とは、アンチセンス化合物における無修飾ヌクレオシドと修飾ヌクレオシドのパターンを意味する。

【0106】

「天然糖部分」とは、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)に見いだされる糖部分を意味する。

【0107】

「天然に存在するヌクレオシド間連結部」とは、3'→5'ホスホジエステル連結部を意味する。

【0108】

「中性連結基」とは、荷電していない連結基を意味する。中性連結基として、これに限定されないが、ホス、メチルホスホネート、MMI(-CH₂-N(CH₃)-O-)、アミド3(-CH₂-C(=O)-N(H)-)、アミド-4(-CH₂-N(H)-C(=O)-)、ホルムアセタール(-O-CH₂-O-)、及びチオホルム(-S-CH₂-O-)が挙げられる。さらに、中性連結基には、シロキサン(ジアルキルシロキサン)、カルボン酸エステル、カルボキサミド、硫化物、スルホン酸エステル、及びアミドを含む非イオン性連結部も含まれる(例えば「Carbohydrate Modific

10

20

30

40

50

ations in Antisense Research」Y. S. Sanghvi 及び P. D. Cook 編, ACS Symposium Series 580; Chapter 3 及び 4 (pp. 40-65) を参照されたい)。さらに、中性連結基には、混合 N、O、S、及び CH₂ 成分パーツを含む非イオン性連結部も含まれる。

【0109】

「非相補的核酸塩基」とは、互いに水素結合を形成せず、他のいかなる形でもハイブリダイゼーションを支持することのない、一対の核酸塩基を指す。

【0110】

「非ヌクレオシド間中性連結基とは、2つのヌクレオシドを直接連結しない中性連結基を意味する。ある特定の実施形態では、非ヌクレオシド間中性連結基が、ヌクレオシドをヌクレオシド以外の基に連結する。ある特定の実施形態では、非ヌクレオシド間中性連結基は、どちらもヌクレオシドではない2つの基を連結する。

10

【0111】

「非ヌクレオシド間リン連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結しないリン連結基を意味する。ある特定の実施形態では、非ヌクレオシド間リン連結基がヌクレオシドをヌクレオシド以外の基に連結する。ある特定の実施形態では、非ヌクレオシド間リン連結基が、どちらもヌクレオシドではない2つの基を連結する。

【0112】

「核酸」とは、モノマー型ヌクレオチドで構成された分子を指す。核酸には、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、一本鎖核酸、及び二本鎖核酸、低分子干渉リボ核酸 RNA (siRNA)、及びマイクロ RNA (miRNA) があるが、これらに限定されない。

20

【0113】

「核酸塩基」とは、もう一つの核酸の塩基と対合することができる複素環式部分を意味する。

【0114】

「核酸塩基相補性」とは、もう一つの核酸塩基と塩基対合することができる核酸塩基を指す。例えば DNA では、アデニン (A) がチミン (T) と相補的である。例えば RNA では、アデニン (A) がウラシル (U) と相補的である。ある特定の実施形態では、相補的核酸塩基とは、アンチセンス化合物の核酸塩基であって、その標的核酸の核酸塩基と塩基対合することができるものを指す。例えば、あるアンチセンス化合物のある特定の位置にある核酸塩基が標的核酸のある特定の位置にある核酸塩基と水素結合することができるなら、当該オリゴヌクレオチドと当該標的核酸の間の水素結合の位置は、それら核酸塩基対において相補的であるとみなされる。

30

【0115】

「核酸塩基修飾モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドに沿った核酸塩基への修飾のパターンを意味する。別段の表示がある場合を除き、核酸塩基修飾モチーフは、核酸塩基配列に依存しない。

【0116】

「核酸塩基配列」とは、連続する核酸塩基の順序を意味し、糖、連結部、及び／または核酸塩基修飾には依存しない。

40

【0117】

「ヌクレオシド」とは、糖に連結された核酸塩基を意味する。

【0118】

「ヌクレオシド模倣物」には、例えばモルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、ビスシクロまたはトリシクロ糖模倣物、例えば非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣物などといった、オリゴマー化合物の2つ以上の位置において糖または糖及び塩基を置き換えるため（連結部は必ずしも置き換えられない）に使用される構造が含まれる。ヌクレオチド模倣物には、例えばペプチド核酸またはモルホリノ (—N(H)—C(=O)—O— または他の非ホスホジエステル連結部によって連結された

50

モルホリノ) などといった、オリゴマー化合物の2つ以上の位置においてヌクレオシド及び連結部を置き換えるために使用される構造が含まれる。糖代用物は、わずかに広い意味を持つ用語であるヌクレオシド模倣物と一部重複するが、糖単位(フラノース環)のみの置き換えを示すものとする。ここに提供するテトラヒドロピラニル環は、フラノース糖基がテトラヒドロピラニル環系で置き換えられた糖代用物の一例を例示するものである。「模倣物」とは、糖、核酸塩基、及び／またはヌクレオシド間連結部の代わりに使用される基を指す。一般的には、模倣物は、糖または糖-ヌクレオシド間連結部の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選ばれたターゲットへのハイブリダイゼーションのために維持される。

【0119】

「ヌクレオシドモチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域におけるヌクレオシド修飾のパターンを意味する。そのようなオリゴヌクレオチドの連結部は修飾されていても無修飾であってもよい。別段の表示がある場合を除き、ヌクレオシドの説明しかない本明細書におけるモチーフは、ヌクレオシドモチーフであるものとする。したがって、そのような事例では、連結部は限定されない。

【0120】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合で連結されているヌクレオシドを意味する。

【0121】

「オフターゲット効果」とは、意図された標的核酸以外の遺伝子のRNAまたはタンパク質発現の調節に関連する望ましくないまたは有害な生物学的効果を指す。

【0122】

「オリゴマー化合物」または「オリゴマー」とは、連結されたモノマー型サブユニットのポリマーであって、核酸分子の少なくとも一領域にハイブリダイズすることができるものを意味する。

【0123】

「オリゴヌクレオチド」とは、連結されたヌクレオシドのポリマーを意味し、ヌクレオシドのそれぞれは互いに依存することなく修飾されていても無修飾でもよい。

【0124】

「非経口投与」とは、注射(例えばボーラス注射)または注入による投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または頭蓋内投与、例えば髄腔内投与もしくは脳室内投与が含まれる。

【0125】

「ペプチド」は、アミド結合によって少なくとも2つのアミノ酸を連結することによって形成される分子を意味する。以下に限定されないが、本明細書で使用されるペプチドは、ポリペプチド及びタンパク質を指す。

【0126】

「医薬品」とは、個体に投与したときに治療効果をもたらす物質を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、PKKを標的にしたアンチセンスオリゴヌクレオチドは医薬品である。

【0127】

「医薬組成物」とは、対象への投与に適した物質の混合物を意味する。例えば医薬組成物はアンチセンスオリゴヌクレオチドと滅菌水溶液とを含みうる。

【0128】

「医薬上許容される誘導体」は、医薬上許容される塩、共役体、プロドラッグまたは本明細書に記載の化合物の異性体を包含する。

【0129】

「医薬上許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的かつ医薬的に許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの望ましい生物学的活性を保持しており、しかも望ましくない毒性効果をそこに付与しない塩を意味する。

10

20

30

40

50

【0130】

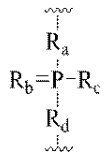
「ホスホロチオエート連結部」とは、ホスホジエステル結合が非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置き換えることによって修飾されているヌクレオシド間の連結部を意味する。ホスホロチオエート連結部は修飾ヌクレオシド間連結部である。

【0131】

「リン連結基」とは、リン原子を含む連結基を意味する。リン連結基には、以下の式を有する基が含まれるが、これに限定されない：

【0132】

【化2】



10

ここで、

R_a 及び R_d はそれぞれ独立して、O、S、 CH_2 、NH、または NJ_1 であり、 J_1 は $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキルまたは置換 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキルであり、

R_b はOまたはSであり、

R_c は、OH、SH、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、置換 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルコキシ、置換 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルコキシ、アミノまたは置換アミノであり、

20

J_1 は、 R_b は、OまたはSである。

【0133】

リン連結基には、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、ホスホロチオアミデート、チオノアルキルホスホネート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、及びボラノホスフェートが含まれるが、これらに限定されない。

【0134】

「PKK」は、ヒト血漿プレカリクレインを含む哺乳類の血漿プレカリクレインを意味する。血漿プレカリクレイン (PKK) は、血漿カリクレイン (PK) の前駆体であり、KLKB1遺伝子によってコードされている。

30

【0135】

「PKK関連疾患」とは、任意のPKK核酸またはその発現産物に関連する任意の疾患を意味する。このような疾患は、炎症性疾患または血栓塞栓性疾患を含んでもよい。このような疾患は、遺伝性血管浮腫 (HAE) を含んでもよい。

【0136】

「PKK mRNA」は、PKKをコードするDNA配列の任意のメッセンジャーRNAの発現産物を意味する。

【0137】

「PKK核酸」は、PKKをコードする任意の核酸を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、PKK核酸は、PKKをコードするDNA配列、PKKをコードするDNAから転写されるRNA配列 (イントロン及びエクソンを含むゲノムDNAを含む)、及びPKKをコードするmRNA配列を含む。「PKK mRNA」はPKKタンパク質をコードするmRNAを意味する。

40

【0138】

「PKKタンパク質」は、PKK核酸のポリペプチド発現産物を意味する。

【0139】

「一部分 (portion)」とは、核酸の、所定の数の連続する (すなわち連結された) 核酸塩基を意味する。ある特定の実施形態では、一部分が、標的核酸の、所定の数の連続する核酸塩基である。ある特定の実施形態では、一部分が、アンチセンス化合物の、所定の数の連続する核酸塩基である。

50

【0140】

「予防」または「予防すること」とは、数分から数日、数週間、数か月の期間にわたって、または無期限に疾患、障害、または状態の発症、発生を遅延させまたは未然に防ぐことを指す。

【0141】

「プロドラッグ」は、内因性酵素または他の化学物質及び／または条件の作用によって、体内または細胞内で活性形態（すなわち、薬剤）に変換される、不活性な形態で調製される治療薬を意味する。

【0142】

「予防有効量」とは、動物に予防的利益または防止的利益を与える医薬剤の量を指す。

【0143】

「保護基」とは、当業者に知られている任意の化合物または保護基を意味する。保護基の非限定的な例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる「Protective Groups in Organic Chemistry」T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, ニューヨークに見いだすことができる。

【0144】

「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と定義される。

【0145】

「リボヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖部分の2'位にヒドロキシを有するヌクレオチドを意味する。リボヌクレオチドはさまざまな置換基のいずれでも修飾することができる。

【0146】

「RISCベースのアンチセンス化合物」とは、当該アンチセンス化合物のアンチセンス活性の少なくとも一部がRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）に起因するアンチセンス化合物を意味する。

【0147】

「RNase Hベースのアンチセンス化合物」とは、当該アンチセンス化合物のアンチセンス活性の少なくとも一部が、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションと、それに続くRNase Hによる標的核酸の切断に起因する、アンチセンス化合物を意味する。

【0148】

「塩」は、アンチセンス化合物の生理学的及び医薬上許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの望ましい生物活性を保持し、望ましくない毒性効果を付与しない塩を意味する。

【0149】

「セグメント」は、標的核酸内の領域の、さらに小さな一部分または下位部分と定義される。

【0150】

「別個の領域」とは、オリゴヌクレオチドの複数の部分であって、任意の隣接する部分の化学修飾または化学修飾のモチーフが、当該別個の領域を互いに区別することを可能にする少なくとも1つの相違点を含むものを意味する。

【0151】

「配列モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一部分に沿って配置された核酸塩基のパターンを意味する。別段の表示がある場合を除き、配列モチーフは化学修飾には依存しないので、化学修飾なしを含めて、化学修飾の任意の組み合わせを有しうる。

【0152】

「副作用」とは、処置に起因する所望の効果以外の生理学的反応を意味する。ある特定の実施形態では、副作用に、以下に限定されないが、注射部位反応、肝機能検査異常、腎

10

20

30

40

50

機能検査異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、及びミオパシーが含まれる。

【0153】

「一本鎖オリゴヌクレオチド」は、相補鎖にハイブリダイズされていないオリゴヌクレオチドを意味する。

【0154】

本明細書にいう「部位」は、標的核酸内のユニークな核酸塩基位置と定義される。

【0155】

「特異的にハイブリダイズ可能」または「特異的にハイブリタイズする」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間に、特異的結合が望まれる条件下で、すなわちインビボアッセイや治療的処置の場合は生理的条件下で、所望の効果を誘導すると共に非標的核酸には最小限の効果しか呈さないかまたは効果を全く呈さないような、十分な相補度を有するアンチセンス化合物を指す。

【0156】

「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」とは、オリゴマー化合物がそのターゲット配列にはハイブリダイズするが、他の配列にはごくわずかな数の配列にしかハイブリダイズしないような条件を指す。

【0157】

「対象」とは、処置または治療のために選択されたヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

【0158】

「置換基 (substituent)」及び「置換基 (substituent group)」とは、指名された親化合物の原子または基を置換する原子または基を意味する。例えば、修飾ヌクレオシドの置換基は、天然に存在するヌクレオシドに見られる原子または基とは異なる任意の原子または基である (例えば修飾 2'-置換基はヌクレオシドの 2' 位にある H または OH 以外の任意の原子または基である)。置換基は、保護されていても保護されていなくてもよい。ある特定の実施形態では、本開示の化合物は、親化合物の 1 つの位置または 2 つ以上の位置に置換基を有する。置換基は、他の置換基でさらに置換されていてもよく、親化合物に直接取り付けるか、またはアルキル基もしくはヒドロカルビル基などの連結基を介して取り付けることができる。

【0159】

同様に、本明細書において使用する場合、化学官能基に関して「置換基」とは、指名された官能基に通常存在する原子または原子団とは異なる原子または原子団を意味する。ある特定の実施形態では、置換基が官能基の水素原子を置き換える (例えばある特定の実施形態では、置換メチル基の置換基は、無置換メチル基の水素原子のうちの 1 つを置き換える水素以外の原子または基である)。別段の表示がある場合を除き、置換基としての使用に適する基には、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル ($-C(O)R_{aa}$)、カルボキシル ($-C(O)O-R_{aa}$)、脂肪族基、脂環式基、アルコキシ、置換オキシ ($-O-R_{aa}$)、アリール、アラルキル、複素環式ラジカル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ ($-N(R_{bb})(R_{cc})$)、イミノ ($=NR_{bb}$)、アミド ($-C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ または $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$)、アジド ($-N_3$)、ニトロ ($-NO_2$)、シアノ ($-CN$)、カルバミド ($-OC(O)N(R_{bb})(R_{cc})$ または $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$)、ウレイド ($-N(R_{bb})C(O)N(R_{bb})(R_{cc})$)、チオウレイド ($-N(R_{bb})C(S)N(R_{bb})-(R_{cc})$)、グアニジニル ($-N(R_{bb})C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$)、アミジニル ($-C(=NR_{bb})N(R_{bb})(R_{cc})$ または $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})(R_{aa})$)、チオール ($-SR_{bb}$)、スルフィニル ($-S(O)R_{bb}$)、スルホニル ($-S(O)_2R_{bb}$)、及びスルホンアミジル ($-S(O)_2N(R_{bb})(R_{cc})$ または $-N(R_{bb})S-(O)_2R_{bb}$) が含まれるが、これらに限定されない。式中、各 R_{aa} 、 R_{bb} 、及び R_{cc} は、独立して、H、場合によっては連結された化学官能基、またはさらなる置換基であり、好ましい

10

20

30

40

50

ものとしては、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式、複素環式、及びヘテロアリールアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載する化合物内の選ばれた置換基は、再帰的に (to a recursive degree) 存在する。

【0160】

「置換糖部分」とは、天然に存在する糖部分ではないフラノシルを意味する。置換糖部分には、2'位、3'位、5'位及び／または4'位に置換基を含むフラノシルなどがあるが、これらに限定されない。ある特定の置換糖部分は二環式糖部分である。

【0161】

「糖部分」とは、ヌクレオシドの天然に存在する糖部分または修飾糖部分を意味する。

10

【0162】

「糖モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域における糖修飾のパターンを意味する。

【0163】

「糖代用物」とは、フラノシルを含まない構造であって、しかも、結果として生じるヌクレオチドサブユニットを一つに連結しかつ／または他のヌクレオチドに連結することで相補的なオリゴマー化合物にハイブリダイズすることができるオリゴマー化合物を形成することができるように、ヌクレオチドの天然に存在する糖部分を置き換えることができる構造を意味する。そのような構造には、フラノシルとは異なる数の原子を含むか（例えば4、6、または7員環）、または非酸素原子（例えば炭素、硫黄、もしくは窒素）によるフラノシルの酸素の置き換え、または原子数の変化と酸素の置き換えとの両方が含まれる。そのような構造は、置換糖部分（例えば場合によってはさらなる置換基を含む6員炭素環式二環式糖代用物）について記載したものに対応する置換も含みうる。糖代用物は、さらに複雑な糖の代替物（例えばペプチド核酸の非環系）も包含する。糖代用物には、モルホリノ、シクロヘキセニル及びシクロヘキシトールなどがあるが、これらに限定されない。

20

【0164】

「標的」とは、調節することが望まれるタンパク質を指す。

【0165】

「標的遺伝子」とは、標的をコードする遺伝子を指す。

【0166】

「ターゲティング」または「標的化される」とは、標的核酸に特異的にハイブリダイズして所望の効果を誘導することになるアンチセンス化合物を設計及び選択するプロセスを意味する。

30

【0167】

「標的核酸」、「標的RNA」、「標的RNA転写産物」及び「核酸標的」は、いずれも、アンチセンス化合物の標的となりうる核酸を意味する。

【0168】

「標的領域」とは、標的核酸のうち、2つ以上のアンチセンス化合物の標的となる部分を意味する。

【0169】

「標的セグメント」とは、標的核酸のうち、アンチセンス化合物が標的とするヌクレオチドの配列を意味する。「5'標的部位」とは、標的セグメントの最も5'側のヌクレオチドを指す。「3'標的部位」とは、標的セグメントの最も3'側のヌクレオチドを指す。

40

【0170】

「末端基」とは、オリゴヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端のいずれか、またはそれらの両方に取り付けられた2つ以上の原子を意味する。ある特定の実施形態では、末端基が共役基である。ある特定の実施形態では、末端基が2つ以上の末端基ヌクレオチドを含む。

【0171】

「末端ヌクレオチド間連結部」とは、オリゴヌクレオチドまたはその所定の領域の少なく

50

とも2つのヌクレオシド間の連結部を意味する。

【0172】

「治療有効量」とは、個体に治療的利益を与える医薬剤の量を意味する。

【0173】

「治療する」または「治療すること」または「治療」は、疾患または病態の改善をもたらすために組成物を投与することを指す。

【0174】

ヌクレオシドに関する「修飾のタイプ」またはある「タイプ」のヌクレオシドは、ヌクレオシドの化学修飾を意味し、修飾及び非修飾ヌクレオシドを含む。したがって、別段の表示がある場合を除き、「第一タイプの修飾を有するヌクレオシド」は、非修飾のヌクレオシドでもよい。

10

【0175】

「無修飾」核酸塩基とは、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。

【0176】

「無修飾ヌクレオチド」とは、天然に存在する核酸塩基、糖部分及びヌクレオシド間連結部で構成されるヌクレオシドを意味する。ある特定の実施形態では、無修飾ヌクレオチドがRNAヌクレオチド（すなわちβ-D-リボヌクレオシド）またはDNAヌクレオチド（すなわちβ-D-デオキシリボヌクレオシド）である。

【0177】

20

「上流」は、核酸の5'末端またはN末端に向かう相対的な方向を意味する。

【0178】

「ウイングセグメント」とは、強化された阻害活性、標的核酸への結合親和性の増加、または*in vivo*のヌクレアーゼによる分解への抵抗等のオリゴヌクレオチドの特性を付加するために修飾された複数のヌクレオシドを意味する。

【0179】

ある特定の実施形態

ある特定の実施形態は、血漿プレカリクレイン（PKK）mRNA及びタンパク質の発現を阻害するための化合物、組成物、及び方法を提供する。ある特定の実施形態は、PKK mRNA及びタンパク質レベルを減少させるための化合物、組成物、及び方法を提供する。

30

【0180】

ある特定の実施形態は、血漿プレカリクレイン（PKK）の核酸を標的とするアンチセンス化合物を提供する。ある特定の実施形態では、PKK核酸は、GENBANK寄託番号：NM_000892.3（配列番号1として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号：DC412984.1（配列番号2として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号：CN265612.1（配列番号3として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号AK297672.1（配列番号4として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号DC413312.1（配列番号5として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号AV688858.2（配列番号6として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号：CD652077.1（配列番号7として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号BC143911.1（配列番号8として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号CB162532.1（配列番号9として本明細書に組み込まれる）、核酸塩基111693001から111730000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号：NT_016354.19、（配列番号10として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号NM_008455.2（配列番号11として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号BB598673.1（配列番号12として本明細書に組み込まれる）、核酸塩基6114001から6144000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_039460.7（配列番号13として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号：NM

40

50

__012725.2 (配列番号14として本明細書に組み込まれる)、核酸塩基10952001から110982000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NW__047473.1 (配列番号15として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号XM__002804276.1 (配列番号17として本明細書に組み込まれる)、及び核酸塩基2358000から2391000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NW__001118167.1 (配列番号18として本明細書に組み込まれる)である。

【0181】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは、12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号30～2226の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

10

【0182】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号570の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

20

【0183】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号705の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

【0184】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号1666の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

30

【0185】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは20個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号570の核酸塩基配列を有する。

【0186】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは20個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号705の核酸塩基配列を有する。

40

【0187】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは16個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号1666の核酸塩基配列を有する。

【0188】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくと

50

も16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号62、72、103、213、312、334-339、344、345、346、348、349、351、369、373、381、382、383、385、387-391、399、411、412、414、416、444、446-449、452、453、454、459、460、462-472、473、476、477、479、480、481、484、489-495、497、500、504、506、522、526、535、558、559、560、564、566、568-571、573、576、577、578、587、595、597-604、607、608、610、613、615、618、619、622、623、624、633、635、636、638、639、640、642、643、645、652、655-658、660、661、670、674、679、684、685、698、704、705、707、708、713、716、717、728、734、736、767、768、776、797、798、800、802、810、815、876、880、882、883、886、891、901、905、908-911、922、923、924、931、942、950-957、972、974、978、979、980、987-991、1005、1017-1021、1025、1026、1029、1030、1032、1034、1035、1037、1040、1041、1045、1046、1051、1054、1059、1060、1061、1064、1065、1066、1075、1076、1087、1089、1111、1114、1116、1117、1125、1133、1153、1169、1177、1181、1182、1187、1196、1200、1214、1222、1267、1276、1277、1285、1286、1289、1290、1291、1303、1367、1389、1393、1398-1401、1406、1407、1408、1411、1419-1422、1426、1430、1431、1432、1434-1437、1439、1440、1443、1444、1451、1452、1471、1516、1527、1535、1537、1538、1539、1540、1541、1563、1564、1567、1568、1616、1617、1623、1629、1664、1665、1666、1679、1687、1734、1804、1876、1886、1915、2008、2018、2100、2101、2115、及び2116。ある実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドはPKKの少なくとも80%のmRNAの阻害を達成する。

【0189】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12~30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号62、72、103、213、334-339、344、346、348、349、351、381、382、383、385、389、390、391、446、448、452、453、454、466-473、476、481、484、491、492、494、495、497、504、526、558、559、566、568-571、576、578、587、595、597、598、600-604、607、610、613、618、619、624、635、638、639、645、652、656、657、658、660、674、675、676、684、698、704、705、707、713、716、768、876、880、901-905、908-911、922、923、924、931、942、951、954-957、972、974、978、979、987、988、990、1005、1019、1020、1021、1025、1032、1037、1040、1041、1045、1054、1059、1060、1061、1064、1065、1066、1075、1111、1116、1117、1125、1133、1153、1169、1177、1200、1222、1267、1285、1290、1291、1303、1367、1398、1399、1401、1406、1

408、1411、1419、1420、1421、1426、1430、1431、1432、1434-1437、1440、1443、1444、1451、1537-1540、1563、1616、1679、1687、1804、2008、2101、2115、及び2116。ある実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドはPKKの少なくとも85%のmRNAの阻害を達成する。

【0190】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12~30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、346、351、382、390、391、446、448、452、453、468、469、470、471、472、476、481、491、495、504、558、566、568、570、571、578、587、597、598、600、604、613、635、638、645、656、658、660、674、675、684、704、705、880、901-905、909、922、931、951、954、956、990、1005、1020、1032、1037、1040、1041、1045、1054、1075、1111、1125、1133、1153、1200、1267、1291、1303、1398、1399、1401、1406、1420、1426、1430、1431、1434、1435、1436、1440、1443、1451、1537-1540、2115、及び2116。ある実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドはPKKの少なくとも90%のmRNAの阻害を達成する。

【0191】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12~30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、391、448、468、469、568、570、598、635、658、674、684、705、901、903、904、922、990、1267、1291、1420、1430、1431、1434、1435、1436、1537、1538、及び1540。ある実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドはPKKの少なくとも95%のmRNAの阻害を達成する。

【0192】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12~30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、338、346、349、382、383、390、448、452、453、454、495、526、559、570、587、598、635、660、705、901、903、904、908、923、931、955、974、988、990、1020、1039、1040、1111、1117、1267、1291、1349、1352、1367、1389、1393、1399、1401、1408、1411、1426、1499、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1624、1643、1661、1665、1666、1673、1679、1695、1720、1804、1817、1876、1881、1886、1940、1947、2008、2018、2019、2031、2044、2100、2101、2115、及び2116。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、0.4以下のIC₅₀ (μM)を達成する。

【0193】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、346、349、382、453、454、495、526、570、587、598、635、660、901、903、904、931、955、990、1020、1111、1267、1349、1352、1367、1389、1399、1408、1411、1426、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1643、1661、1665、1666、1673、1695、1804、1876、1881、2019、2044、2100、2101、2115、及び2116。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、0.3以下のIC₅₀ (μM)を達成する。

10

【0194】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、346、382、453、495、526、570、587、598、635、901、904、931、955、1020、1111、1349、1352、1389、1426、1516、1535、1544、1548、1564、1569、1598、1616、1617、1665、1666、1804、1876、1881、2019、2044、2101、及び2116。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、0.2以下のIC₅₀ (μM)を達成する。

20

【0195】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、以下の配列番号の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。配列番号334、495、587、598、635、1349、1352、1389、1516、1544、1548、1569、1598、1617、1665、1666、1804、1881、及び2019。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、0.2以下のIC₅₀ (μM)を達成する。

30

【0196】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基27427～27466の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

40

【0197】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基33183～33242の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

50

【0198】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基30570～30610の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

【0199】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基27427～27520の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

10

【0200】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基33085～33247の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

20

【0201】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基30475～30639の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

【0202】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基27362～27524の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

30

【0203】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基33101～33240の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

40

【0204】

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基30463～30638の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

【0205】

50

ある特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含む化合物を提供し、当該修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、P K K 核酸のエクソン9、エクソン12、またはエクソン14の等しい長さの部分と相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む。

【0206】

ある特定の実施形態は、当該修飾オリゴヌクレオチドの当該核酸塩基配列は、配列番号10と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。

【0207】

ある特定の実施形態では、化合物は、一本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる。

【0208】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である。

【0209】

ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0210】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、または7個のホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む。

【0211】

ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合及びホスホロチオエートヌクレオシド間結合から選択される。

【0212】

ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

【0213】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含む。

【0214】

ある特定の実施形態では、当該修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

【0215】

ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾糖を含む。

【0216】

ある特定の実施形態では、当該修飾糖は、2'修飾糖、BNA、またはTHPである。

【0217】

ある特定の実施形態では、当該修飾糖は、2'-O-メトキシエチル、2'-O-メチル、拘束エチル、LNA、または3'-フルオロHNAのいずれかである。

【0218】

ある特定の実施形態では、化合物は、少なくとも1つの2'-O-メトキシエチルヌクレオシド、2'-O-メチルヌクレオシド、拘束エチルヌクレオシド、LNAヌクレオシド、または3'-フルオロHNAヌクレオシドを含む。

【0219】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドは以下を含み、

10

20

30

40

50

10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
 5個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、
 5個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント、
 ここで、当該ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントの
 間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾糖を含む。

【0220】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドは20個の連結されたヌクレオ
 シドからなる。

【0221】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドは19個の連結されたヌクレオ
 シドからなる。

10

【0222】

ある特定の実施形態では、当該修飾オリゴヌクレオチドは18個の連結されたヌクレオ
 シドからなる。

【0223】

ある特定の実施形態は、共役基及び以下の式：T e s G e s m C e s A e s A e
 s G d s T d s m C d s T d s m C d s T d s T d s G d s G d s
 m C d s A e s A e s A e s m C e s A e に従う修飾オリゴヌクレオチドから
 成る化合物を提供し、ここで、

A = アデニン、

20

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0224】

ある特定の実施形態は、共役基及び以下の式：m C e s m C e s m C e s m C e
 s m C e s T d s T d s m C d s T d s T d s T d s A d s T d s

A d s G d s m C e s m C e s A e s G e s m C e に従う修飾オリゴヌクレオ
 チドからなる化合物を提供し、ここで

30

A = アデニン、

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0225】

ある特定の実施形態は、共役基及び以下の式：m C e s G e s A k s T d s A d
 s T d s m C d s A d s T d s G d s A d s T d s T d s m C k s

40

m C k s m C e に従う修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物を提供し、ここで、

A = アデニン、

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

k = c E t 修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

50

【0226】

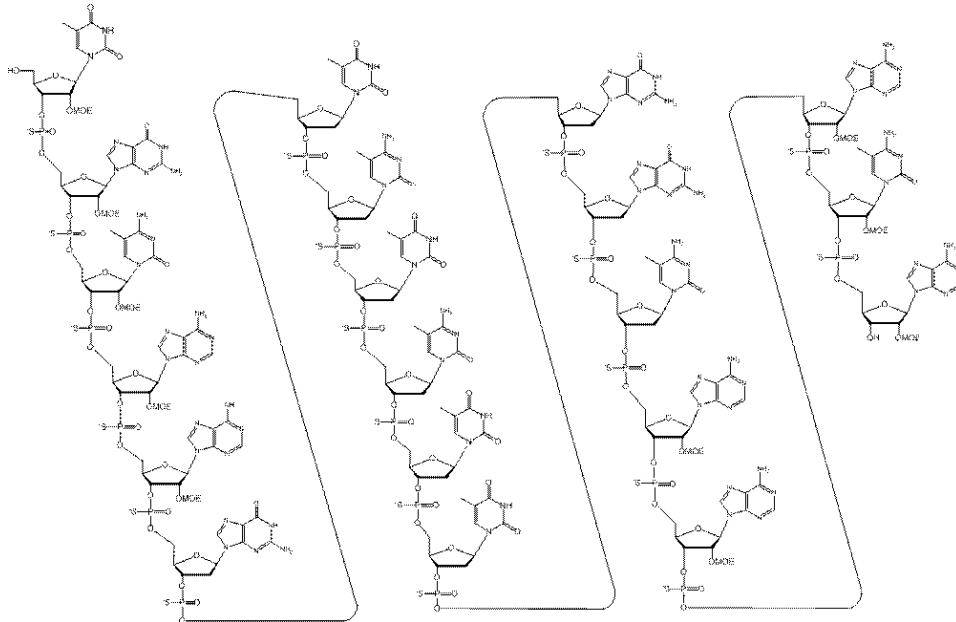
ある特定の実施形態では、共役体基は、修飾オリゴヌクレオチドの5'末端の修飾オリゴヌクレオチドに連結されている。ある特定の実施形態では、共役体基は、修飾オリゴヌクレオチドの3'末端の修飾オリゴヌクレオチドに連結されている。ある特定の実施形態では、当該共役基は、少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 少なくとも2つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、または少なくとも3つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を含む。

【0227】

ある特定の実施形態は、以下の式の化合物を提供する。

【0228】

【化3】

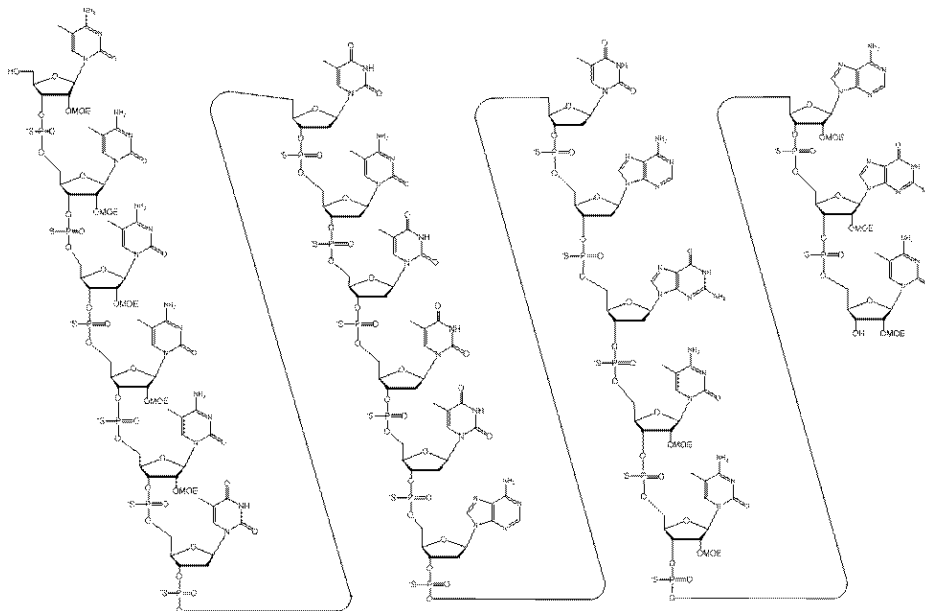


【0229】

ある特定の実施形態は、以下の式の化合物を提供する。

【0230】

【化4】

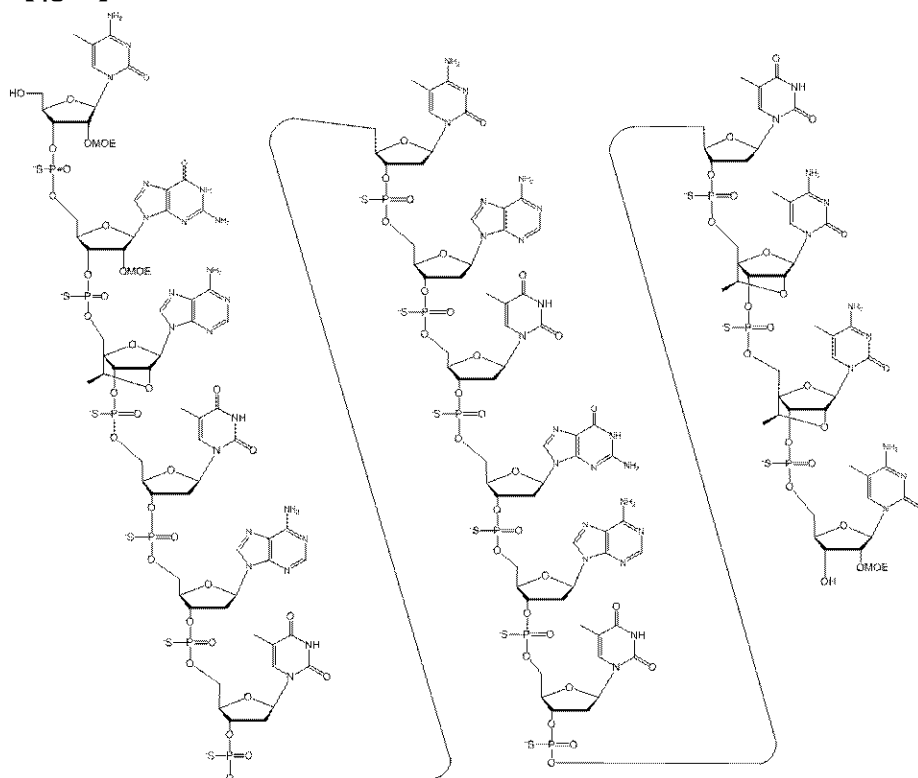


【0231】

ある特定の実施形態は、以下の式の化合物を提供する。

【0232】

【化5】



10

20

【0233】

ある特定の実施形態では、化合物は、本明細書に記載の任意の修飾オリゴヌクレオチドと共役基を含むまたはそれらからなることができる。ある特定の実施形態では、化合物は、12～30個の連結されたヌクレオシド及び共役基からなる修飾オリゴヌクレオチドを含むまたはそれらからなることができ、配列番号30～2226の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基配列、及び共役基を有する。

30

【0234】

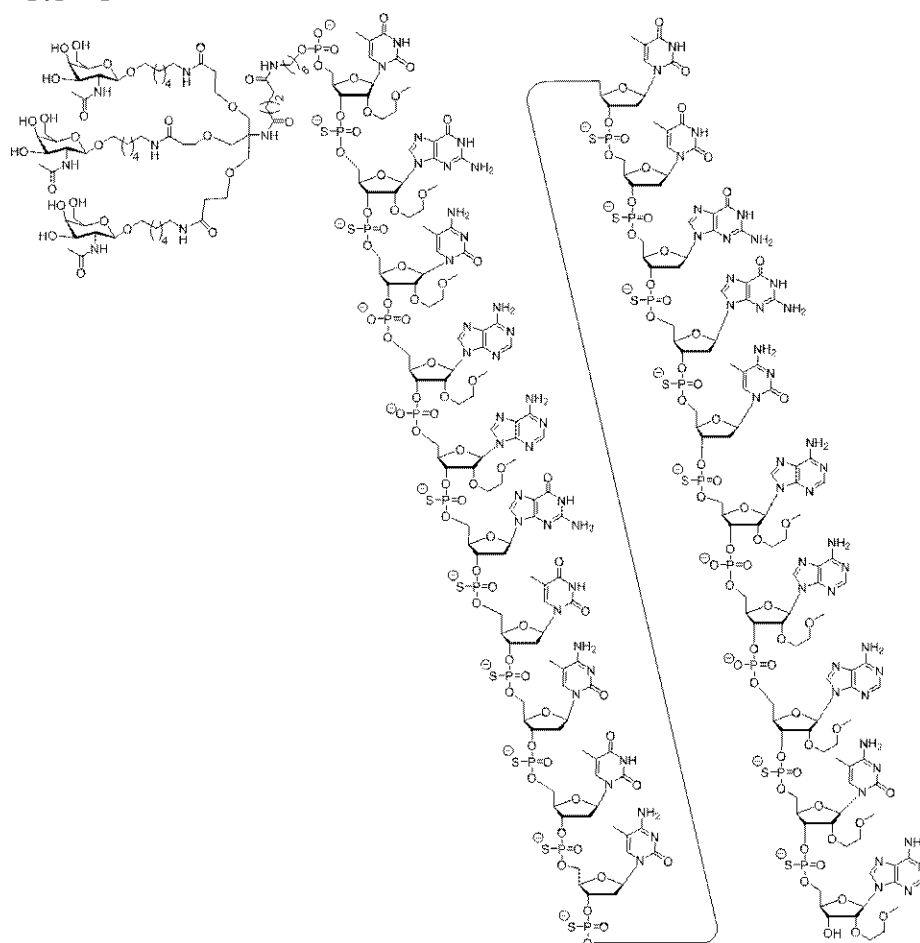
ある特定の実施形態では、以下の化学構造を有する化合物は、5'-Xを有するISIS721744を含むまたはそれから成り、ここでXは本明細書に記載のGalNAcを含む共役基である。

【0235】

40

50

【化 6】



10

20

【 0 2 3 6 】

ある特定の実施形態では、以下の化学構造を有する化合物は5' - Xを有するI S I S 5 4 6 2 5 4を含むまたはそれから成り、ここでXは本明細書に記載のG a l N A cを含む共役基である。

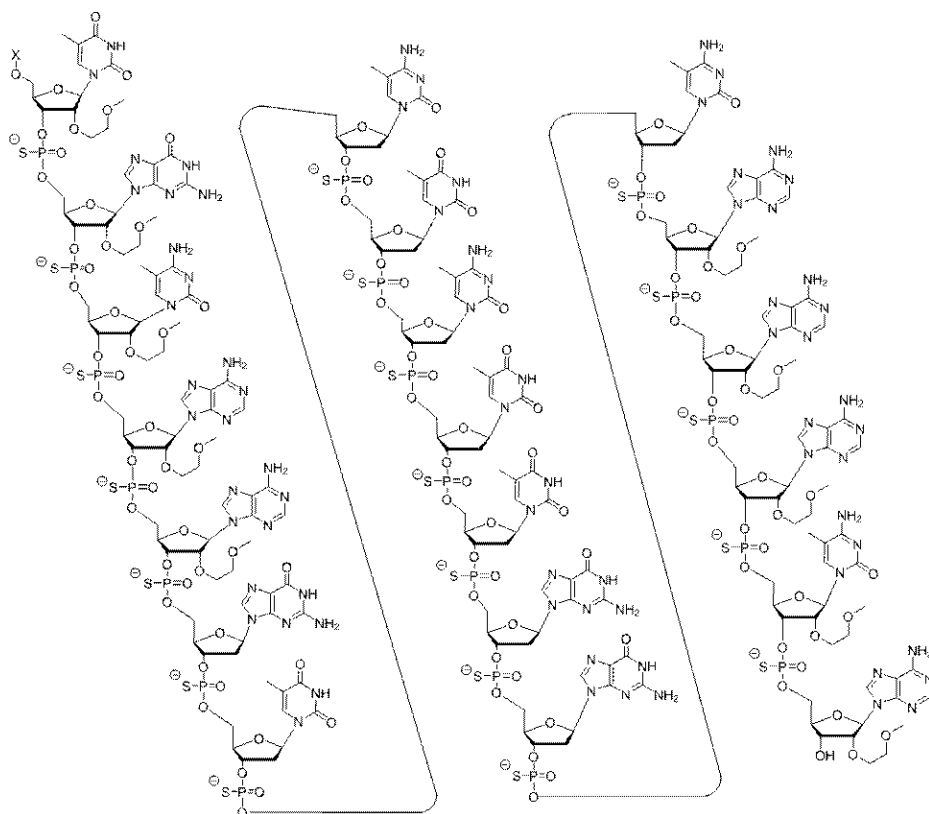
30

【 0 2 3 7 】

40

50

【化 7】



10

20

【 0 2 3 8 】

ある特定の実施形態は、以下の式を含む、またはそれからなる化合物を提供する。

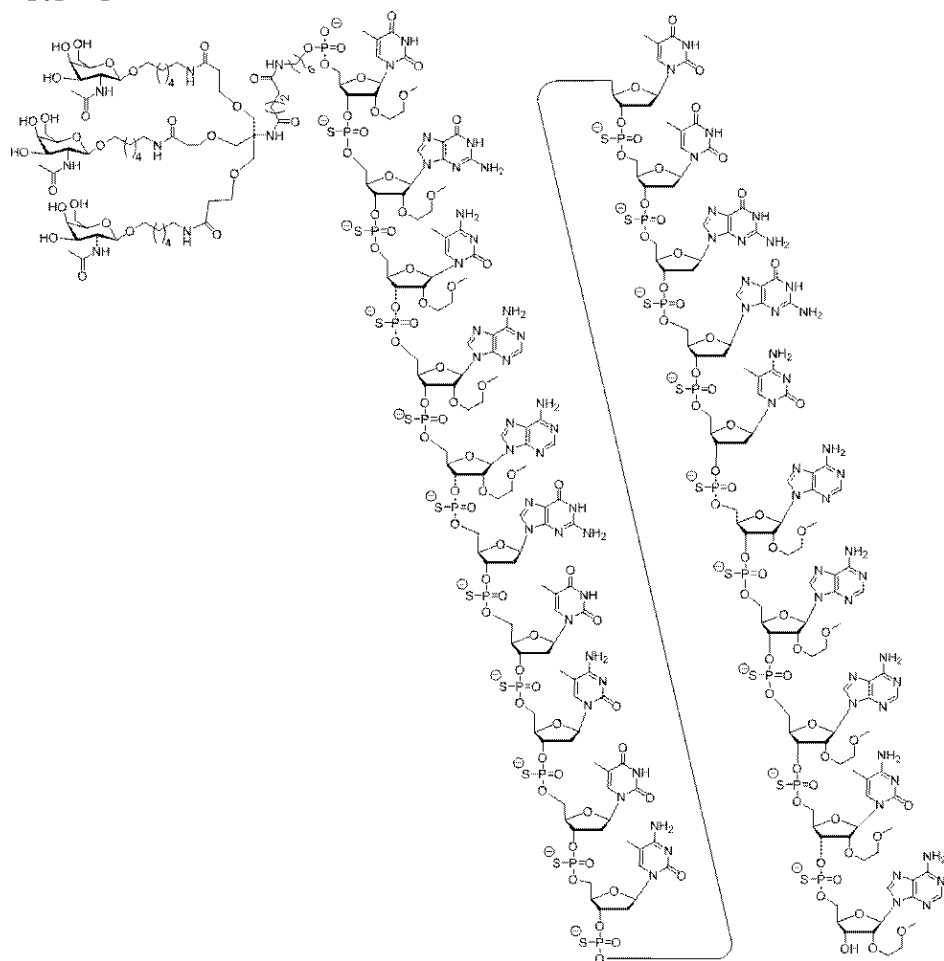
【 0 2 3 9 】

30

40

50

【化 8】



10

20

【 0 2 4 0】

ある特定の実施形態は、以下の式を含む、またはそれからなる化合物を提供する。

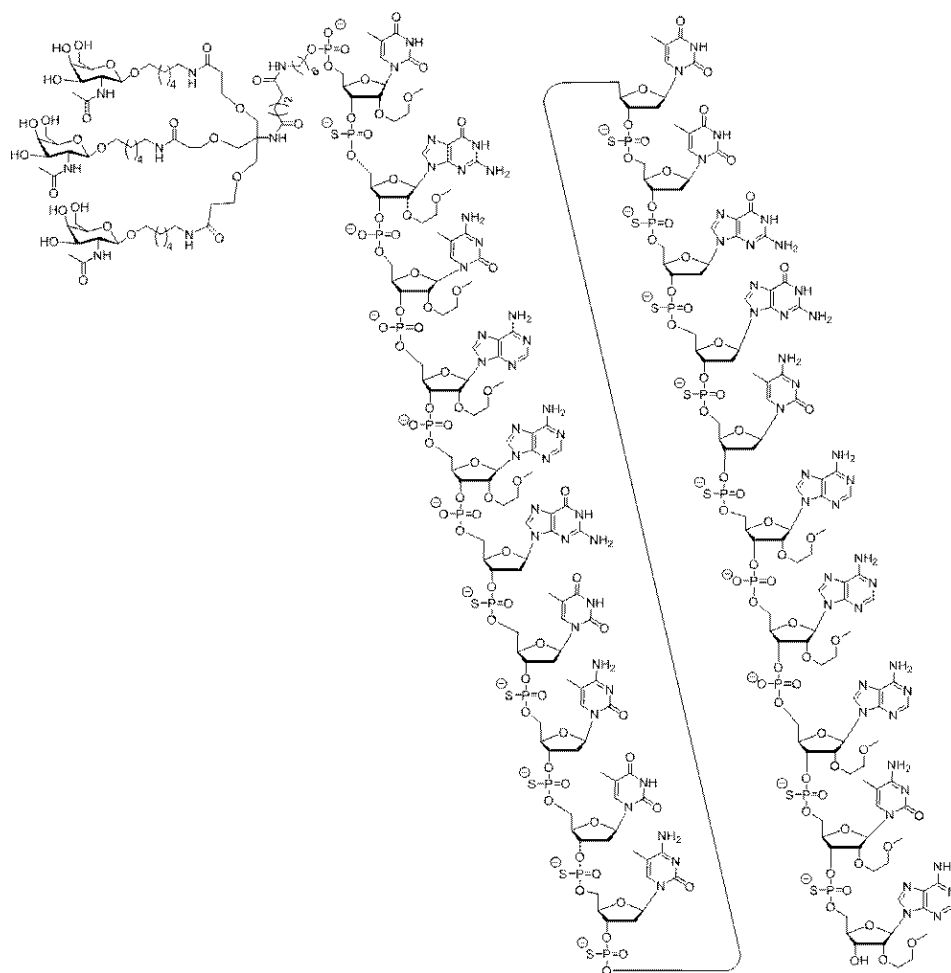
【 0 2 4 1】

30

40

50

【化 9】



10

20

【 0 2 4 2 】

ある特定の実施形態は、以下の式を含む、またはそれからなる化合物を提供し、ここで、

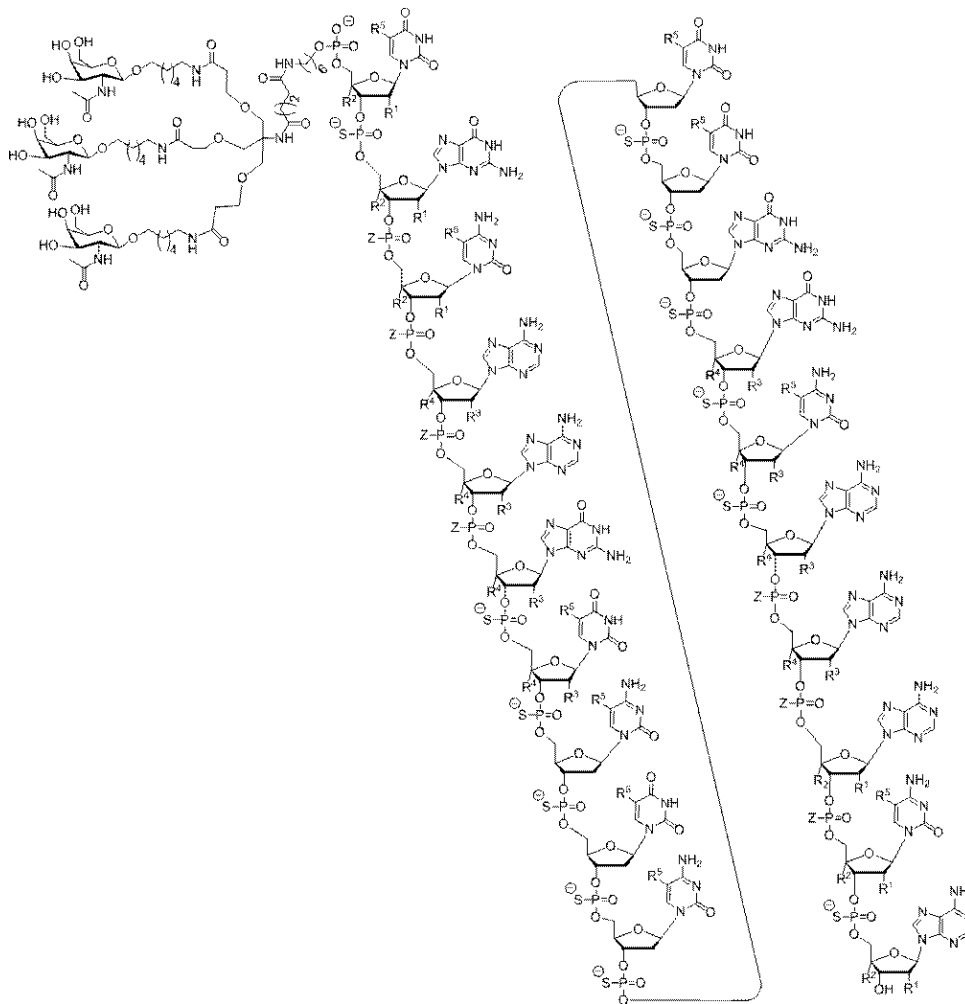
【 0 2 4 3 】

30

40

50

【化 10】



10

20

R^1 は $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) であり、 R^2 はHであり、または R^1 と R^2 はともに橋を形成し、ここで R^1 は $-O-$ であり、 R^2 は $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であり、 R^1 と R^2 は、得られる橋が $-O-CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、及び $-O-CH_2CH_2-$

30

から選択されるように、直接的に連結し、同じ環上の R^3 と R^4 の各対について、各環について独立して、 R^3 は、H及び $-OCH_2CH_2OCH_3$ から選択され、 R^4 はHであり、または R^3 と R^4 は共に橋を形成し、ここで R^3 は $-O-$ であり、 R^4 は $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であり、 R^3 と R^4 は、得られる橋が $-O-CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、及び $-O-CH_2CH_2-$

から選択されるように、直接的に連結し、

R^5 はH及び CH_3 から選択され、

Zは、S-及びO-から選択される。

40

【0244】

ある特定の実施形態は、先行するいずれかの請求項に記載の化合物またはその塩と、医薬上許容される担体または希釈剤の少なくとも1つの化合物を含む組成物を提供する。

【0245】

ある特定の実施形態は、先行する請求項のいずれかの化合物または組成物を、動物に投与することを含む方法を提供する。

【0246】

ある特定の実施形態では、当該動物はヒトである。

【0247】

ある特定の実施形態では、化合物を投与することにより、PKK関連疾患、障害または

50

病態を予防、治療または改善する。

【0248】

ある特定の実施形態では、P K K 関連疾患、障害または病態は、遺伝性血管浮腫（H A E）、浮腫、血管浮腫、腫脹、目蓋の血管性浮腫、眼球浮腫、黄斑浮腫、脳浮腫、血栓症、塞栓症、血栓塞栓症、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、脳卒中、または梗塞である。

【0249】

ある特定の実施形態は、炎症性疾患または血栓塞栓性疾患を治療するために医薬品の製造するための先行する請求項のいずれかに記載の化合物または組成物の使用を提供する。

アンチセンス化合物

【0250】

オリゴマー化合物として、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチドアナログ、オリゴヌクレオチド模倣物、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及び s i R N A が挙げられるが、これらに限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して「アンチセンス」であってもよく、これは水素結合を介して標的核酸へのハイブリダイゼーションを受けることができることを意味する。

【0251】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、5' から 3' 方向に書かれた場合、それが標的化された標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。ある特定のそのような実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5' から 3' 方向に書かれた場合、それが標的化された標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。

【0252】

ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 12 ~ 30 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 12 ~ 25 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 12 ~ 22 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 14 ~ 20 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 15 ~ 25 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 18 ~ 22 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 19 ~ 21 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、長さが 8 ~ 80、12 ~ 50、13 ~ 30、13 ~ 50、14 ~ 30、14 ~ 50、15 ~ 30、15 ~ 50、16 ~ 30、16 ~ 50、17 ~ 30、17 ~ 50、18 ~ 30、18 ~ 50、19 ~ 30、19 ~ 50、または 20 ~ 30 の連結されたサブユニットである。

【0253】

ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 12 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 13 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 14 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 15 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 16 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 17 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 18 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 19 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 20 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが 21 のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標

10

20

30

40

50

的とするアンチセンス化合物は、長さが22のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが23のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが24のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが25のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが26のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが27のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが28のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが29のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが30のサブユニットである。ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが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、または上記の2つ値のいずれかによって定義される範囲の連結されたサブユニットである。ある特定の実施形態では、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であり、連結されたサブユニットは、ヌクレオシドである。

10

【0254】

20

ある特定の実施形態では、P K K核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが短縮または切断されていてもよい。単一のサブユニットを5'端から欠失させるか(5'切断)、あるいは3'端から欠失させること(3'切断)ができる。P K K核酸を標的とする短縮型または切断型アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の5'端から2つのサブユニットが欠失しているか、あるいは3'端から2つのサブユニットが欠失しているか、あるいは、欠失したヌクレオシドは、アンチセンス化合物全体に分散しているか(例えば1つのヌクレオチドが5'端から欠失し1つのヌクレオシドが3'端から欠失しているアンチセンス化合物)。

【0255】

30

延長されたアンチセンス化合物中に単一の追加サブユニットが存在する場合、当該追加サブユニットはアンチセンス化合物の5'端にあっても、3'端にあってもよい。2つ以上のサブユニットが存在する場合、追加されたサブユニットは互いに隣り合っているか(例えば2つのサブユニットがアンチセンス化合物の5'端に付加されているか(5'付加)、あるいは3'端に付加されている(3'付加)アンチセンス化合物)。あるいは、付加されたサブユニットは、アンチセンス化合物全体に分散しているか(例えば1つのサブユニットが5'端に付加され、1つのサブユニットが3'端に付加されているアンチセンス化合物)。

【0256】

40

活性を排除することなく、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンス化合物の長さを増加もしくは減少させ、かつ／またはミスマッチ塩基を導入することができる。例えばWoolfら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)では、13~25核酸塩基長の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的RNAの切断を誘導するその能力について、卵母細胞注入モデルで試験された。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端近くに8個または11個のミスマッチ塩基を含む25核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含まないアンチセンスオリゴヌクレオチドほどではなかったものの、標的mRNAの特異的切断を指示することができた。また、標的特異的切断が、13核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド(1つまたは3つのミスマッチを持つものを含む)を使って達成された。

【0257】

Gautschiら(J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471

50

、March 2001) は、bcl-2 mRNA に対して 100% の相補性を有し、かつ bcl-xL mRNA に対して 3 つのミスマッチを有するオリゴヌクレオチドが、インビトロ及びインビボで bcl-2 と bcl-xL の発現をどちらも低減できることを実証した。さらにまた、このオリゴヌクレオチドはインビボで強力な抗腫瘍活性も示した。

【0258】

Maher と Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16: 3341-3358, 1988) は、一連のタンデム 14 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにそれぞれ 2 つまたは 3 つの当該タンデムアンチオリゴヌクレオチドの配列で構成される 28 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド及び 42 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを、ヒト DHFR の翻訳を停止させるその能力について、ウサギ網状赤血球アッセイで試験した。3 つの 14 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドのそれぞれは単独で、28 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは 42 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドよりもレベルは低かったものの、翻訳を阻害することができた。

【0259】

アンチセンス化合物モチーフ

ある特定の実施形態では、PKK 核酸を標的とするアンチセンス化合物が、強化された阻害活性、標的核酸に対する増加した結合アフィニティ、または *in vivo* ヌクレアーゼによる分解に対する耐性などといった性質が当該アンチセンス化合物に付与されるようなパターンまたはモチーフで配置された化学修飾サブユニットを有する。

【0260】

キメラアンチセンス化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性、増加した細胞取り込み、標的核酸に対する増加した結合アフィニティ、及び／または増加した阻害活性が付与されるように修飾された少なくとも 1 つの領域を含有する。キメラアンチセンス化合物の第 2 の領域は、任意で RNA:DNA 二重鎖の RNA 鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼ RNase H の基質として役立ててもよい。

【0261】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、キメラアンチセンス化合物と考えられる。ギャップマーでは、RNase H 切断を支持する複数のヌクレオチドを有する内側領域が、内側領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外側領域の間に配置されている。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは一般にエンドヌクレアーゼ切断の基質として役立ち、一方、ウイングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態では、ギャップマーの領域が、個々の異なる領域を構成する糖部分のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために使用される糖部分のタイプとして、いくつかの実施形態では、 β -D-リボヌクレオシド、 β -D-デオキシリボヌクレオシド、2'-修飾ヌクレオシド（そのような 2'-修飾ヌクレオシドとして、例えば 2'-MOE や 2'-O-CH₃などを挙げることができる）、及び二環式糖修飾ヌクレオシド（そのような二環式糖修飾ヌクレオシドとして 4'-(CH₂)_n-O-2' 橋（ここで n=1 または n=2）及び 4'-CH₂-O-CH₂-2'）を有するものを挙げることができる）が挙げられる。ある特定の実施形態では、ウイングはいくつかの修飾糖部分、例えば 2'-MOE を含んでもよい。ある特定の実施形態では、ウイングはいくつかの修飾糖部分と無修飾糖部分を含んでもよい。ある特定の実施形態では、ウイングは、2'-MOE ヌクレオシド及び 2'-デオキシヌクレオシドの様々な組合せを含んでもよい。

【0262】

異なる領域は、それぞれ一様な糖部分を含むか、異なった糖部分を含むか、または交互に並んだ糖部分を含みうる。ウイング-ギャップ-ウイングモチーフは、しばしば「X-Y-Z」と記載されるが、この場合、「X」は 5'-ウイングの長さを表し、「Y」はギャップの長さを表し、「Z」は 3'-ウイングの長さを表す。「X」と「Z」は、一様な糖部分を含むか、異なった糖部分を含むか、または交互に並んだ糖部分を含みうる。ある特定の実施形態では、「X」と「Y」が、2 つ以上の 2'-デオキシヌクレオシドを含みう

10

20

30

40

50

る。「Y」は2'-デオキシヌクレオシドを含みうる。本明細書において、「X-Y-Z」と記述されるギャップマーは、ギャップが5'-ウイング及び3'-ウイングのそれぞれと直接隣り合って配置されるような構成を有する。したがって、5'-ウイングとギャップの間にも、ギャップと3'-ウイングの間にも、介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書に記載するアンチセンス化合物はいずれもギャップマーモチーフを有することができる。ある特定の実施形態では、「X」と「Z」が同じであり、別の実施形態では、それらが異なる。

【0263】

ある特定の実施形態において、本明細書で提供されるギャップマーは、例えば、5-10-5のモチーフを有する20量体を含む。

【0264】

標的核酸、標的領域及びヌクレオチド配列

ヒト血漿プレカリクレイン(PKK)をコードするヌクレオチド配列は、限定されないが、GENBANK寄託番号NM_000892.3(配列番号1として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号:DC412984.1(配列番号2として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号:CN265612.1(配列番号3として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号AK297672.1(配列番号4として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号DC413312.1(配列番号5として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号AV688858.2(配列番号6として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号:CD652077.1(配列番号7として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号BC143911.1(配列番号8として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号CB162532.1(配列番号9として本明細書に組み込まれる)、核酸塩基111693001から111730000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_016354.19、(配列番号10として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号NM_008455.2(配列番号11として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号BB598673.1(配列番号12として本明細書に組み込まれる)、核酸塩基6114001から6144000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_039460.7(配列番号13として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号NM_012725.2(配列番号14として本明細書に組み込まれる)、核酸塩基10952001から10982000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NW_047473.1(配列番号15として本明細書に組み込まれる)、GENBANK寄託番号XM_002804276.1(配列番号17として本明細書に組み込まれる)、及び核酸塩基2358000から2391000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NW_001118167.1(配列番号18として本明細書に組み込まれる)である。

【0265】

本明細書に含まれる実施例の各配列番号に記載される配列は、糖部分への修飾、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対する任意の修飾に依存しないことが理解される。したがって、配列番号によって定義されたアンチセンス化合物は、独立して、糖部分への1つ以上の修飾、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基を含むことができる。Iss番号(Iss No)によって定義されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列及びモチーフの組み合わせを示す。

【0266】

ある特定の実施形態では、標的領域は、標的核酸の構造的に定義された領域である。例えば、標的領域は、3'UTR、5'UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロン接合部、コーディング領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の定義された核酸領域を含んでいてもよい。PKKの構造的に定義された領域は、NCBI等の配列データベースからの寄託番号によって得ることができ、そのような情報は、参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、標的領域は、標的領域内の1つの標的セグ

10

20

30

40

50

メントの5'標的部位から、同一の標的領域内の別の標的セグメントの3'標的部位までの配列を含んでいてもよい。

【0267】

標的化は、所望の効果が生じるように、アンチセンス化合物がハイブリダイズする少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。ある特定の実施形態では、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの減少である。ある特定の実施形態では、所望の効果は、標的核酸または標的核酸に関連する表現型の変化によりコードされるタンパク質のレベルの減少である。

【0268】

標的領域は、2つ以上の標的セグメントを含んでいてもよい。標的領域内の複数の標的セグメントは重複してもよい。あるいは、重複していなくてもよい。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、約300個を超えないヌクレオチドにより分離される。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、いくつかのヌクレオチドによって分離され、すなわち、標的核酸上の約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、もしくは10個のヌクレオチド、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、もしくは10個を超えないヌクレオチド、約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、もしくは10個を超えないヌクレオチド、または前述値のいずれか2つによって定義される範囲のヌクレオチドで分離される。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上で、5個を超えないヌクレオチド、または約5個を超えないヌクレオチドで分離される。ある特定の実施形態では、標的セグメントは連続する。本明細書に挙げる5'標的部位または3'標的部位のいずれかである開始核酸を有する範囲によって定義される標的領域が企図される。

【0269】

適切な標的セグメントは、5'UTR、コーディング領域、3'UTR、イントロン、エクソン、またはエクソン／イントロン接合内に見出すことができる。開始コドンまたは終止コドンを含む標的セグメントも、適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、特に、開始コドンまたは終止コドン等の、ある特定の構造的に定義された領域を除外してもよい。

【0270】

適切な標的セグメントの決定は、ゲノム全体にわたって、標的核酸の配列と他の配列との比較を含むことができる。例えば、BLASTアルゴリズムは、異なる核酸間の類似性の領域を特定するために使用することができる。この比較により、選択された標的核酸（すなわち、非標的またはオフターゲット配列）以外の配列に非特異的にハイブリダイズし得るアンチセンス化合物配列を選択することを防ぐことができる。

【0271】

活性標的領域内のアンチセンス化合物の（例えば、標的核酸レベルの減少率によって定義されているように）活性の変化があり得る。ある特定の実施形態では、PKK mRNAレベルの減少は、PKK発現の阻害の指標となる。PKKタンパク質のレベルの減少も、標的mRNA発現の阻害の指標となる。さらに、表現型の変化は、PKK発現の阻害の指標となる。例えば、低減または予防された炎症は、PKK発現の阻害の指標となる。別の例では、低減または予防された浮腫／腫脹は、PKK発現の阻害の指標となる。別の例では、低減または予防された血管透過性は、PKK発現の阻害の指標となりうる。別の例では、低減または予防された血管漏出はPKK発現の阻害の指標となりうる。ある特定の実施形態では、血管透過性は、エバンスブルー等の色素の定量化によって測定する。

【0272】

ハイブリタイゼーション

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するアンチセンス化合物と標的核酸との間でハイブリダイゼーションが起こる。最もよくあるハイブリダイゼーションの機序は、核酸分子の相補的核酸塩基間での水素結合形成（例えばワトソン－クリック型、フーグスティ

10

20

30

40

50

ーン型または逆フーグスティーン型水素結合形成)を必要とする。

【0273】

ハイブリダイゼーションは、さまざまな条件下で起こりうる。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、ハイブリダイズさせようとする核酸分子の性質及び組成によって決まる。

【0274】

ある配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズすることができるかどうかを決定する方法は、当技術分野では周知である。ある特定の実施形態において、ここに提供するアンチセンス化合物は、標的核酸と特異的にハイブリダイズすることができる。

【0275】

相補性

アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、所望の効果(例えばPKK核酸などの標的核酸のアンチセンス阻害)が生じるような形で、標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合することができるのであれば、そのアンチセンス化合物と標的核酸とは互いに相補的である。

【0276】

アンチセンス化合物が依然として標的核酸に特異的にハイブリダイズできるのであれば、アンチセンス化合物とPKK核酸の間の非相補的核酸塩基は許容されうる。さらにまた、アンチセンス化合物は、介在セグメントまたは隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないような形で、PKK核酸の2つ以上のセグメントにハイブリダイズしてもよい(例えばループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造)。

【0277】

ある特定の実施形態において、ここに提供するアンチセンス化合物またはその指定部分は、PKK核酸、その標的領域、標的セグメント、または指定部分に対して、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同であるか、または少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同である。標的核酸に対するアンチセンス化合物の相補性パーセントは、常法を使って決定することができる。

【0278】

例えば、アンチセンス化合物の20核酸塩基中18核酸塩基が標的領域に相補的であり、それゆえに特異的にハイブリダイズするであろうアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性に相当するであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は一かたまりになって存在してもよいし、相補的核酸塩基の間に点在していてもよく、互いに連続している必要も、相補的核酸塩基と連続している必要もない。したがって、標的核酸と完全に相補的な2つの領域に挟まれた4つの非相補的核酸塩基を有する18核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸に対して77.8%の総相補性を有し、したがって本発明の範囲に包含されるであろう。標的核酸の一領域に対するアンチセンス化合物の相補性パーセントは、当技術分野において知られているBLASTプログラム(basic local alignment search tool)及びPowerBLASTプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)を使って、ルーチンに決定することができる。相同性パーセント、配列同一性パーセントまたは配列相補性パーセントは、例えばSmithと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, Genetics Computer Group, ウィスコンシン州マディソン、ユニバーシティ・リサーチ・パーク)により、デフォルト設定を使って決定することができ

10

20

30

40

50

る。

【0279】

ある特定の実施形態では、ここに提供するアンチセンス化合物またはその指定部分が、標的核酸またはその指定部分に完全に相補的（すなわち100%相補的）である。例えばアンチセンス化合物は、血漿プレカリクレイン核酸、またはその標的領域、または標的セグメントもしくは標的配列に完全に相補的でありうる。本明細書にいう「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と正確に塩基対合する能力を有することを意味する。例えば20核酸塩基アンチセンス化合物は、そのアンチセンス化合物に完全に相補的な対応する20核酸塩基部分が標的核酸中に存在するのであれば、400核酸塩基長の標的配列に対して完全に相補的である。第1及び／または第2核酸の指定部分に関して完全に相補的という表現を使用することもできる。例えば30核酸塩基アンチセンス化合物の20核酸塩基部分は、400核酸塩基長の標的配列に対して「完全に相補的」であることができる。30核酸塩基オリゴヌクレオチドの20核酸塩基部分は、標的配列が対応する20核酸塩基部分（その各核酸塩基がアンチセンス化合物の当該20核酸塩基部分に相補的であるもの）を有するのであれば、標的配列に対して完全に相補的である。同時に、当該30核酸塩基アンチセンス化合物全体は、当該アンチセンス化合物の残りの10核酸塩基も標的配列に相補的であるかどうか依存して、標的配列に対して完全に相補的である場合も、そうでない場合もある。

10

【0280】

非相補的核酸塩基の場所はアンチセンス化合物の5'端または3'端であることができる。あるいは、1つまたは複数の非相補的核酸塩基が、アンチセンス化合物の内部位置にあってもよい。2つ以上の非相補的核酸塩基が存在する場合、それらは連続して（すなわち連結されて）いてもよいし、不連続であってもよい。一実施形態では、非相補的核酸塩基が、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドのウイングセグメント中にある。

20

【0281】

ある特定の実施形態において、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20核酸塩基長のアンチセンス化合物または11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20核酸塩基長までのアンチセンス化合物が、標的核酸またはその指定部分との比較で含む非相補的核酸塩基は、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つ以下である。

30

【0282】

ある特定の実施形態において、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基長のアンチセンス化合物または11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基長までのアンチセンス化合物が、標的核酸またはその指定部分との比較で含む非相補的核酸塩基は、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つ以下である。

【0283】

ここに提供するアンチセンス化合物には、標的核酸の一部に相補的なものも含まれる。ここでいう「一部分」とは、標的核酸の一領域または一セグメント内の所定の数の連続する（すなわち連結された）核酸塩基を指す。「一部分」は、アンチセンス化合物の、所定の数の連続する核酸塩基も意味する。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも8核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも9核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも10核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも11核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも12核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの

40

50

少なくとも13核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも14核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも15核酸塩基部分に相補的である。ある標的セグメントの少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20核酸塩基部分もしくはそれ以上の核酸塩基部分、またはこれらの値のうちの任意の2つによって画定される範囲に相補的な、アンチセンス化合物も考えられる。

【0284】

同一性

ここに提供するアンチセンス化合物は、ある特定ヌクレオチド配列、配列番号、もしくは具体的 *Isis* 番号によって表される化合物、またはその一部分に対して、所定の同一性パーセントも有する。本明細書にいうアンチセンス化合物は、それが同じ核酸塩基対合能を有するのであれば、本明細書に開示する配列と同一である。例えば、ウラシルとチミジンはどちらもアデニンと対合するので、開示したDNA配列中のチミジンの代わりにウラシルを含有するRNAは、当該DNA配列と同一であるとみなされるであろう。本明細書に記載するアンチセンス化合物の短縮型及び延長型、ならびにここに提供するアンチセンス化合物と比較して非同一塩基を有する化合物も考えられる。非同一塩基は互いに隣り合っているてもよいし、アンチセンス化合物全体に散在しているてもよい。アンチセンス化合物のパーセント同一性は、比較対象である配列との比較で同一塩基対合を有する塩基の数に従って計算される。

【0285】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物またはその一部分が、本明細書に開示するアンチセンス化合物、配列番号、またはその一部分の2つ以上と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0286】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物の一部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。ある特定の実施形態では、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。

【0287】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一部を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。ある特定の実施形態では、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。

【0288】

修飾

ヌクレオシドは塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基ともいう）部分は、通常、複素環式塩基部分である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合は、リン酸基を、糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分に連結することができる。オリゴヌクレオチドは、互いに隣り合うヌクレオシドを共有結合で連結して、線状ポリマー状のオリゴヌクレオチドを形成させることによって形成される。オリゴヌクレオチド構造内では、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結部を形成していると、一般に言われる。

【0289】

アンチセンス化合物の修飾には、ヌクレオシド間連結部、糖部分、または核酸塩基の置換または改変が包含される。修飾アンチセンス化合物は、例えば強化された細胞取り込み、核酸標的に対する強化されたアフィニティ、ヌクレアーゼの存在下での増加した安定性、増加した阻害活性などといった望ましい性質ゆえに、ネイティブ型より好ましいことが

多い。

【0290】

化学修飾ヌクレオシドは、短縮型または切断型アンチオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結合アフィニティを増加させるために使用することもできる。結果として、そのような化学修飾ヌクレオシドを有する短いアンチセンス化合物で、匹敵する結果を得ることができる場合が多い。

【0291】

修飾ヌクレオシド間連結部

RNA及びDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結部は、3'→5'ホスホジエステル連結部である。2つ以上の修飾（すなわち天然に存在しない）ヌクレオシド間連結部を有するアンチセンス化合物は、例えば強化された細胞取り込み、核酸標的に対する強化されたアフィニティ、及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などといった望ましい性質ゆえに、天然に存在するヌクレオシド間連結部を有するアンチセンス化合物よりも選択されることが多い。

【0292】

修飾ヌクレオシド間連結部を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子が保たれているヌクレオシド間連結部と、リン原子を有さないヌクレオシド間連結部とが含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間連結部には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、及びホスホロチオエートが含まれるが、これらに限定されない。リン含有連結部及び非リン含有連結部を調製する方法は、よく知られている。

【0293】

ある特定の実施形態では、血漿プレカリクレイン核酸を標的とするアンチセンス化合物が、2つ以上の修飾ヌクレオシド間連結部を含む。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結部がホスホロチオエート連結部である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物の各ヌクレオシド間連結部がホスホロチオエートヌクレオシド間連結部である。

【0294】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、当該オリゴヌクレオチドまたはその一領域に沿って、所定のパターンまたは修飾ヌクレオシド間連結部モチーフで配置された修飾ヌクレオシド間連結部を含む。ある特定の実施形態では、ヌクレオシド間連結部が、ギャップモチーフ (gapped motif) で配置される。そのような実施形態では、2つのウイング領域のそれぞれにあるヌクレオシド間連結部が、ギャップ領域中のヌクレオシド間連結部とは異なる。ある特定の実施形態では、ウイング中のヌクレオシド間連結部はホスホジエステルであり、ギャップ中のヌクレオシド間連結部はホスホロチオエートである。ヌクレオシドモチーフは独立して選択されるので、ギャップヌクレオシド間連結部モチーフを有するオリゴヌクレオチドは、ギャップヌクレオシドモチーフを有しても有さなくてもよく、ギャップヌクレオシドモチーフを有する場合、ウイング長とギャップ長は同じであっても同じでなくてもよい。

【0295】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、交互ヌクレオシド間連結部モチーフを有する領域を含む。ある特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、一様に修飾されたヌクレオシド間連結部の一領域を含む。特定のそのような実施形態では、オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部によって一様に連結された領域を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって一様に連結されている。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が、ホスホジエステル及びホスホロチオエートから選択される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部がホスホジエステル及びホスホロチオエートから選択され、少なくとも1つのヌクレオシド間連結部がホスホロチオエートである。

【0296】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、少なくとも6つのホスホロチオエー

10

20

30

40

50

トヌクレオシド間連結部を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも8つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも10個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも6つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも8つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも10個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも12個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。ある特定のそのような実施形態では、少なくとも1つの上述のブロックが、オリゴヌクレオチドの3'端に位置する。ある特定のそのような実施形態では、少なくとも1つの上述のブロックがオリゴヌクレオチドの3'端から3ヌクレオシド以内に位置する。

10

【0297】

ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、2つ以上のメチルホスホネート連結部を含む。ある特定の実施形態では、ギャップマーヌクレオシドモチーフを有するオリゴヌクレオチドが、1つまたは2つのメチルホスホネート連結部を除くすべてがホスホロチオエート連結部である連結部モチーフを含む。ある特定の実施形態では、1つのメチルホスホネート連結部が、ギャップマーヌクレオシドモチーフを有するオリゴヌクレオチドの中央のギャップ中にある。

20

【0298】

ある特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部とホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を、ヌクレアーゼ耐性が維持されるように定めることが望ましい。ある特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数と位置及びホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数と位置を、ヌクレアーゼ耐性が維持されるように定めることが望ましい。ある特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を減少させ、かつホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を増加させることができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を維持したまま、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数を減少させ、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部を増加させることができる。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を保ったまま、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数を減少させることが望ましい。ある特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を保ったまま、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を増加させることが望ましい。

30

【0299】

修飾糖部分

アンチセンス化合物は、場合によっては、糖基が修飾されているヌクレオシドを2つ以上含有しうる。そのような糖修飾ヌクレオシドは、強化されたヌクレアーゼ安定性、増加した結合アフィニティ、または他の何らかの有益な生物学的性質を、アンチセンス化合物に付与しうる。ある特定の実施形態では、ヌクレオシドが化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例には、置換基の付加（5'置換基、2'置換基、非ジェミナル環原子の橋による二環式核酸（BNA）の形成、S、N（R）、またはC（R₁）（R₂）（R、R₁及びR₂は、それぞれ独立して、H、C₁-C₁₂アルキルまたは保護基である）によるリボシル環酸素原子の置き換え、及びそれらの組み合わせなどがあるが、これらに限定されない。化学修飾糖の例としては、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド（開示されている他の5'、2'-ビス置換ヌクレオシドについては、PCT国際出願WO2008/101157（公開日2008年8月21日）を参照されたい）、またはSによるリボシル環酸素原子の置き換えと2'位におけるさらなる置換（米国特許出願公開US2005-0130923（公開日2005年6月16日）参照）、あるいはBNAの5'-置換（PCT国際出願WO2007/134181（公開日2007

40

50

年11月22日) 参照、この場合はLNAが例えば5'-メチル基または5'-ビニル基で置換されている) などがある。

【0300】

修飾糖部分を有するヌクレオシドの例には、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₂H₂-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドがあるが、これらに限定されない。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁₀アルキル、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)、及びO-CH₂-C(=O)-N(R_l)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n)から選択することもできる(ここで、各R_l、R_m及びR_nは、独立して、Hまたは置換もしくは無置換C₁-C₁₀アルキルである)。

【0301】

本明細書にいう「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式ヌクレオシドの例には、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子の間に橋を含むヌクレオシドなどがあるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、ここに提供するアンチセンス化合物が、4'→2'橋を含む二環式ヌクレオシドを2つ以上含む。そのような4'→2'架橋二環式ヌクレオシドの例として、次式の一つが挙げられるが、これらに限定されない: 4'-(CH₂)-O-2'(LNA)、4'-(CH₂)-S-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA)、4'-CH(CH₂)-O-2'(拘束エチルまたはcEtともいう)及び4'-C-H(CH₂OCH₃)-O-2'(及びその類似体、2008年7月15日発行の米国特許第7,399,845号参照)、4'-C(CH₂)(CH₃)-O-2'(及びその類似体、国際出願公開WO2009/006478(公開日2009年1月8日)参照); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及びその類似体、国際出願公開WO/2008/150729(公開日2008年12月11日)参照)、4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(米国特許出願公開US2004-0171570(公開日2004年9月2日)参照)、4'-CH₂-N(R)-O-2'(式中、Rは、H、C₁-C₁₂アルキル、または保護基である)(2008年9月23日発行の米国特許7,427,672号参照)、4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(Zhou et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照)、及び4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及びその類似体、国際出願公開WO 2008/154401(公開日2008年12月8日)参照)。

【0302】

公表された文献には二環式ヌクレオシドに関する他の報告文も見いだすことができる(例えばSingh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; 及びOrum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 米国特許第6,268,490号; 同第6,525,191号; 同第6,670,461号; 同第6,770,748号; 同第6,794,499号; 同第7,034,133号; 同第7,053,207号; 同第7,399,845号; 同第7,547,684号; 及び同第7,696,345号; 米国特許出願公開番号US2008-0039618; 同US2009-0012281; 米国特許出願第61/026,99

10

20

30

40

50

5号及び同第61/097, 787号; PCT国際出願公開WO1999/014226; 同WO2004/106356; 同WO2005/021570; 同WO2007/134181; 同WO2008/150729; 同WO2008/154401; 同WO2009/006478; 同WO2010/036698; 同WO2011/017521; 同WO2009/067647 同WO2009/100320 参照。前述の二環式ヌクレオシドのそれぞれは、例えば α -L-リボフラノースと β -D-リボフラノースなど、2つ以上の立体化学的糖配置を有するものを調製することができる(1999年3月25日にWO99/14226として公開されたPCT国際出願PCT/DK98/00393を参照されたい)。

【0303】

ある特定の実施形態では、限定するわけではないが、BNAヌクレオシドの二環式糖部分として、ペントフラノシル糖部分の4'位と2'位の間に少なくとも1つの橋を有する化合物が挙げられ、その橋は、独立して、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-C(R_a)=C(R_b)-$ 、 $-C(R_a)=N-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=NR_a)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_a)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 、及び $-N(R_a)-$ から独立して選択される1つの基または2~4つの連結された基を含み、

式中、

xは、0、1、または2であり、

nは、1、2、3、または4であり、

各 R_a 及び R_b は、独立して、H、保護基、ヒドロキシル、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 C_5-C_7 脂環式ラジカル、置換 C_5-C_7 脂環式ラジカル、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、 CN 、スルホニル($S(=O)_2-J_1$)、またはスルホキシル($S(=O)-J_1$)であり、かつ

各 J_1 及び J_2 は、独立して、H、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、 C_1-C_{12} アミノアルキル、置換 C_1-C_{12} アミノアルキルまたは保護基である。

【0304】

ある特定の実施形態では、二環式糖部分の橋が $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ または $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ である。ある特定の実施形態では、当該橋が、4'- CH_2-2' 、4'- $(CH_2)_2-2'$ 、4'- $(CH_2)_3-2'$ 、4'- C_2H_4O-2' 、4'- $(C_2H_4)_2O-2'$ 、4'- $C_2H_4O-N(R)-2'$ 及び4'- $C_2H_4N(R)-O-2'$ であり、式中、各Rは、独立して、H、保護基または C_1-C_{12} アルキルである。

【0305】

ある特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドが、さらに異性立体配置によって定義される。例えば、4'-2'メチレンオキシ橋を含むヌクレオシドは、 α -L立体配置または β -D立体配置をとりうる。 α -L-メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')BNAは、以前に、アンチセンスオリゴヌクレオチドに組み込まれており、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドはアンチセンス活性を示した(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

【0306】

ある特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドとして、以下に図示する(A) α -L-メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')BNA、(B) β -D-メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')BNA、(C) エチレンオキシ(4'- $(C_2H_4)_2-O-2'$)BNA

10

20

30

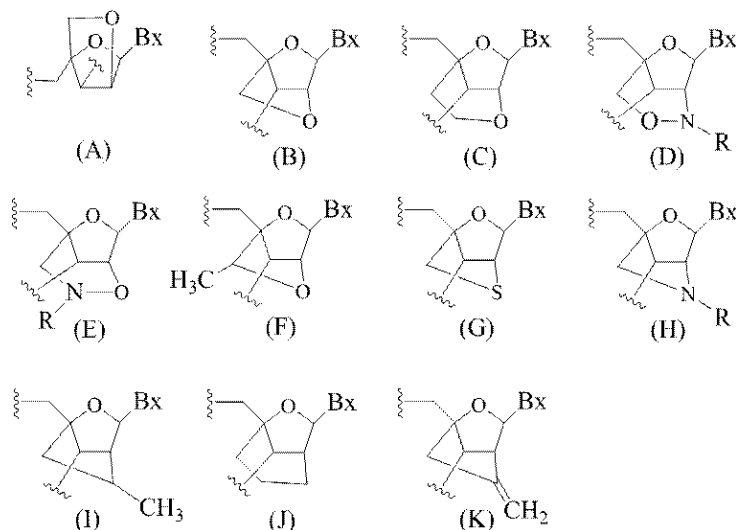
40

50

、(D) アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA、(E) オキシアミノ(4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA、及び(F) メチル(メチレンオキシ)(4'-CH(CH₃)-O-2') BNA、(G) メチレンーチオ(4'-CH₂-S-2') BNA、(H) メチレンーアミノ(4'-CH₂-N(R)-2') BNA、(I) メチル炭素環式(4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA、(J) プロピレン炭素環式(4'-(CH₂)₃-2') BNA、及び(K) ビニル BNAが挙げられるが、これらに限定されない：

【0307】

【化11】



10

20

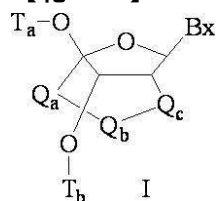
式中、Bxは塩基部分であり、かつRは、独立して、H、保護基、C₁-C₁₂アルキルまたはC₁-C₁₂アルコキシである。

【0308】

ある特定の実施形態では、式I：

【0309】

【化12】



30

[式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

-Q_a-Q_b-Q_c-は、-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-または-N(R_c)-O-CH₂であり、

R_cは、C₁-C₁₂アルキルまたはアミノ保護基であり、かつ

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0310】

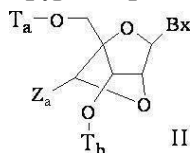
ある特定の実施形態では、式II：

【0311】

40

50

【化 1 3】



[式中、

B x は、複素環式塩基部分であり、

T a 及び T b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けであり、

Z a は、C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオールまたは置換チオである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0 3 1 2】

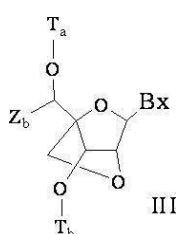
一実施形態では、当該置換基のそれぞれが、独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、O J_c、N J_c J_d、S J_c、N₃、O C (=X) J_c、及び N J_e C (=X) N J_c J_d から独立して選択される置換基で一置換または多置換されており、式中、各 J_c、J_d 及び J_e は、独立して、H、C₁ - C₆ アルキル、または置換 C₁ - C₆ アルキルであり、かつ X は、O または N J_c である。

【0 3 1 3】

ある特定の実施形態では、式 I I I :

【0 3 1 4】

【化 1 4】



[式中、

B x は、複素環式塩基部分であり、

T a 及び T b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けであり、

Z b は、C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニルまたは置換アシル (C (=O) -) である]

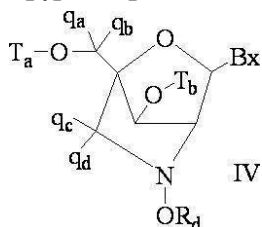
を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0 3 1 5】

ある特定の実施形態では、式 I V :

【0 3 1 6】

【化 1 5】



10

20

30

40

50

[式中、

B_xは、複素環式塩基部分であり、

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けであり、

R_dは、C₁－C₆アルキル、置換C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニルまたは置換C₂－C₆アルキニルであり、

各q_a、q_b、q_c及びq_dは、独立して、H、ハロゲン、C₁－C₆アルキル、置換C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニルまたは置換C₂－C₆アルキニル、C₁－C₆アルコキシル、置換C₁－C₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁－C₆アミノアルキルまたは置換C₁－C₆アミノアルキルである]

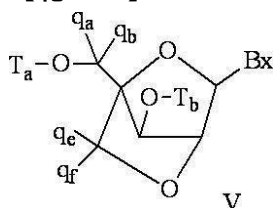
を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0317】

ある特定の実施形態では、式V：

【0318】

【化16】



[式中、

B_xは、複素環式塩基部分であり、

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けであり、

q_a、q_b、q_e及びq_fは、それぞれ独立して、水素、ハロゲン、C₁－C₁₂アルキル、置換C₁－C₁₂アルキル、C₂－C₁₂アルケニル、置換C₂－C₁₂アルケニル、C₂－C₁₂アルキニル、置換C₂－C₁₂アルキニル、C₁－C₁₂アルコキシ、置換C₁－C₁₂アルコキシ、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k、N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)-NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)-NJ_jJ_kまたはN(H)C(=S)NJ_jJ_kであるか、または

q_e及びq_fが全体として=C(q_g)(q_h)であり、

q_g及びq_hは、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁－C₁₂アルキルまたは置換C₁－C₁₂アルキルである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0319】

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') BNAモノマーであるアデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミン及びウラシルの合成及び調製は、それらのオリゴマー化及び核酸認識特性と共に、既に記述されている(Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。BNAとその調製はWO98/39352及びWO99/14226にも記述されている。

【0320】

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') BNA及び2'-チオ-BNAの類似体も既に調製されている(Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼの基質としてのオリゴデオキシリボヌクレオチド二重鎖を構成するロクトヌクレオチド類似体の調製も既に記述されている(Wengel et al., WO99/14226)。さらにまた、コンフォメーションが制限された新規高アフィニティオリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ

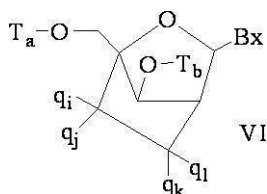
－BNAの合成も、当技術分野では既に記述されている（Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039）。加えて、2'-アミノ-及び2'-メチルアミノ-BNAも調製されており、相補的なRNA鎖及び相補的DNA鎖とのそれらの二重鎖の熱安定性が、以前に報告されている。

【0321】

ある特定の実施形態では、式VI：

【0322】

【化17】



10

[式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

Ta及びTbは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合による取り付けであり、

各qi、qj、qk及びqlは、独立して、H、ハロゲン、C1-C12アルキル、置換C1-C12アルキル、C2-C12アルケニル、置換C2-C12アルケニル、C2-C12アルキニル、置換C2-C12アルキニル、C1-C12アルコキシル、置換C1-C12アルコキシル、OJj、SJj、SOJj、SO2Jj、NJjJk、N3、CN、C(=O)OJj、C(=O)NJjJk、C(=O)Jj、O-C(=O)-NJjJk、N(H)C(=NH)NJjJk、N(H)C(=O)NJjJkまたはN(H)C(=S)NJjJkであり、かつ

20

qiとqjまたはqlとqkは、全体として、=C(qg)(qh)であり、式中、qg及びqhは、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C1-C12アルキルまたは置換C1-C12アルキルである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0323】

4'-(CH2)3-2'橋を有する炭素環式二環式ヌクレオシド及びアルケニル類似体橋4'-CH=CH-CH2-2'は既に記述されている(Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443及びAlbaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。炭素環式二環式ヌクレオシドの合成及び調製も、それらのオリゴマー化及び生化学的研究と共に記述されている(Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379)。

30

【0324】

本明細書にいう「4'-2'二環式ヌクレオシド」または「4'→2'二環式ヌクレオシド」とは、フラノース環の2つの炭素原子をつなぐ橋を含むフラノース環を含み、当該橋が糖環の2'炭素原子と4'炭素原子をつなぐ、二環式ヌクレオシドを指す。

40

【0325】

本明細書にいう「単環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分ではない修飾糖部分を含むヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体が、どの位置で修飾または置換されていてもよい。

【0326】

本明細書にいう「2'-修飾糖」とは、2'位が修飾されたフラノシル糖を意味する。ある特定の実施形態では、そのような修飾が、ハライド、例えば限定するわけではないが、置換及び無置換アルコキシ、置換及び無置換チオアルキル、置換及び無置換アミノアルキル、置換及び無置換アルキル、置換及び無置換アリル、及び置換及び無置換アルキニルか

50

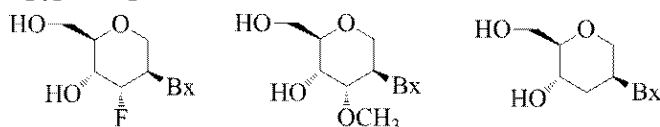
ら選択される置換基を含む。ある特定の実施形態では、2'修飾が、限定するわけではないが、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nF$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、 $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ 、及び $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ などといった置換基（式中、 n 及び m は1～約10である）から選択される。他の2'-置換基は、 C_{1-12} アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリール、アラルキル、 O -アルカリールまたは O -アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 F 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリ-アルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、アンチセンス化合物の薬物動態特性を改良するための基または薬力学的性質を改良するための基、及び類似する性質を有する他の置換基から選択することもできる。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオシドが2'-MOE側鎖を含む（Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000）。そのような2'-MOE置換は、無修飾ヌクレオシド及び他の修飾ヌクレオシド、例えば2'- O -メチル、 O -プロピル、及び O -アミノプロピルと比較して、改良された結合アフィニティを有すると記述されている。2'-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドは、インビボ用途に有望な特徴を持つ遺伝子発現のアンチセンス阻害剤であることも示されている（Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; 及び Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926）。

【0327】

本明細書にいう「修飾テトラヒドロピランヌクレオシド」または「修飾THPヌクレオシド」とは、通常のヌクレオシド中のペントフラノシル残基の代わりに六員テトラヒドロピラン「糖」（糖代用物）が使用されているヌクレオシドを意味する。修飾THPヌクレオシドには、当技術分野においてヘキシトール核酸（HNA）、アニトール（anitol）核酸（ANA）、マニトール（manitol）核酸（MNA）（Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-1954）またはフルオロHNA（F-HNA）と呼ばれ、以下に図解するようにテトラヒドロピラン環系を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

【0328】

【化18】

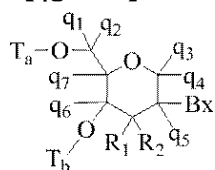


【0329】

ある特定の実施形態では、式VII:

【0330】

【化19】



VII

を有する糖代用物が選択され、

式中、当該少なくとも1つの式VIIのテトラヒドロピランヌクレオシド類似体のそれぞれについて、独立して、

10

20

30

40

50

B_xは、複素環式塩基部分であり、

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であるか、またはT_a及びT_bのうちの一方がテトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、T_a及びT_bのうちの他方がH、ヒドロキシル保護基、連結された共役基または5'もしくは3'末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇は、それぞれ独立して、H、C₁－C₆アルキル、置換C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニルまたは置換C₂－C₆アルキニルであり、かつR₁及びR₂のそれぞれは、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または無置換アルコキシ、N_{J1}J₂、S_{J1}、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)N_{J1}J₂、N_{J3}C(=X)N_{J1}J₂及びCNであり、XはO、SまたはN_{J1}であり、かつ各J₁、J₂及びJ₃は、独立して、HまたはC₁－C₆アルキルである。

【0331】

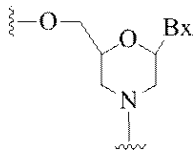
ある特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇がそれぞれHである、式VIIの修飾THPヌクレオシドが提供される。ある特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇のうちの少なくとも1つがH以外である。ある特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇のうちの少なくとも1つがメチルである。ある特定の実施形態では、R₁及びR₂のうちの一方がフルオロである、式VIIのTHPヌクレオシドが提供される。ある特定の実施形態では、R₁がフルオロ、かつR₂がHであり、R₁がメトキシ、かつR₂がHであり、そしてR₁がメトキシエトキシ、かつR₂がHである。

【0332】

ある特定の実施形態では、糖代用物が、6つ以上の原子及び2つ以上のヘテロ原子を有する環を含む。例えばモルホリノ糖部分を含むヌクレオシド、及びオリゴマー化合物におけるそれらの使用が、報告されている（例えばBraasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; 及び米国特許第5,698,685号; 同第5,166,315号; 同第5,185,444号; 及び同第5,034,506号を参照されたい）。本明細書において使用する用語「モルホリノ」とは、以下の式を有する糖代用物を意味する：

【0333】

【化20】



【0334】

ある特定の実施形態では、例えば上記モルホリノ構造にさまざまな置換基を付加するか、上記モルホリノ構造のさまざまな置換基を改変することによって、モルホリノが修飾されていてもよい。そのような糖代用物を本明細書では「修飾モルホリノ」という。

【0335】

修飾の組み合わせ、例えば限定するわけではないが、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド（開示されている他の5', 2'-ビス置換ヌクレオシドについてはPCT国際出願第WO2008/101157号（公開日2008年8月21日）参照）、及びSによるリボシル環酸素原子の置き換えと2'位におけるさらなる置換（米国特許出願公開US2005-0130923（公開日2005年6月16日）参照）、あるいは二環式核酸の5'-置換（PCT国際出願WO2007/134181（公開日2007年11月22日）参照、この場合は4'-CH₂-O-2'二環式ヌクレオシドの5'位が5'-メチル基または5'-ビニル基でさらに置換されている）なども提供される。炭素環式二環式ヌクレオシド

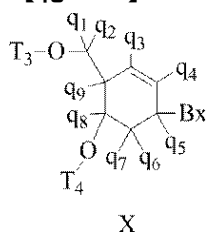
の合成及び調製も、それらのオリゴマー化及び生化学的試験と共に記載されている（例えば、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379を参照のこと）。

【0336】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、天然に存在するヌクレオシド中のペントフラノシル残基の代わりに六員シクロヘキセニルを有するヌクレオシドである修飾シクロヘキセニルヌクレオシドを2つ以上含む。修飾シクロヘキセニルヌクレオシドとして、当技術分野に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない（例えば同一譲受人によるPCT出願公開WO2010/036696（公開日2010年4月10日）、Robeyns et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (6), 1979-1984; Horvath et al., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623; Nauwelaerts et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (30), 9340-9348; Gu et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24 (5-7), 993-998; Nauwelaerts et al., Nucleic Acids Research, 2005, 33 (8), 2452-2463; Robeyns et al., Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61 (6), 585-586; Gu et al., Tetrahedron, 2004, 60 (9), 2111-2123; Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13 (6), 479-489; Wang et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505; Verbeure et al., Nucleic Acids Research, 2001, 29 (24), 4941-4947; Wang et al., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82; Wang et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20 (4-7), 785-788; Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602; PCT出願公開WO06/047842; 及びPCT出願公開WO01/049687を参照されたい; また、各文献の本文は、参照によりそのまま本明細書に組み込まれる）。ある特定の修飾シクロヘキセニルヌクレオシドは、式Xを有する。

【0337】

【化21】



式中、当該少なくとも1つの式Xのシクロヘキセニルヌクレオシド類似体のそれぞれについて、独立して、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

T3及びT4は、それぞれ独立して、シクロヘキセニルヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であるか、またはT3及びT4のうちの一方がテトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、かつT3及びT4のうちの他方がH、ヒドロキシル保護基、連結された共役基、または5'末端基もしくは3'末端基であり、かつ

q1、q2、q3、q4、q5、q6、q7、q8及びq9は、それぞれ独立して、H、C1-C6アルキル、置換C1-C6アルキル、C2-C6アルケニル、置換C2-C

6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、置換 C_2-C_6 アルキニルまたは他の糖置換基である。

【0338】

本明細書にいう「2'-修飾」または「2'-置換」は、2' 位にHまたはOH以外の置換基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。2'-修飾ヌクレオシドには、糖環の2つの炭素原子をつなぐ橋が糖環の2' 炭素ともう一つの炭素とをつないでいる二環式ヌクレオシド；及び非架橋2' 置換基、例えばアリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、 $O-C_1-C_{10}$ アルキル、 $-OCF_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-CH_3$ 、 $2'-O-(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 、または $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ [式中、各 R_m 及び R_n は、独立して、Hまたは置換または無置換 C_1-C_{10} アルキルである] を有するヌクレオシドなどがあるが、これらに限定されない。2'-修飾ヌクレオシドは、例えば糖の他の位置及び／または核酸塩基に、他の修飾をさらに含んでもよい。

10

【0339】

本明細書にいう「2'-F」とは、糖環の2' 位にフルオロ基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0340】

本明細書にいう「2'-OMe」または「2'-OCH₃」または「2'-O-メチル」とは、それぞれ、糖環の2' 位に $-OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0341】

本明細書にいう「MOE」または「2'-MOE」または「2'-OCH₂CH₂OCH₃」または「2'-O-メトキシエチル」とは、それぞれ、糖環の2' 位に $-OCH_2CH_2OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

20

【0342】

本明細書にいう「オリゴヌクレオチド」とは、複数の連結されたヌクレオシドを含む化合物を指す。ある特定の実施形態では、当該複数のヌクレオシドのうちの2つ以上が修飾されている。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、2つ以上のリボヌクレオシド(RNA)及び／またはデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

【0343】

アンチセンス化合物に組み込むためのヌクレオシドの修飾に使用することができるピシクロ糖代用環系及びトリシクロ糖代用環系は、当技術分野では、他にも多数知られている(例えば総説 Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-1954を参照されたい)。そのような環系には、活性を強化するために、さまざまな追加の置換を行うことができる。

30

【0344】

修飾糖の調製方法は当業者にはよく知られている。そのような修飾糖の調製を教示する代表的米国特許の一部には、例えば限定するわけではないが、U.S. 4,981,957; U.S. 5,118,800; U.S. 5,319,080; U.S. 5,359,044; U.S. 5,393,878; U.S. 5,446,137; U.S. 5,466,786; U.S. 5,514,785; U.S. 5,519,134; U.S. 5,567,811; U.S. 5,576,427; U.S. 5,591,722; U.S. 5,597,909; U.S. 5,610,300; U.S. 5,627,053; U.S. 5,639,873; U.S. 5,646,265; U.S. 5,670,633; U.S. 5,700,920; U.S. 5,792,847及びU.S. 6,600,032ならびに2005年12月22日にWO2005/121371として公開された国際出願PCT/US2005/019219(出願日2005年6月2日)などがあり、これらはそれぞれ参照により本明細書にそのまま組み込まれる。

40

【0345】

修飾糖部分を有するヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分(天然、修飾またはそれらの組み合わせ)は、適当な核酸標的とのハイブリダイゼーションのために維持される。

50

【0346】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、修飾糖部分を有する2つ以上のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態では、修飾糖部分が2'-MOEである。ある特定の実施形態では、2'-MOE修飾ヌクレオシドがギャップマーモチーフで配置される。ある特定の実施形態では、修飾糖部分が、(4'-CH(CH₃)-O-2')架橋基を有する二環式ヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、当該(4'-CH(CH₃)-O-2')修飾ヌクレオシドが、ギャップマーモチーフのウイング全体にわたって配置される。

【0347】

共役アンチセンス化合物

ある特定の実施形態において、本開示は、共役アンチセンス化合物を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役アンチセンス化合物を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、細胞を、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役アンチセンス化合物と接触させることを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、細胞を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役アンチセンス化合物と接触させること、及び細胞内の核酸転写産物の量または活性を低減させることを含む方法を提供する。

【0348】

アシアロ糖タンパク質受容体(ASGP-R)は以前に記載されている。例えばPark et al., PNAS vol. 102, No. 47, pp. 17125-17129 (2005)を参照されたい。これらの受容体は、肝臓細胞、特に肝細胞上で発現する。さらに、3つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)リガンドのクラスターを含む化合物は、ASGP-Rに結合して細胞内への当該化合物の取り込みをもたらす能力を有することが示されている。例えばKhorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp. 5216-5231 (May 2008)を参照されたい。したがって、そのようなGalNAcクラスターを含む共役体が、肝臓細胞、具体的には肝細胞への特定化合物の取り込みを促進するために使用されている。例えば、特定のGalNAc含有共役体は、インビボで肝臓細胞における二重鎖siRNA化合物の活性を増加させることが示されている。これらの例では、GalNAc含有共役体は、典型的には、siRNA位二重鎖のセンス鎖に取り付けられる。センス鎖はアンチセンス鎖が最終的に標的核酸とハイブリダイズする前に処分されてしまうため、共役体が活性を妨害する懸念はほとんどない。典型的には、共役体は、siRNAのセンス鎖の3'端に取り付けられる。例えば米国特許第8,106,022号を参照されたい。本明細書に記載する特定の共役基は、今までに記載された共役基よりも活性が高く、かつ／または合成が容易である。

【0349】

本発明のある特定の実施形態において、共役体は、一本鎖アンチセンス化合物、例えば限定するわけではないが、RNase Hベースのアンチセンス化合物や、プレmRNA標的核酸のスプライシングを改変するアンチセンス化合物に、取り付けられる。そのような実施形態では、共役体は、利益(細胞内への取り込みの改良)をもたらすのに十分な時間、アンチセンス化合物に取り付けられた状態にあるべきだが、その後は、切断されるか、または他の何らかの形で、活性に必要な後続ステップ、例えば標的核酸へのハイブリダイゼーション及びRNase Hまたはスプライシングもしくはスプライシング調節に関連する酵素との相互作用などを妨害しないようにすべきである。この性質のバランスは、共役体を単にセンス鎖に取り付けるだけでよいsiRNA化合物の場合よりも、一本鎖アンチセンス化合物の場合に、より一層重要である。本明細書には、共役体を欠く同じアンチセンス化合物と比較して、インビボで肝臓細胞における力価が改良されている共役一本鎖アンチセンス化合物を開示する。これらの化合物に要求される性質のバランスを考えると、そのような力価の改良は驚くべきことである。

【0350】

ある特定の実施形態において、本明細書における共役基は、切断可能部分を含む。機序に束縛されることは望まないが、上述のように、共役体を取り込みの強化をもたらすのに十分な時間、化合物上に残っているべきであることは必然だが、その後は、共役体の何らかの部分、理想的には共役体の全部が切断されて、親化合物（例えばアンチセンス化合物）をその最も活性化形態で放出することが望ましい。ある特定の実施形態では、切断可能部分が切断可能なヌクレオシドである。そのような実施形態では、共役体の残りの部分（クラスター）を、2つ以上の切断可能な結合、例えばホスホジエステル連結部のものによって、ヌクレオシドを介してアンチセンスオリゴヌクレオチドに取り付けることにより、細胞中の内在性ヌクレアーゼを利用する。ある特定の実施形態では、クラスターがホスホジエステル連結部を介して切断可能なヌクレオシドに結合される。ある特定の実施形態では、切断可能なヌクレオシドが、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンス化合物）に取り付けられる。ある特定の実施形態では、共役基が、2つまたは3つの切断可能なヌクレオシドを含みうる。そのような実施形態では、上述の切断可能なヌクレオシドが、切断可能な結合（ホスホジエステル連結部のもの）によって、互いに、アンチセンス化合物に、かつ／またはクラスターに連結される。本明細書における特定の共役体は、切断可能なヌクレオシドを含まず、代わりに切断可能な結合を含む。オリゴヌクレオチドからの共役体の十分な切離は、細胞内で切断を受けやすい少なくとも1つの結合（切断可能な結合）によってもたらされることを示す。

【0351】

ある特定の実施形態では、共役アンチセンス化合物がプロドラッグである。そのようなプロドラッグは、動物に投与され、最終的には、より活性化形態に代謝される。例えば共役アンチセンス化合物は切断されることで、共役体の全部または一部を除去し、共役体の全部または一部を欠く活性化（またはより活性化）形態のアンチセンス化合物をもたらす。

【0352】

ある特定の実施形態では、共役体がオリゴヌクレオチドの5'端に取り付けられる。特定のそのような5'共役体は、同様の共役基が3'端に取り付けられている対応物よりも効率よく切断される。ある特定の実施形態では、活性の改良が切断の改良と相関しうる。ある特定の実施形態では、5'端に共役体を含むオリゴヌクレオチドの有効性が、3'端に共役体を含むオリゴヌクレオチドの有効性よりも高い（例えば実施例56、81、83、及び84を参照のこと）。さらに、5'への取り付けの方が、簡単なオリゴヌクレオチド合成が可能である。オリゴヌクレオチドは、典型的には、3'→5'方向に固体支持体上で合成される。3'共役オリゴヌクレオチドを作製するには、典型的には、事前に共役基を結合しておいた3'ヌクレオシドを固体支持体に取り付けてから、オリゴヌクレオチドを通常どおりに構築する。しかし、その共役ヌクレオシドを固体支持体に取り付ける操作は、合成を複雑にする。さらに、このアプローチを使用した場合、共役体は、オリゴヌクレオチドの合成の間ずっと存在することになり、後続のステップ中に分解されてしまうか、使用できる反応と試薬の種類を制限することになりうる。5'共役オリゴヌクレオチドについて本明細書に記載する構造及び技法を用いることにより、標準的な自動化された技法を使ってオリゴヌクレオチドを合成し、最後（最も5'側）のヌクレオシドと共に共役体を導入するか、またはオリゴヌクレオチドを固体支持体から切り離してから共役体を導入することができる。

【0353】

当分野の技術水準及び本開示を考慮すれば、当業者は、本明細書の共役体及び共役オリゴヌクレオチドをどれでも容易に作製することができる。さらに、本明細書に開示するある特定のそのような共役体及び共役オリゴヌクレオチドの合成は、これまでに開示されていた共役体の合成よりも容易であり、かつ／または必要とするステップ数が少なく、それゆえに安価に行うことができるので、それらは製造上の利点になる。例えば、特定の共役基の合成は、これまでに記載された共役基と比較して、より少ない合成ステップから成り、収率の増加をもたらす。実施例46のGalNAc3-10及び実施例48のGalNAc3-7などの共役基は、既述の共役体、例えば、より多くの化学中間体の組み立てを

必要とするU.S. 8, 106, 022またはU.S. 7, 262, 177に記載されているものよりも、はるかに簡単である。したがって、本明細書に記載するこれらの共役体及び他の共役体には、一本鎖オリゴヌクレオチドや二本鎖オリゴヌクレオチド（例えばs iRNA）のどちらかの鎖などといった任意のオリゴヌクレオチドと一緒に使用する際に、既述の化合物に優る利点がある。

【0354】

同様に、GalNAcリガンドを1つまたは2つしか持たない共役基も、本明細書に開示する。ここに示すように、そのような共役基は、アンチセンス化合物の活性を改良する。そのような化合物は、3つのGalNAcリガンドを含む共役体よりも、調製がはるかに容易である。1つまたは2つのGalNAcリガンドを含む共役基は、一本鎖オリゴヌクレオチドや二本鎖オリゴヌクレオチド（例えばs iRNA）のどちらかの鎖などといった任意のアンチセンス化合物に取り付けることができる。

10

【0355】

ある特定の実施形態では、本明細書の共役体が、耐受性の特定尺度を、実質的に変化させない。例えば、共役アンチセンス化合物の免疫原性は非共役親化合物より高くないことを、本明細書において示す。力価が改良されるので、耐受性が同じままである実施形態は（あるいは実際には力価の増加分と比較して耐受性が少しだけ悪化したとしても）、治療に関して改良された性質を有する。

【0356】

ある特定の実施形態では、共役により、共役がなければ結果があまり思わしくないような方法で、アンチセンス化合物を改変することが可能になる。例えば、ある特定の実施形態では、全ホスホロチオエートアンチセンス化合物の2つ以上のホスホロチオエート連結部を、ホスホジエステル連結基で置き換えることにより、一部の耐受性尺度の改良が起こる。例えば、ある特定の事例では、2つ以上のホスホジエステルを有するそのようなアンチセンス化合物は、各連結部がホスホロチオエートである同じ化合物よりも、免疫原性が低い。しかし、ある特定の事例では、実施例26に示すように、2つ以上のホスホロチオエート連結部をホスホジエステル連結部で置き換えると、細胞取り込みの低減及び／または力価の損失も起こる。ある特定の実施形態において、本明細書に記載する共役アンチセンス化合物は、共役全ホスホロチオエート対応物と比較して、取り込み及び力価をほとんどまたは全く失うことなく、そのような連結部の改変を許容する。事実、ある特定の実施形態では、例えば実施例44、57、59、及び86では、共役体と少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部とを含むオリゴヌクレオチドが、同様に同じ共役体を含む全ホスホロチオエート対応物と比較した場合でさえ、実際に、インビボで力価の増加を呈する。さらに、共役が取り込み／力価の実質的な増加をもたらすので、その実質的な増加分が少し失われても、耐受性の改良を達成するという目的には、許容できる。したがって、ある特定の実施形態では、共役アンチセンス化合物が、少なくとも1つのホスホジエステル連結部を含む。

20

30

【0357】

ある特定の実施形態では、本明細書におけるアンチセンス化合物の共役が、肝細胞における送達、取り込み、及び活性の増加をもたらす。したがって、より多くの化合物が肝臓組織に送達される。しかし、ある特定の実施形態では、そのような送達の増加だけでは、活性の増加全体を説明できない。特定のそのような実施形態では、より多くの化合物が肝細胞に進入する。ある特定の実施形態では、そのような肝細胞取り込みの増加でも、活性の増加全体を説明することができない。そのような実施形態では、共役化合物の生産的取り込みが増加する。例えば、実施例102に示すように、GalNAc含有共役体の特定実施形態は、非実質細胞との対比で肝細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃縮を増加させる。この濃縮は、肝細胞中で発現する遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドにとって有益である。

40

【0358】

ある特定の実施形態では、本明細書における共役アンチセンス化合物が、腎臓

50

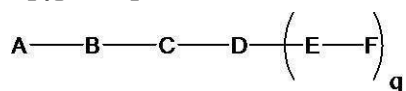
曝露の低減をもたらす。例えば、実施例 20 に示すように、G a l N A c 含有共役体の特定実施形態を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、腎臓では、G a l N A c 含有共役体を欠くアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度より低い。これは、いくつかの有益な治療的意味を有する。腎臓における活性が求められていない治療的適応の場合、腎臓への曝露には、腎毒性のリスクがあり、それに見合う利益がない。さらに、腎臓における高濃度は、典型的には、尿への化合物の損失をもたらし、その結果、クリアランスが速くなる。したがって、標的が腎臓でない場合、腎臓内での蓄積は望ましくない。

【0359】

ある特定の実施形態において、本開示は、式：

【0360】

【化22】



【式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

B は、切断可能部分であり、

C は、共役リンカーであり、

D は、分岐基であり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、かつ

q は、1～5の整数である]

によって表される共役アンチセンス化合物を提供する。

【0361】

本明細書における上記の図及び同様の図において、分岐基「D」は、「q」で示される数の (E-F) 基に対応するのに必要な数だけ分岐している。したがって、q = 1 の場合、当該の式は、

【0362】

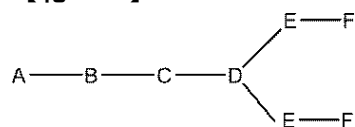
【化23】



であり、q = 2 の場合、当該の式は、

【0363】

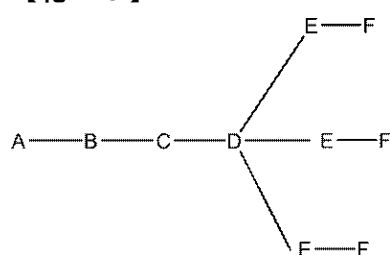
【化24】



であり、q = 3 の場合、当該の式は

【0364】

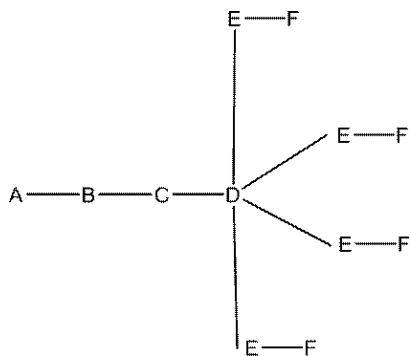
【化25】



であり、q = 4 の場合、当該の式は

【0365】

【化 2 6】

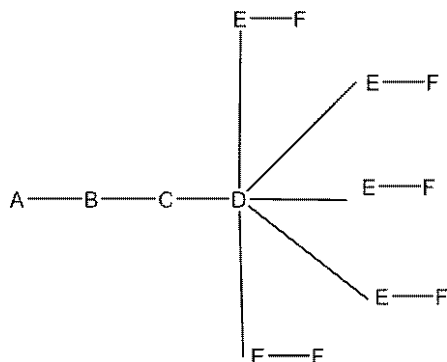


10

であり、 $q = 5$ の場合、当該の式は

【 0 3 6 6】

【化 2 7】



20

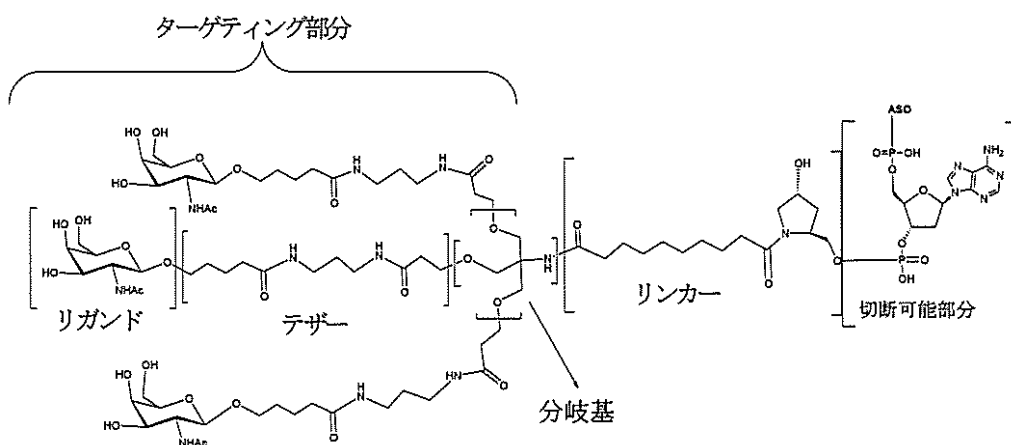
である。

【 0 3 6 7】

ある特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【 0 3 6 8】

【化 2 8】



30

40

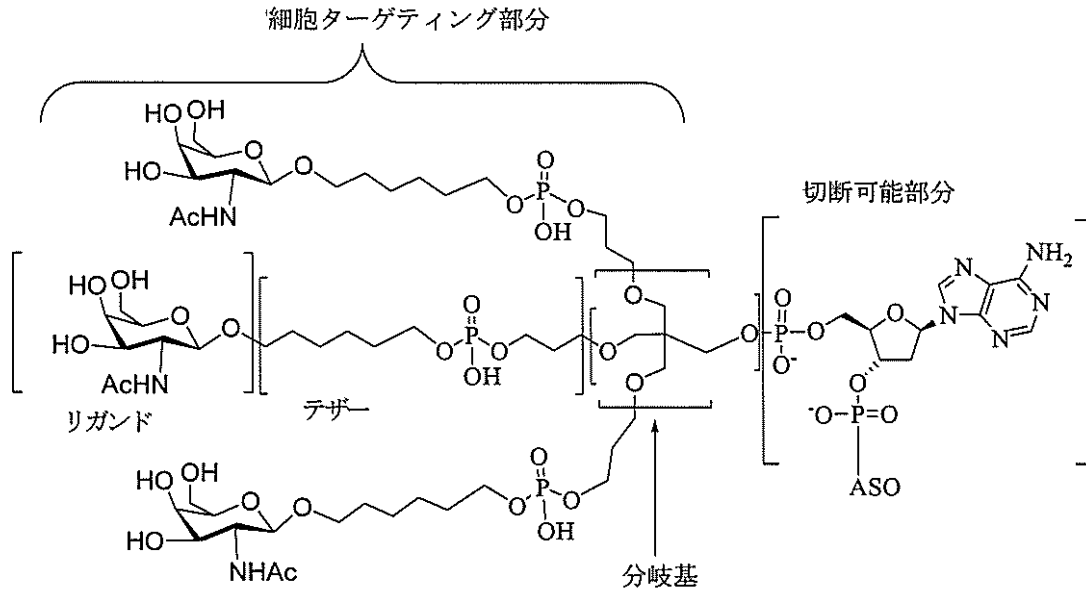
【 0 3 6 9】

ある特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【 0 3 7 0】

50

【化 2 9】



10

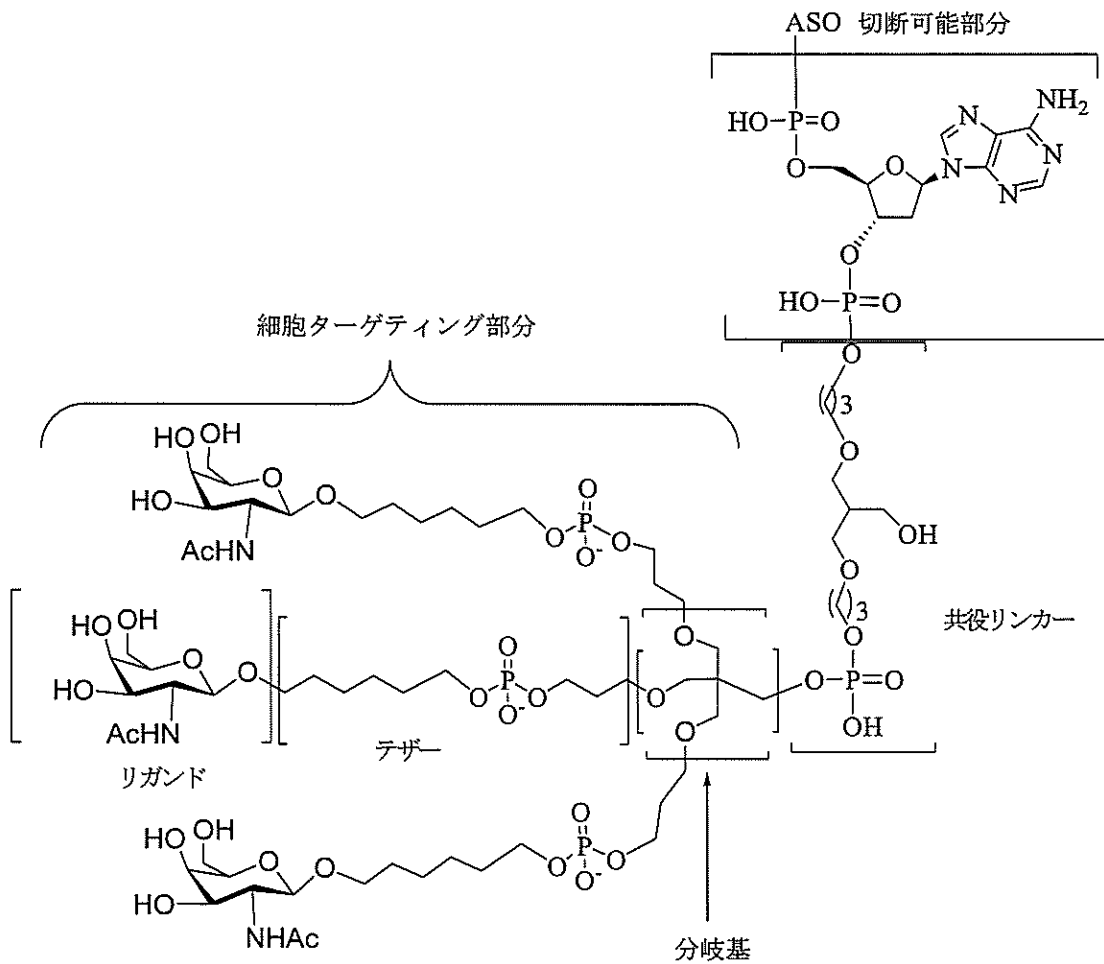
【 0 3 7 1】

ある特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

20

【 0 3 7 2】

【化 3 0】



30

40

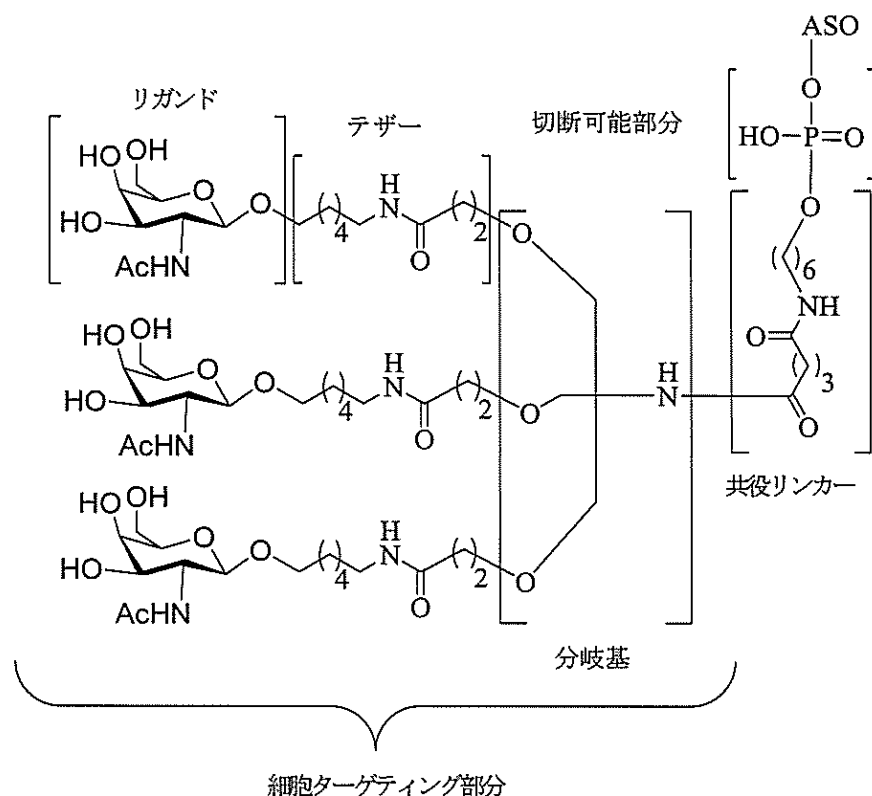
【 0 3 7 3】

ある特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

50

【0374】

【化31】



10

20

【0375】

ある特定変数を2つ以上（例えば2つ以上の「m」または2つ以上の「n」を）有する実施形態では、別段の表示がある場合を除き、そのような特定変数のそれぞれは、独立して選択される。したがって、2つ以上のnを有する構造の場合、各nは独立して選択されるため、それらは互いに同一である場合も、同一でない場合もありうる。

【0376】

i. ある特定の切断可能部分

ある特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能な結合である。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能な結合を含む。ある特定の実施形態において、共役基は、切断可能部分を含む。ある特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合する。ある特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、細胞ターゲティング部分に直接結合する。ある特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、共役リンカーに結合する。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスフェートまたはホスホジエステルを含む。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能なヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体である。ある特定の実施形態において、ヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体は、プリン、置換プリン、ピリミジン、または置換ピリミジンから選択される場合によっては保護された複素環式塩基を含む。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、ウラシル、チミン、シトシン、4-N-ベンゾイルシトシン、5-メチルシトシン、4-N-ベンゾイル-5-メチルシトシン、アデニン、6-N-ベンゾイルアデニン、グアニン、及び2-N-イソブチルグアニンから選択される、場合によっては保護された複素環式塩基を含むヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステルまたはホスホロチオエート連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステルまた

30

40

50

はホスホロチオエート連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシアデノシンである。ある特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステル連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシアデノシンである。

【0377】

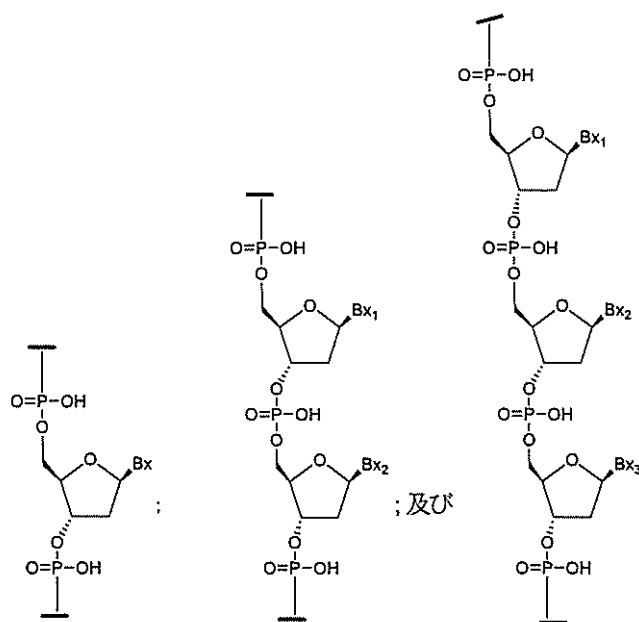
ある特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位に取り付けられる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの2'位に取り付けられる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドに取り付けられる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部またはホスホロチオエート連結部のいずれかによってリンカーに取り付けられる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部によってリンカーに取り付けられる。ある特定の実施形態において、共役基は、切断可能部分を含まない。

【0378】

ある特定の実施形態において、切断可能部分は、複合体が動物に投与された後に、標的細胞によって内部に取り込まれて初めて切断される。細胞内で切断可能部分が切断され、それによって活性アンチセンスオリゴヌクレオチドが放出される。理論に束縛されることは望まないが、切断可能部分は細胞内で2つ以上のヌクレアーゼによって切断されると考えられる。ある特定の実施形態では、2つ以上のヌクレアーゼが切断可能部分とリンカーとの間のホスホジエステル連結部を切断する。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0379】

【化32】



のなかから選択される構造を有し、式中、 Bx 、 Bx_1 、 Bx_2 、及び Bx_3 のそれぞれは、独立して複素環式塩基部分である。ある特定の実施形態において、切断可能部分は以下のなかから選択される構造を有する。

【0380】

10

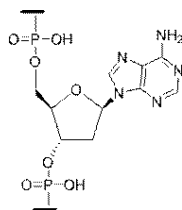
20

30

40

50

【化 3 3】



【0381】

i i . ある特定のリンカー

ある特定の実施形態において、共役基は、リンカーを含む。ある特定のそのような実施形態において、リンカーは、切断可能部分に共有結合される。ある特定のそのような実施形態において、リンカーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合される。ある特定の実施形態において、リンカーは、細胞ターゲティング部分に共有結合される。ある特定の実施形態において、リンカーは、固体支持体への共有結合をさらに含む。ある特定の実施形態において、リンカーは、タンパク質結合部分への共有結合をさらに含む。ある特定の実施形態において、リンカーは、固体支持体への共有結合をさらに含み、タンパク質結合部分への共有結合もさらに含む。ある特定の実施形態において、リンカーは、係留される (tethered) リガンドを取り付けるための位置を複数含んでいる。ある特定の実施形態において、リンカーは、係留されるリガンドを取り付けるための位置を複数含み、分岐基には取り付けられない。ある特定の実施形態において、リンカーは、2つ以上の切断可能な結合をさらに含む。ある特定の実施形態において、共役基は、リンカーを含まない。

【0382】

ある特定の実施形態において、リンカーは、アルキル、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル (—S—)、及びヒドロキシシルアミノ (—O—N(H)—) 基から選択される基を含む線状基を少なくとも1つは含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、少なくとも1つのリン連結基を含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、少なくとも1つのホスホジエステル基を含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、少なくとも1つの中性連結基を含む。ある特定の実施形態において、当該線状基は、細胞ターゲティング部分及び切断可能部分に共有結合される。ある特定の実施形態において、当該線状基は、細胞ターゲティング部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合される。ある特定の実施形態において、当該線状基は、細胞ターゲティング部分、切断可能部分、及び固体支持体に共有結合される。ある特定の実施形態において、当該線状基は、細胞ターゲティング部分、切断可能部分、固体支持体、及びタンパク質結合部分に共有結合される。ある特定の実施形態において、当該線状基は、2つ以上の切断可能な結合を含む。

【0383】

ある特定の実施形態において、リンカーは、足場基に共有結合された線状基を含む。ある特定の実施形態において、当該足場は、アルキル、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル、及びヒドロキシシルアミノ基から選択される基を含む分岐状脂肪族基を含む。ある特定の実施形態において、当該足場は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む分岐状脂肪族基を含む。ある特定の実施形態において、当該足場は、少なくとも1つの単環式または多環式環系を含む。ある特定の実施形態において、当該足場は、少なくとも2つの単環式または多環式環系を含む。ある特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は切断可能部分及びリンカーに共有結合される。ある特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、及び固体支持体に共有結合される。ある特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、及びタンパク質

結合部分に共有結合される。ある特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、タンパク質結合部分、及び固体支持体に共有結合される。ある特定の実施形態において、当該足場基は2つ以上の切断可能な結合を含む。

【0384】

ある特定の実施形態において、リンカーは、タンパク質結合部分を含む。ある特定の実施形態において、タンパク質結合部分は脂質、例えば限定するわけではないが、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、ビタミン(例えば葉酸塩、ビタミンA、ビタミンE、ピオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物(例えば単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム溶解成分、ステロイド(例えばウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン)、テルペン(例えばトリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、またはカチオン性脂質を含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、タンパク質結合部分は、C16~C22長鎖飽和もしくは不飽和脂肪酸、コレステロール、コール酸、ビタミンE、アダマンタン、または1-ペンタフルオロプロピルである。

10

【0385】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

20

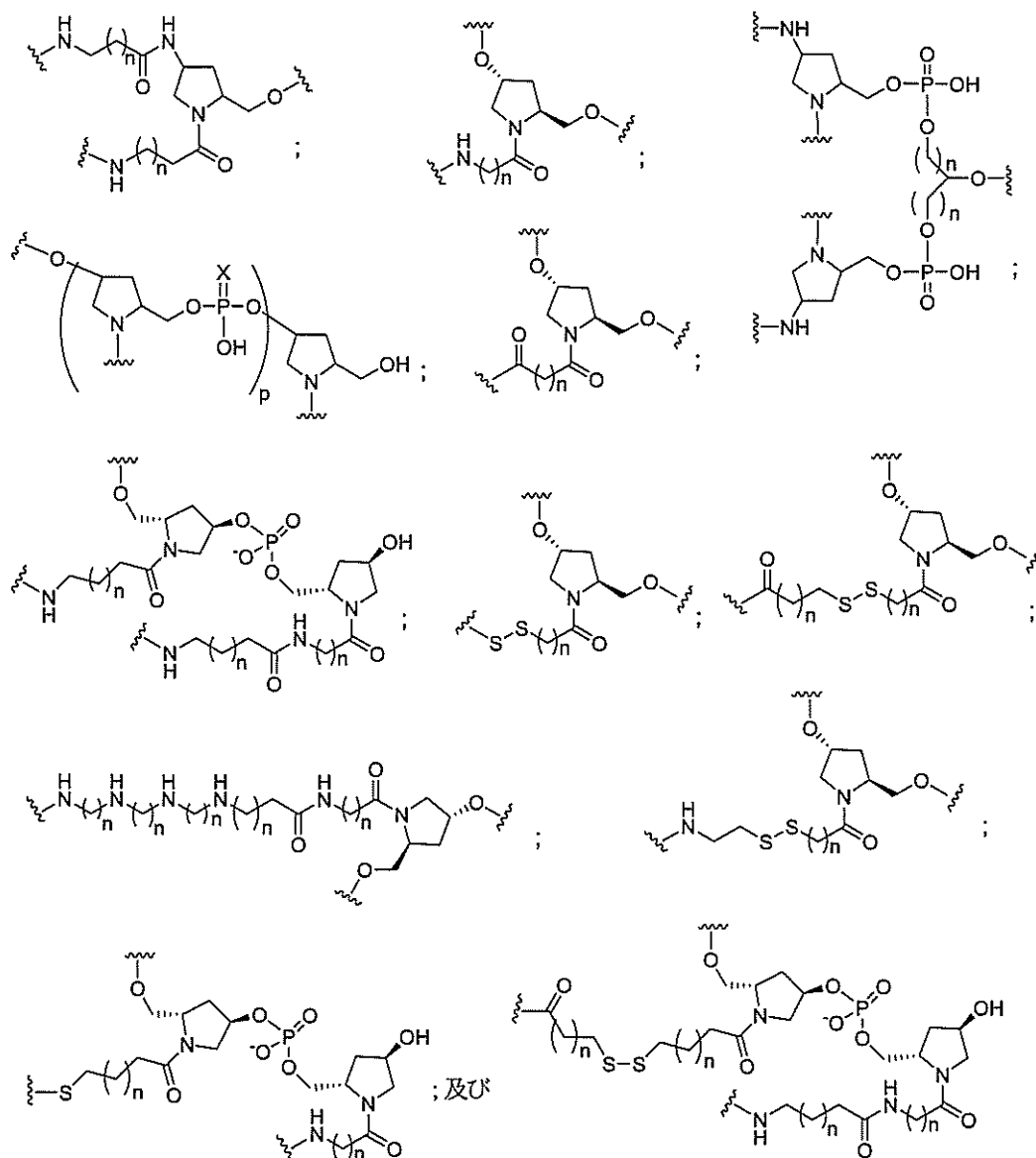
【0386】

30

40

50

【化 3 4】



式中、各 n は、独立して、1～20であり、 p は、1～6である。

【0387】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0388】

10

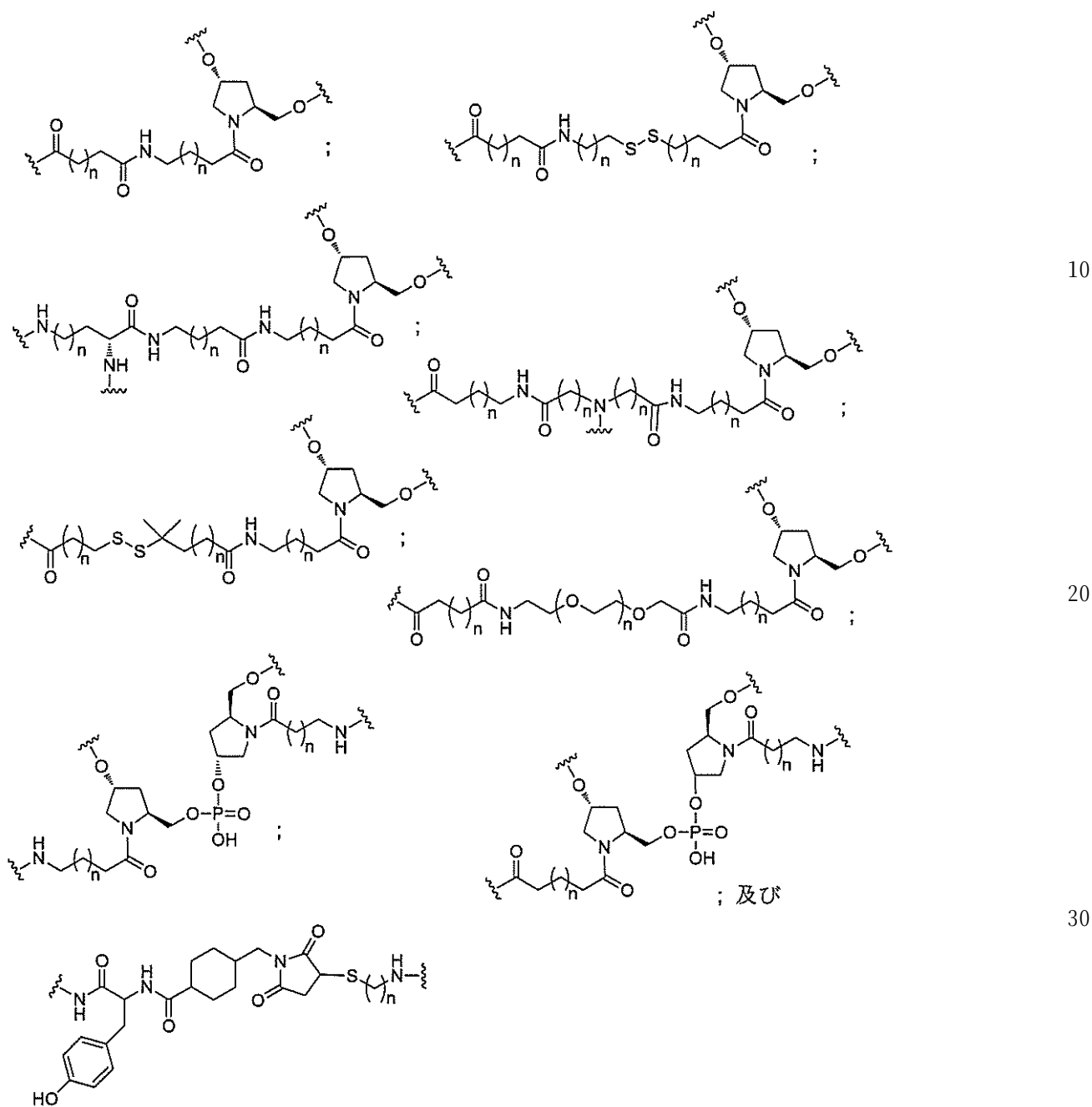
20

30

40

50

【化 3 5】



式中、各 n は、独立して、1～20である。

【0389】

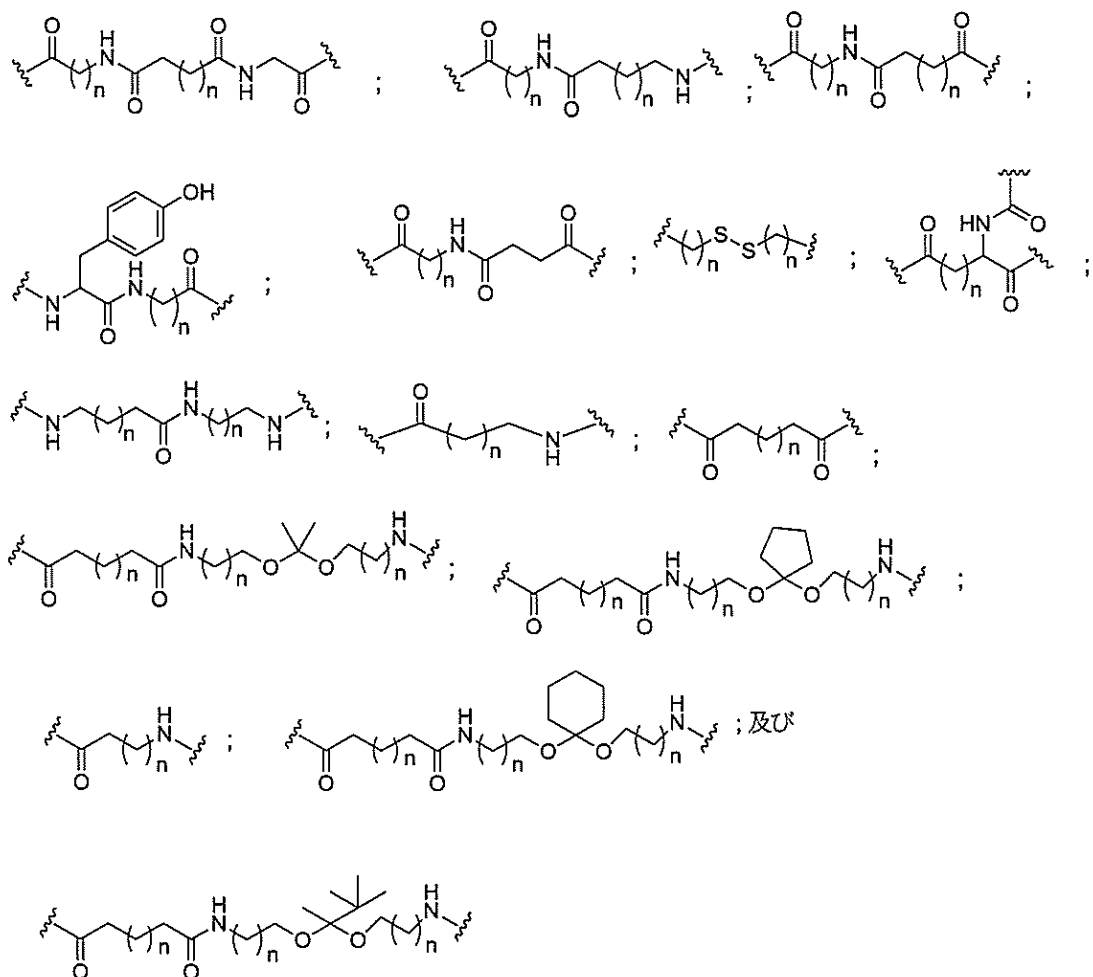
ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0390】

40

50

【化 3 6】

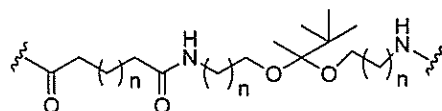


式中、 n は、1 ~ 20 である。

【0391】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0392】



10

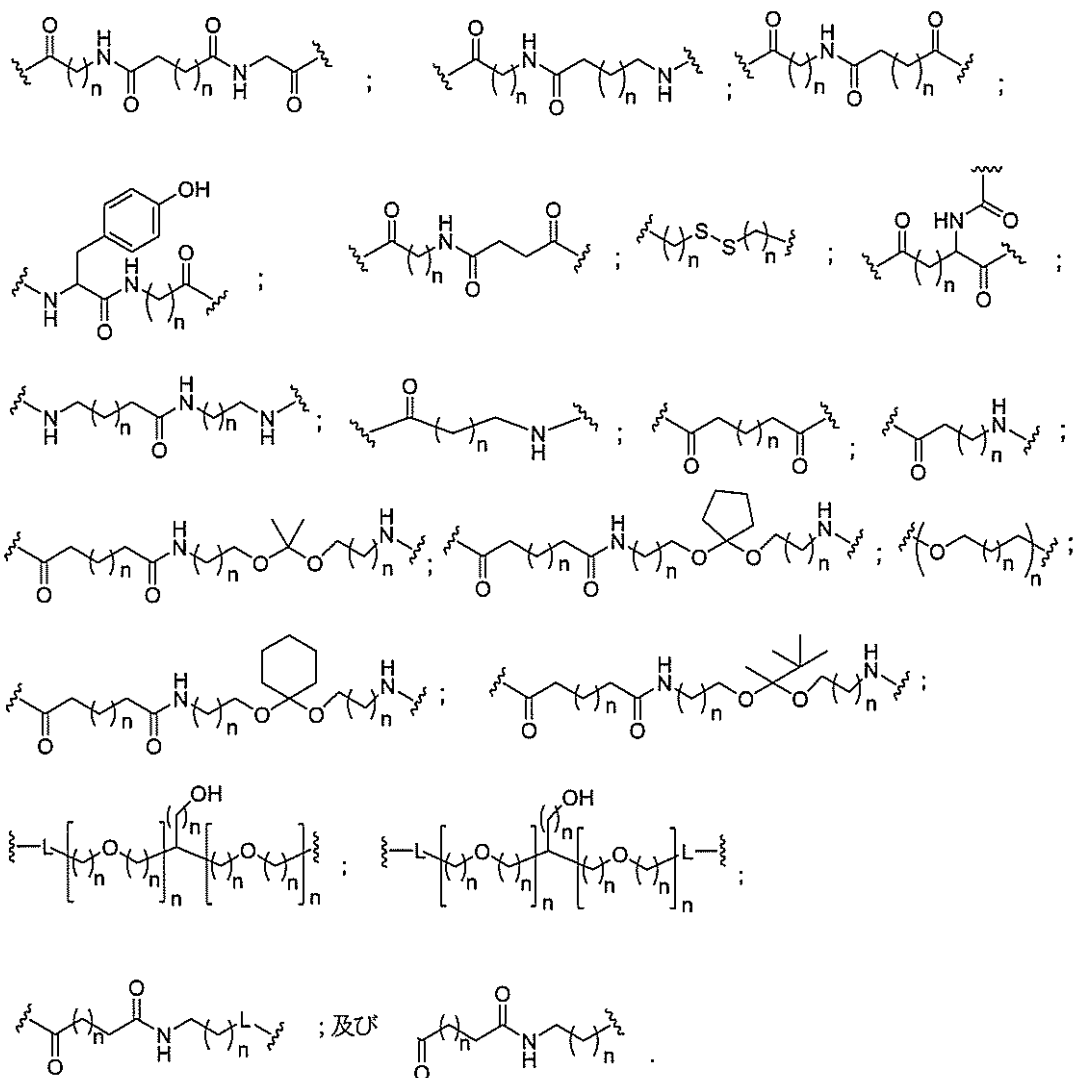
20

30

40

50

【化 3 7】



10

20

30

式中、各Lは、独立して、リン連結基または中性連結基であり、
各nは、独立して、1～20である。

【0393】

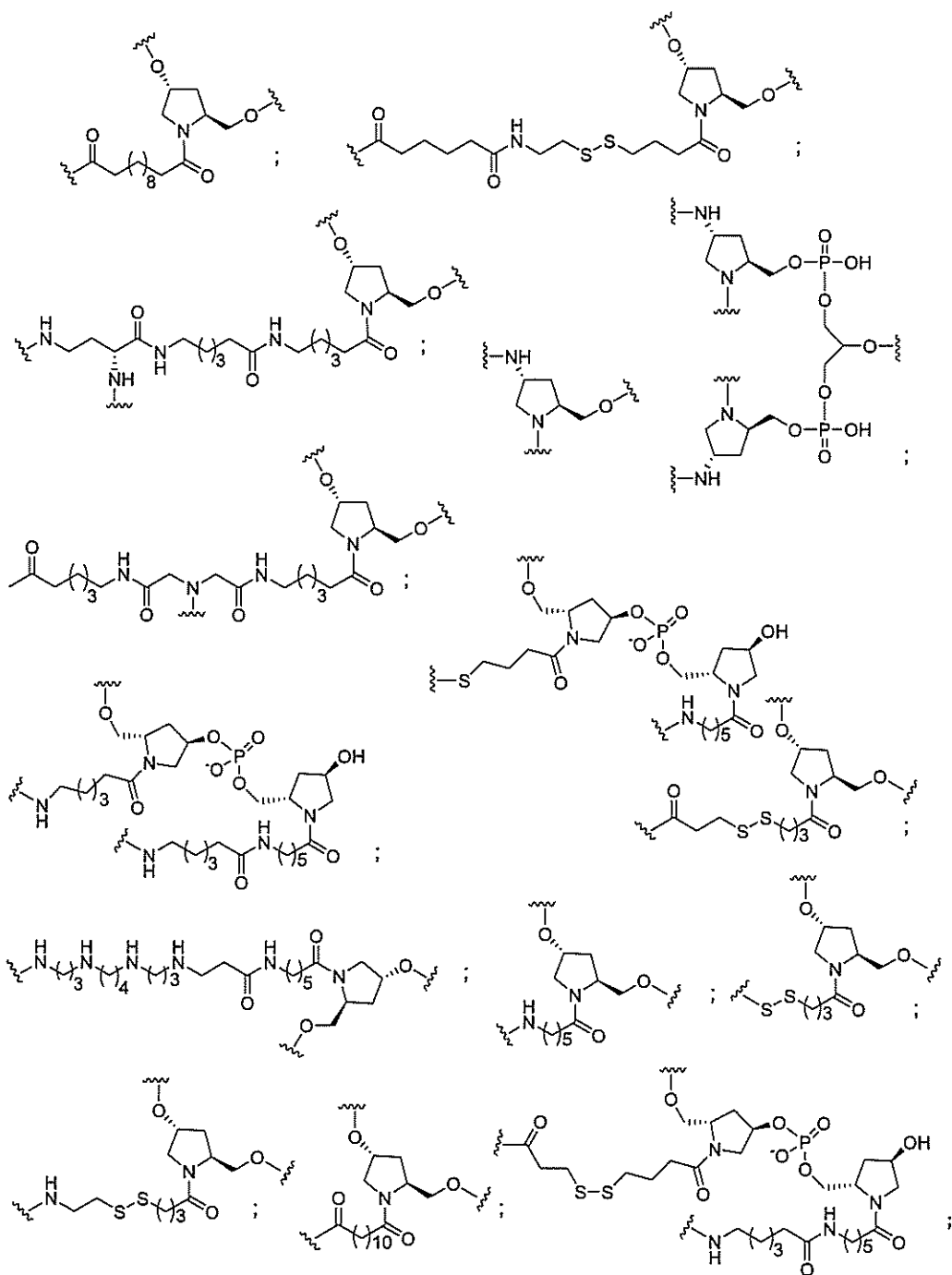
ある特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0394】

40

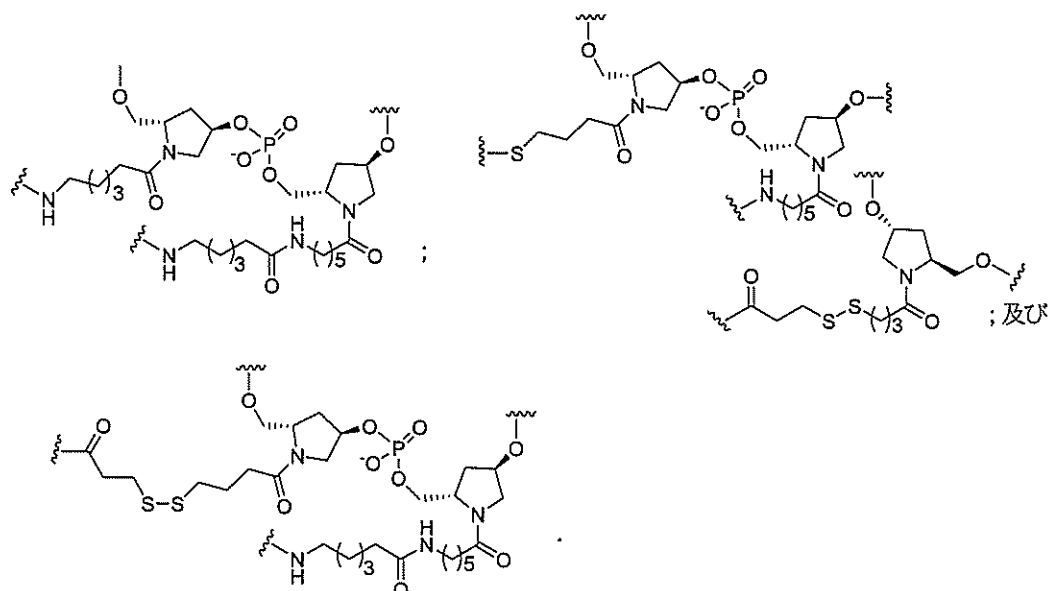
50

【化 3 8】



【 0 3 9 5】

【化 3 9】



10

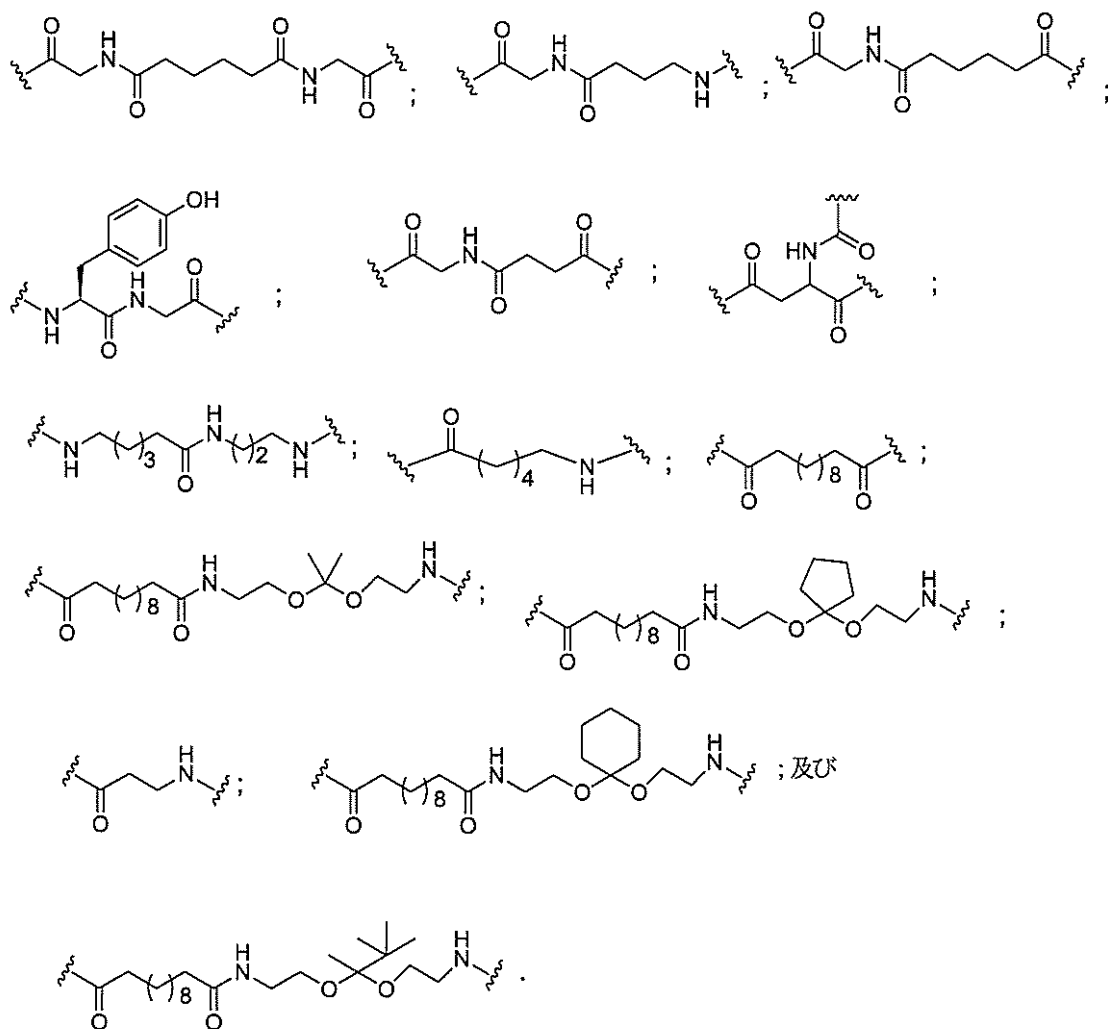
【 0 3 9 6】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

20

【 0 3 9 7】

【化 4 0】



30

40

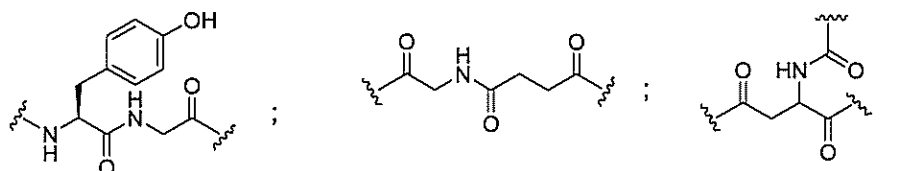
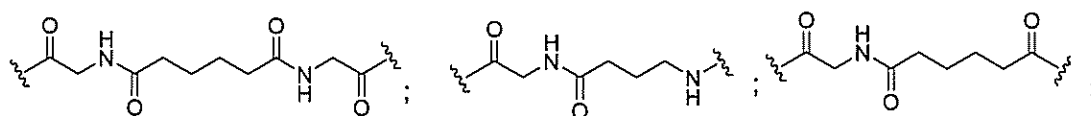
50

【0398】

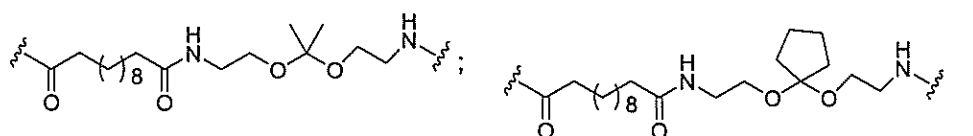
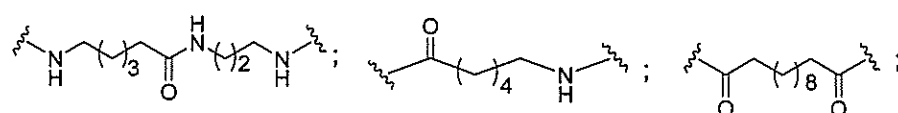
ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

【0399】

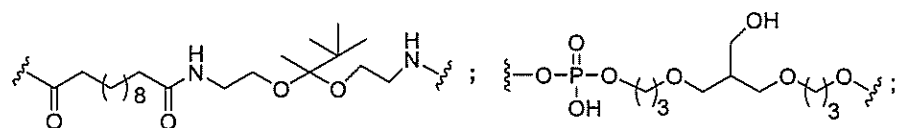
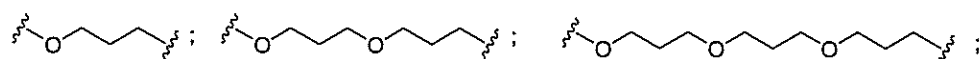
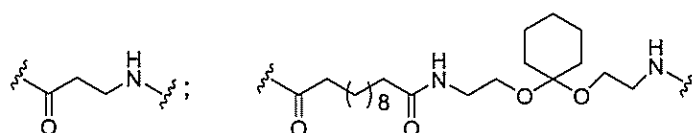
【化41】



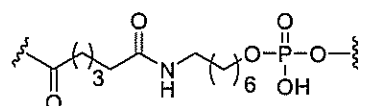
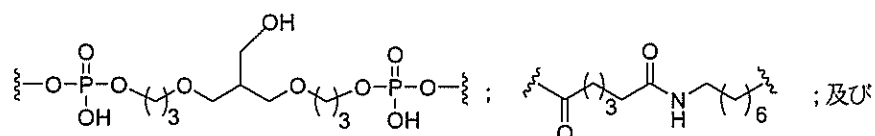
10



20



30



40

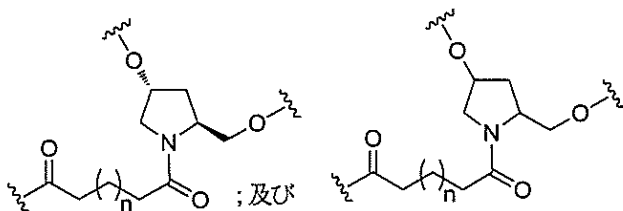
【0400】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0401】

50

【化 4 2】



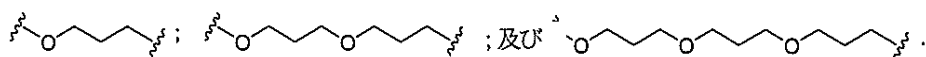
式中、n は、1 ～ 20 である。

【0 4 0 2】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 0 3】

【化 4 3】

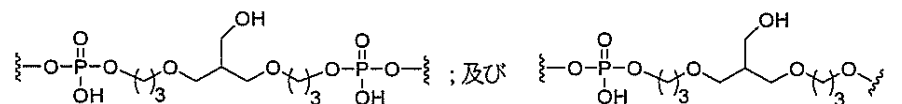


【0 4 0 4】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 0 5】

【化 4 4】

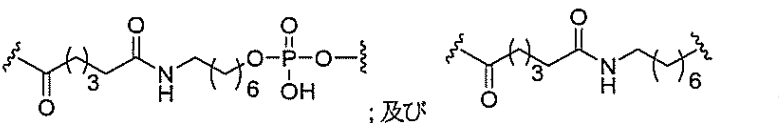


【0 4 0 6】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 0 7】

【化 4 5】

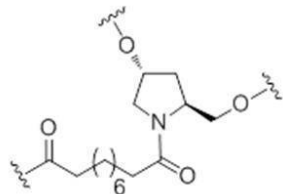


【0 4 0 8】

ある特定の実施形態において、共役リンカーは以下の構造を有する。

【0 4 0 9】

【化 4 6】

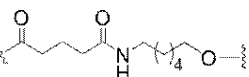


【0 4 1 0】

ある特定の実施形態において、共役リンカーは以下の構造を有する。

【0 4 1 1】

【化 4 7】



10

20

30

40

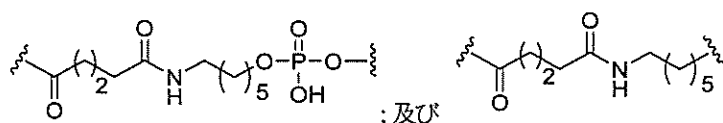
50

【0412】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する。

【0413】

【化48】



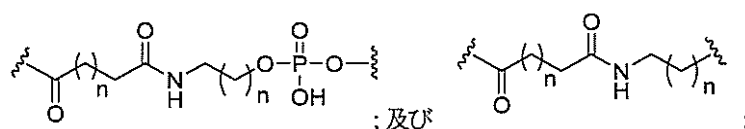
10

【0414】

ある特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0415】

【化49】



式中、各nは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または7である。

20

【0416】

i i i . ある特定の細胞ターゲティング部分

ある特定の実施形態において、共役基は、細胞ターゲティング部分を含む。ある特定のそのような細胞ターゲティング部分は、アンチセンス化合物の細胞取り込みを増加させる。ある特定の実施形態において、細胞ターゲティング部分は、分岐基、2つ以上のテザー、及び2つ以上のリガンドを含む。ある特定の実施形態において、細胞ターゲティング部分は、分岐基、2つ以上のテザー、2つ以上のリガンド、及び2つ以上の切断可能な結合を含む。

【0417】

1. ある特定の分岐基

30

ある特定の実施形態において、共役基は、分岐基及び少なくとも2つのテザーリガンドを含むターゲティング部分を含む。ある特定の実施形態において、分岐基は、共役リンカーを結合する。ある特定の実施形態において、分岐基は、切断可能部分を結合する。ある特定の実施形態において、分岐基は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを結合する。ある特定の実施形態において、分岐基は、リンカー及びテザーリガンドのそれぞれに共有結合される。ある特定の実施形態において、分岐基は、アルキル、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル及びヒドロキシルアミノ基から選択される基を含む分岐状脂肪族基を含む。ある特定の実施形態において、分岐基は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、分岐基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。ある特定の実施形態において、分岐基は、単環式または多環式環系を含む。ある特定の実施形態において、分岐基は、2つ以上の切断可能な結合を含む。ある特定の実施形態において、共役基は、分岐基を含まない。

40

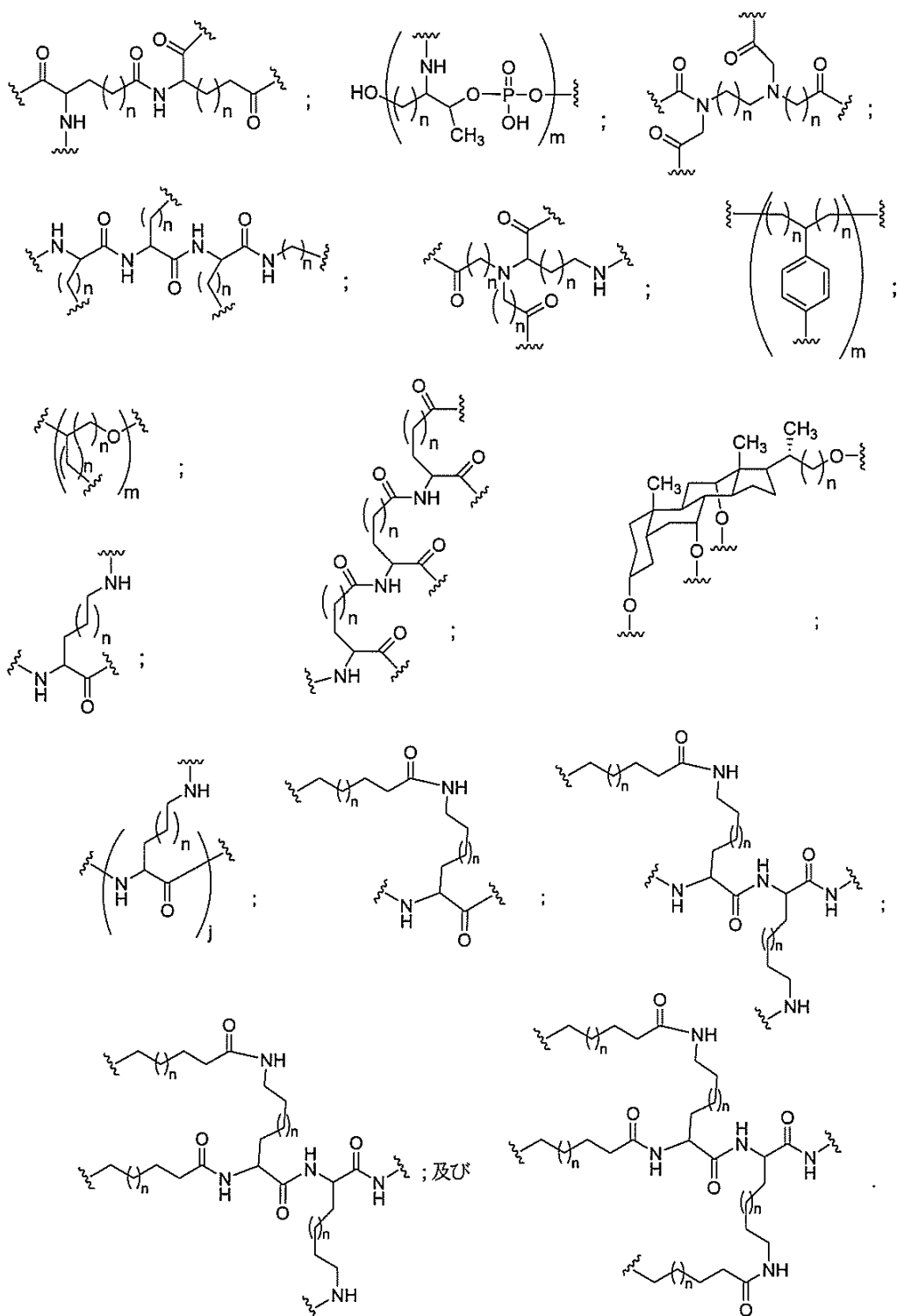
【0418】

ある特定の実施形態では、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0419】

50

【化 5 0】



10

20

30

40

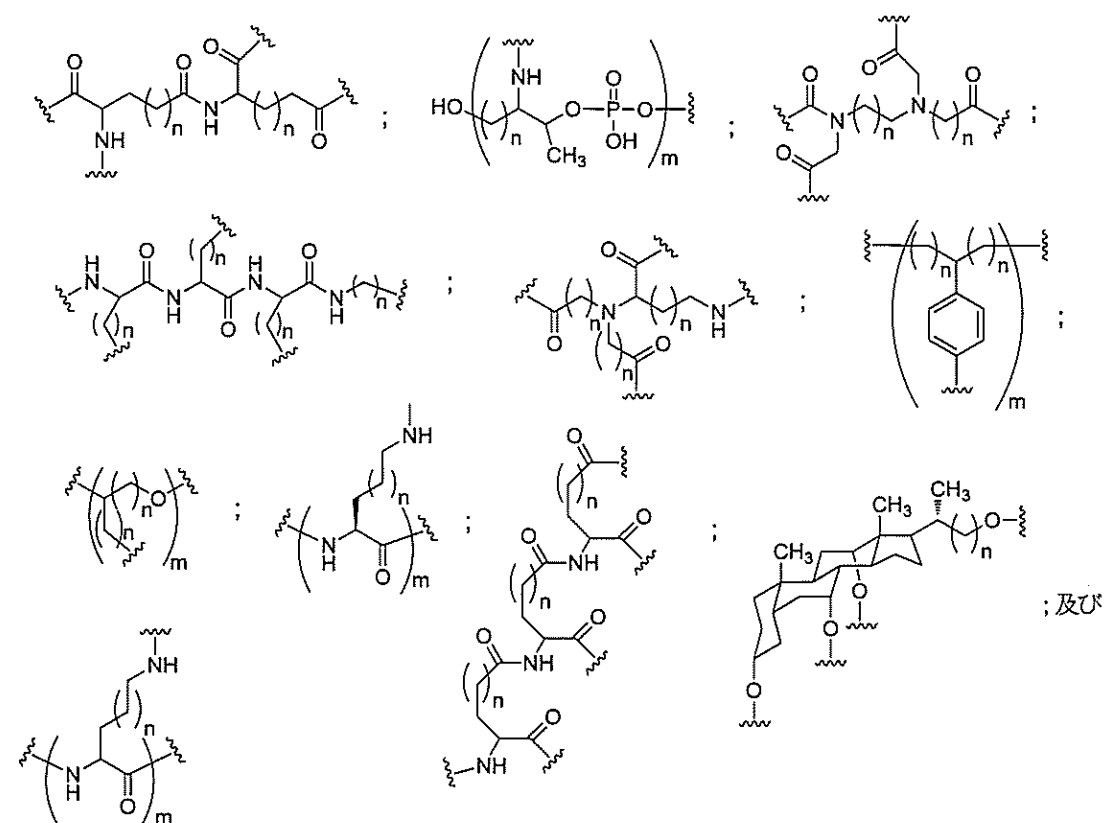
式中、各 n は、独立して、1～20であり、
 j は、1～3であり、
 m は、2～6である。

【0420】

ある特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0421】

【化 5 1】



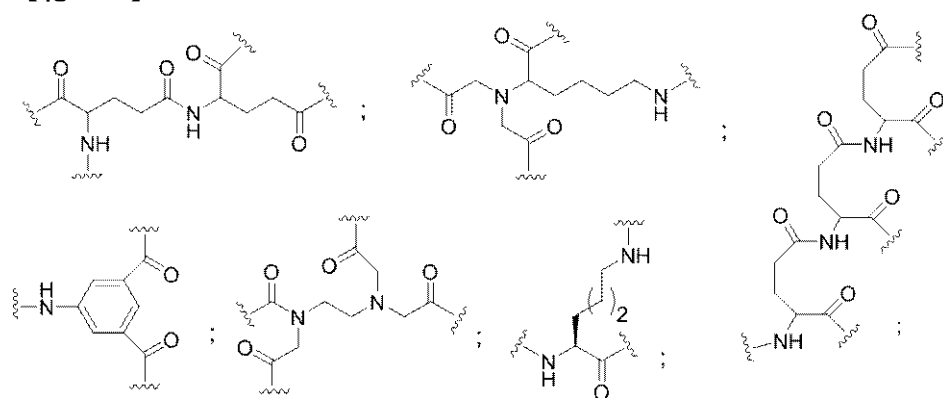
各 n は、独立して、 $1 \sim 20$ であり、 m は、 $2 \sim 6$ である。

【 0 4 2 2 】

ある特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有する。

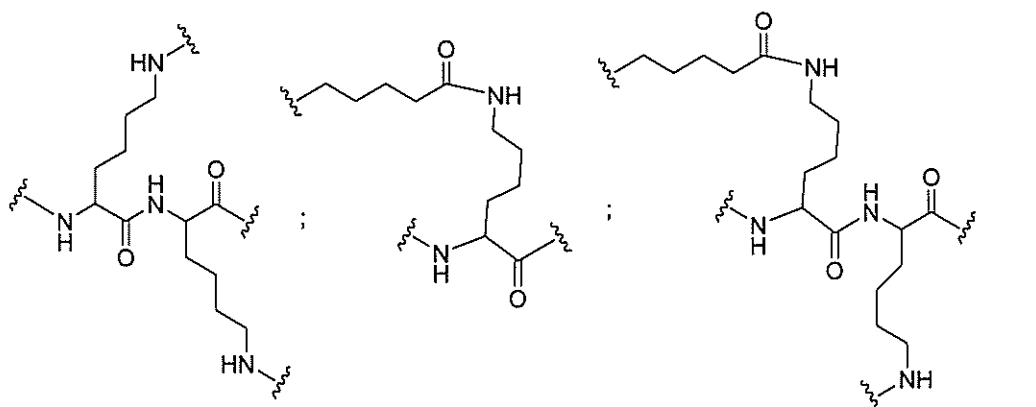
【 0 4 2 3 】

【化 5 2】

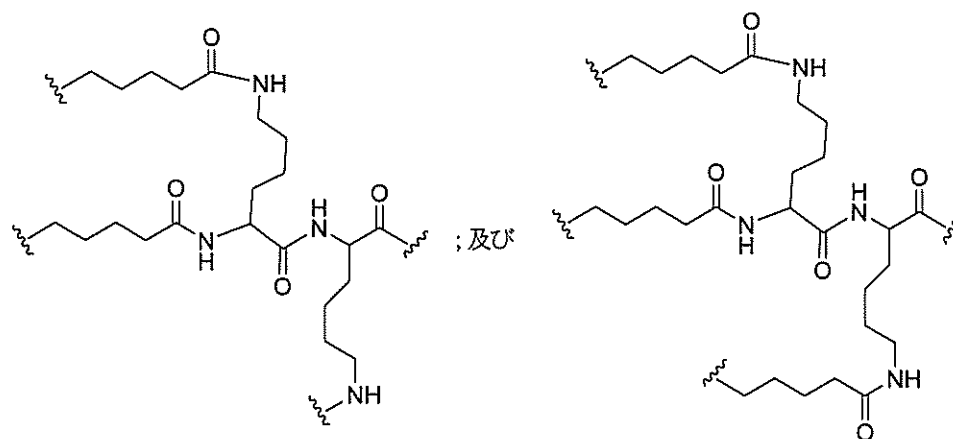


【 0 4 2 4 】

【化 5 3】



10



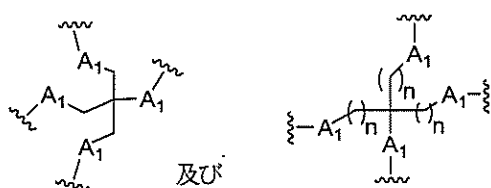
20

【 0 4 2 5】

ある特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 2 6】

【化 5 4】



30

式中、各 A₁ は、独立して、O、S、C=O、または NH であり、

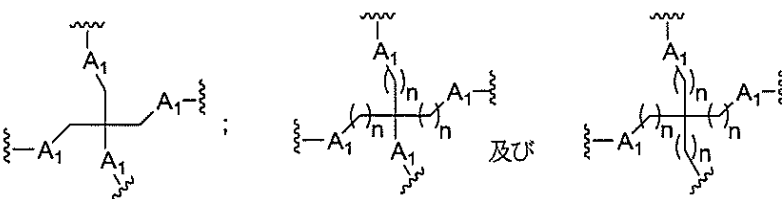
各 n は、独立して、1～20 である。

【 0 4 2 7】

ある特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 2 8】

【化 5 5】



40

式中、各 A₁ は、独立して、O、S、C=O、または NH であり、

各 n は、独立して、1～20 である。

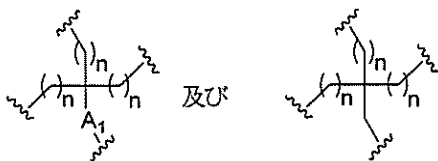
50

【0429】

ある特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0430】

【化56】



式中、 A_1 は、O、S、C=O、またはNHであり、
各 n は、独立して、1～20である。

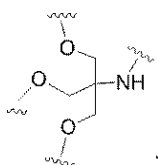
10

【0431】

ある特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0432】

【化57】



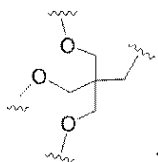
20

【0433】

ある特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0434】

【化58】

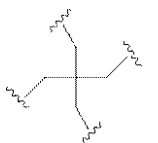


【0435】

ある特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0436】

【化59】



【0437】

2. ある特定のテザー

40

ある特定の実施形態において、共役基は、分岐基に共有結合される2つ以上のテザーを含む。ある特定の実施形態において、共役基は、連結基に共有結合される2つ以上のテザーを含む。ある特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、及びポリエチレングリコール基から選択される2つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、置換アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、ホスホジエステル及びポリエチレングリコール基から選択される2つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、エーテル、及びアミド基から選択される2つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、置換アルキル、ホスホ

50

ジエステル、エーテル、及びアミド基から選択される２つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、アルキル及びホスホジエステルから選択される２つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。ある特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも１つのリン連結基または中性連結基を含む。

【０４３８】

ある特定の実施形態において、テザーは、２つ以上の切断可能な結合を含む。ある特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介して分岐基に結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、ホスホジエステル基を介して分岐基に結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、リン連結基または中性連結基を介して分岐基に結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介して分岐基に結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介してリガンドに結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介してリガンドに結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介してリガンドに結合される。ある特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介してリガンドに結合される。

【０４３９】

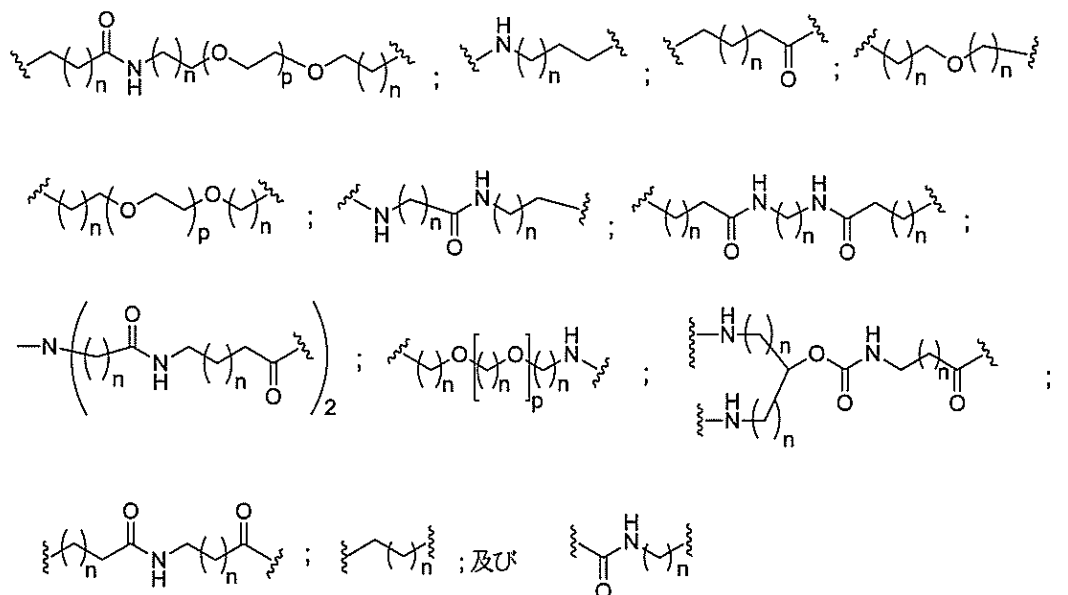
ある特定の実施形態において、各テザーは、リガンドと分岐基との間に約８～約２０原子の鎖長を含む。ある特定の実施形態において、各テザー基は、リガンドと分岐基との間に約１０～約１８原子の鎖長を含む。ある特定の実施形態において、各テザー基は、約１３原子の鎖長を含む。

【０４４０】

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【０４４１】

【化６０】



各 n は、独立して、１～２０であり、

各 p は、１～約６である。

【０４４２】

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【０４４３】

10

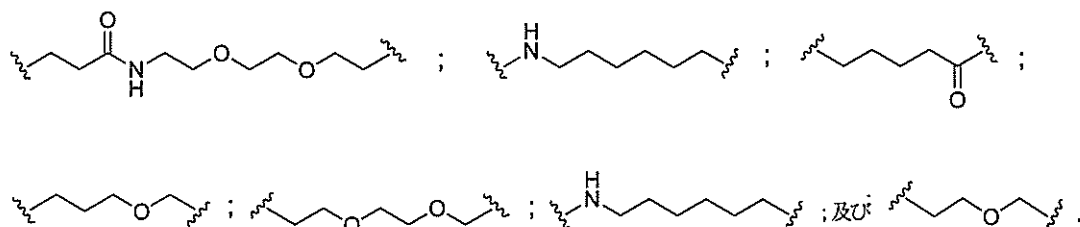
20

30

40

50

【化 6 1】



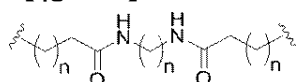
【 0 4 4 4】

10

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 4 5】

【化 6 2】



式中、各 n は、独立して、1～20である。

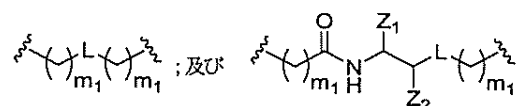
【 0 4 4 6】

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 4 7】

20

【化 6 3】



式中、 L は、リン連結基または中性連結基のいずれかであり、

Z_1 は、 $C(=O)OR_2$ であり、

Z_2 は、 H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R_2 は H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

各 m_1 は独立して 0～20 であり、各テザーにつき少なくとも 1 つの m_1 は 0 よりも大きい。

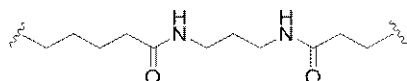
30

【 0 4 4 8】

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 4 9】

【化 6 4】



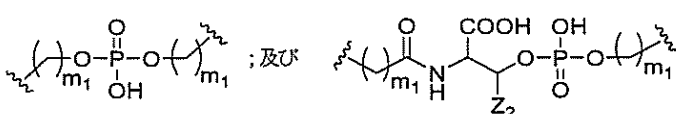
【 0 4 5 0】

ある特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

40

【 0 4 5 1】

【化 6 5】



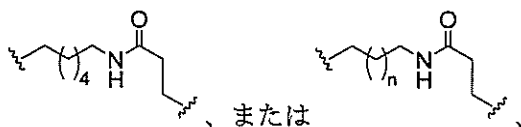
ここで Z_2 は H または CH_3 であり、

各 m_1 は独立して 0～20 であり、各テザーにつき少なくとも 1 つの m_1 は 0 よりも大きい。

【 0 4 5 2】

50

【化 6 6】



【 0 4 5 4 】

【 0 4 5 5 】

ある特定の実施形態において、本開示は、各リガンドがテザーに共有結合されるリガンドを提供する。ある特定の実施形態において、各リガンドは、標的細胞において少なくとも1種類の受容体に対する親和性を有するように選択される。ある特定の実施形態において、哺乳類肝臓細胞の表面において少なくとも1種類の受容体に対する親和性を有するリガンドが選択される。ある特定の実施形態において、肝アジア糖タンパク質受容体（ASGPR）に対する親和性を有するリガンドが選択される。ある特定の実施形態において、各リガンドは、炭水化物である。ある特定の実施形態において、各リガンドは、ガラクトース、N-アセチルガラクトースアミン、マンノース、グルコース、グルコサミン、及びフコースから独立して選択される。ある特定の実施形態において、各リガンドは、N-アセチルガラクトースアミン（GalNAc）である。ある特定の実施形態において、ターゲティング部分は2〜6個のリガンドを含む。ある特定の実施形態において、ターゲティング部分は3個のリガンドを含む。ある特定の実施形態において、ターゲティング部分は3個のN-アセチルガラクトサミンリガンドを含む。

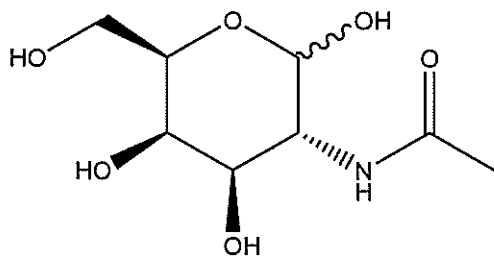
ある特定の実施形態において、リガンドは、炭水化物、炭水化物誘導体、修飾炭水化物、多価炭水化物クラスター、多糖、修飾多糖、または多糖誘導体である。ある特定の実施形態において、リガンドは、アミノ糖またはチオ糖である。例えばアミノ糖は、当技術分野で知られている多くの化合物、例えばグルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノース (GalNAc)、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース (β -ムラミン酸)、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4, 6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2, 3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、及びN-スルホ-D-グルコサミン、及びN-グリコロイル- α -ノイラミン酸から選択されうる。例えば、チオ糖は、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2, 3, 4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、及びエチル3, 4, 6, 7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1, 5-ジチオ- α -D-glucopyranosideからなる群から選択されうる。

ある特定の実施形態において、「GaInAc」または「GaI-NAc」は、文献内で一般にN-アセチルガラクトサミンと称される2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。ある特定の実施形態において、「N-アセチルガラクトサミン」は、2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。ある特定の実施形態において、「GaInAc」または「GaI-NAc」は、2-(

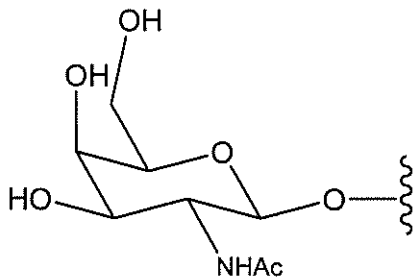
アセチルアミノ) - 2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。ある特定の実施形態において、「GalNac」または「Gal-NAc」は、β型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノースとα型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースの両方を含む、2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。ある特定の実施形態において、β型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノースとα型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースはどちらも可換的に使用されうる。したがって一方の型が図示される構造において、これらの構造は、他方の型も同様に含むものとする。例えばα型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースの構造が示される場合、この構造は他方の型も同様に含むものとする。特定の好ましい実施形態では、β型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースが好ましい実施形態である。

【0458】

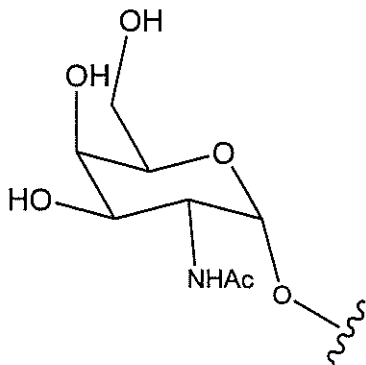
【化67】



2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノース



2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノース



2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-α-D-ガラクトピラノース

【0459】

ある特定の実施形態において、2つ以上のリガンドは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0460】

10

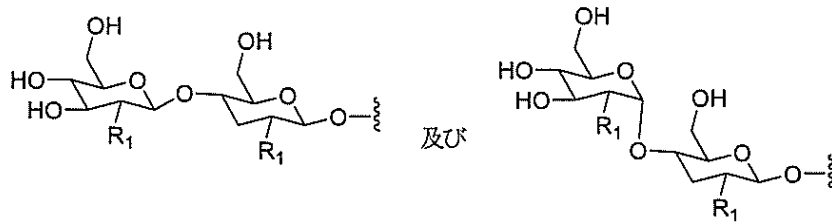
20

30

40

50

【化 6 8】



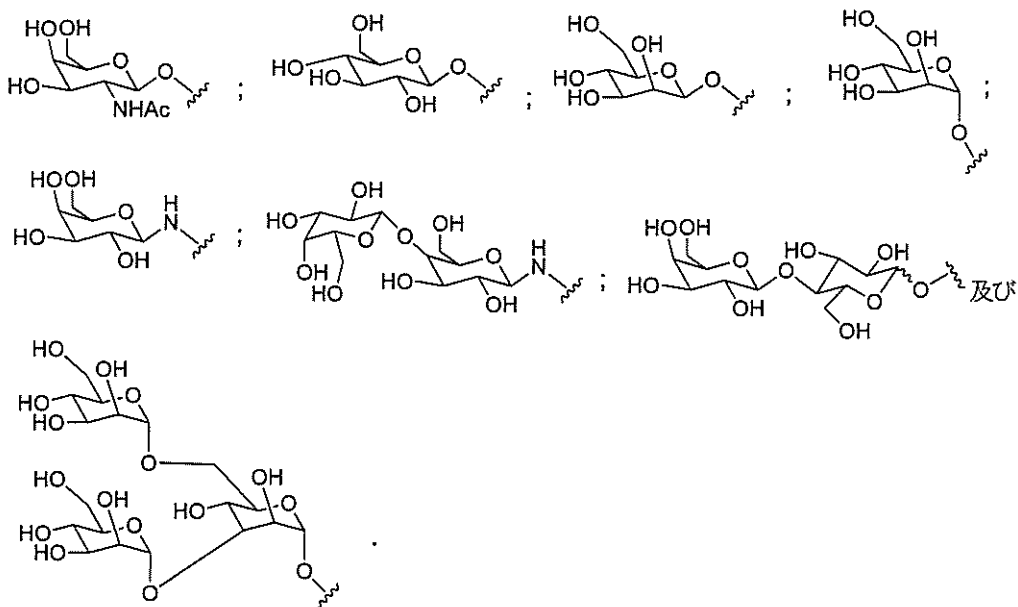
式中、各 R_1 は、 OH 及び $NHCOOH$ から選択される。

【0 4 6 1】

ある特定の実施形態において、2つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 6 2】

【化 6 9】

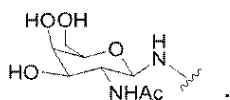


【0 4 6 3】

ある特定の実施形態において、2つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 6 4】

【化 7 0】

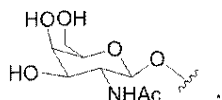


【0 4 6 5】

ある特定の実施形態において、2つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0 4 6 6】

【化 7 1】



【0 4 6 7】

i. ある特定の共役体

ある特定の実施形態において、共役基は、上述の構造的特徴を含む。特定のそのような

10

20

30

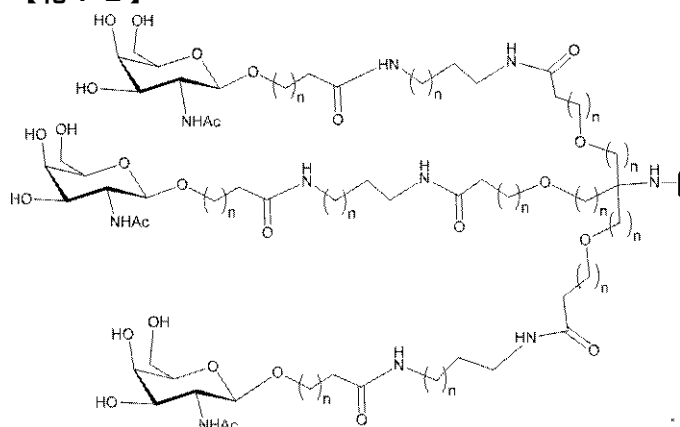
40

50

実施形態において、共役基は以下の構造を有し、

【0468】

【化72】



10

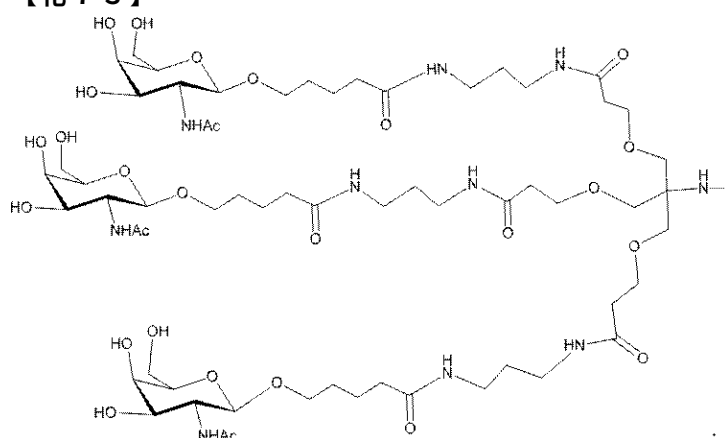
式中、各 n は、独立して、1～20である。

【0469】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有し、

【0470】

【化73】



20

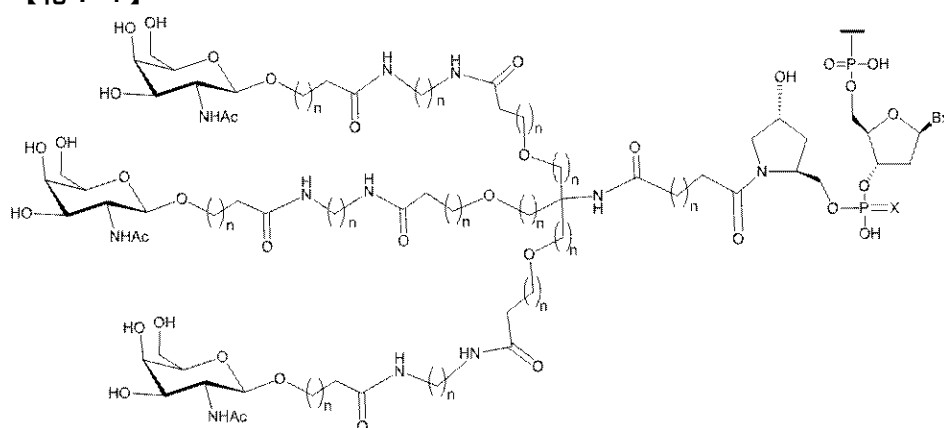
30

【0471】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有し、

【0472】

【化74】



40

式中、各 n は、独立して、1～20であり、

Z は、H または結合固体支持体であり、

50

Qは、アンチセンス化合物であり、

Xは、OまたはSであり、

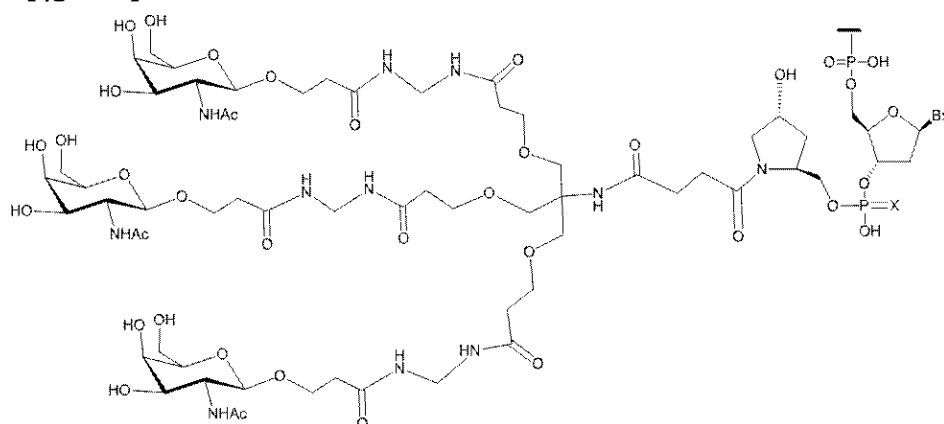
B xは複素環式塩基部分である。

【0473】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有し、

【0474】

【化75】



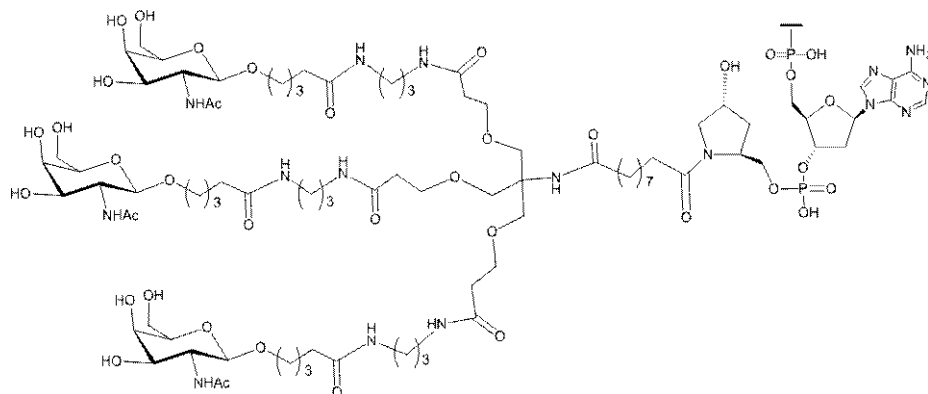
10

【0475】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0476】

【化76】



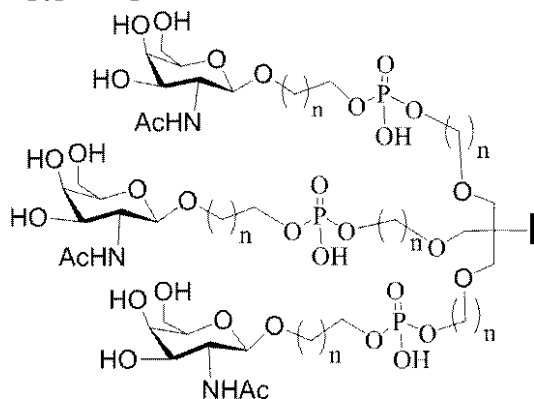
30

【0477】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0478】

【化77】



40

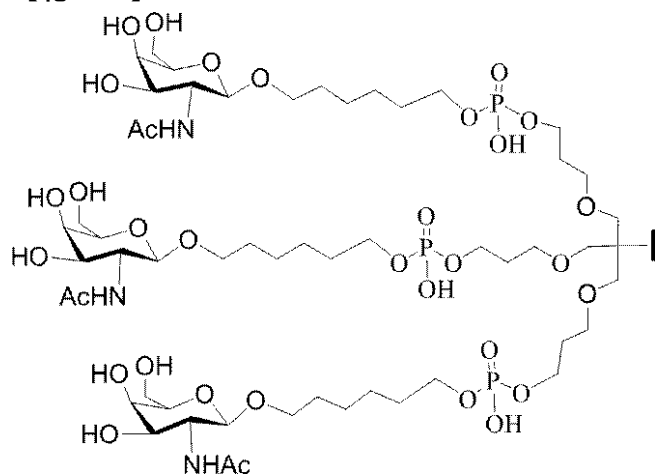
【0479】

50

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0480】

【化78】



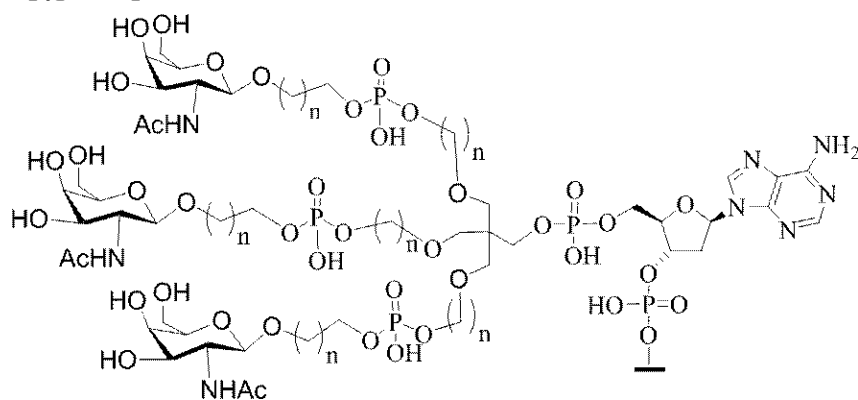
10

【0481】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0482】

【化79】



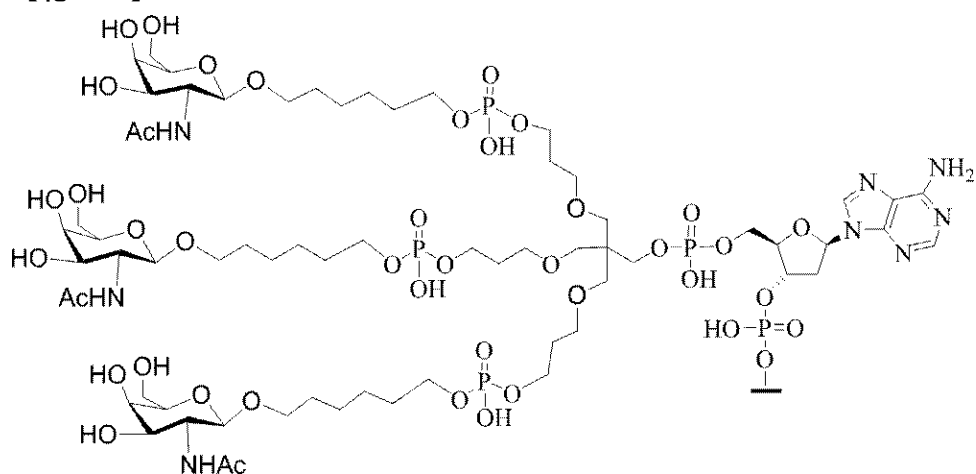
30

【0483】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0484】

【化80】



40

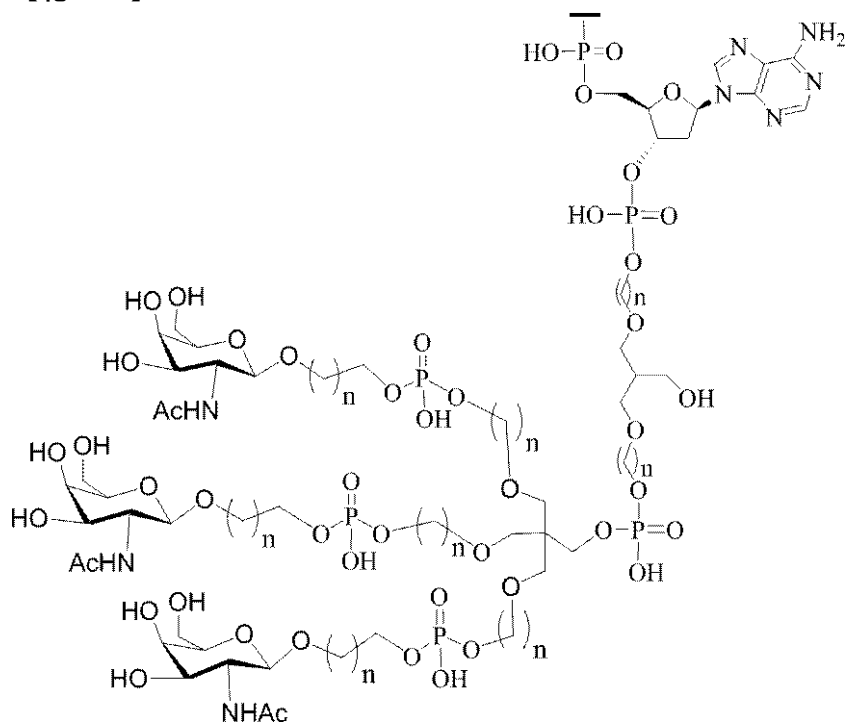
【0485】

50

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0486】

【化81】



10

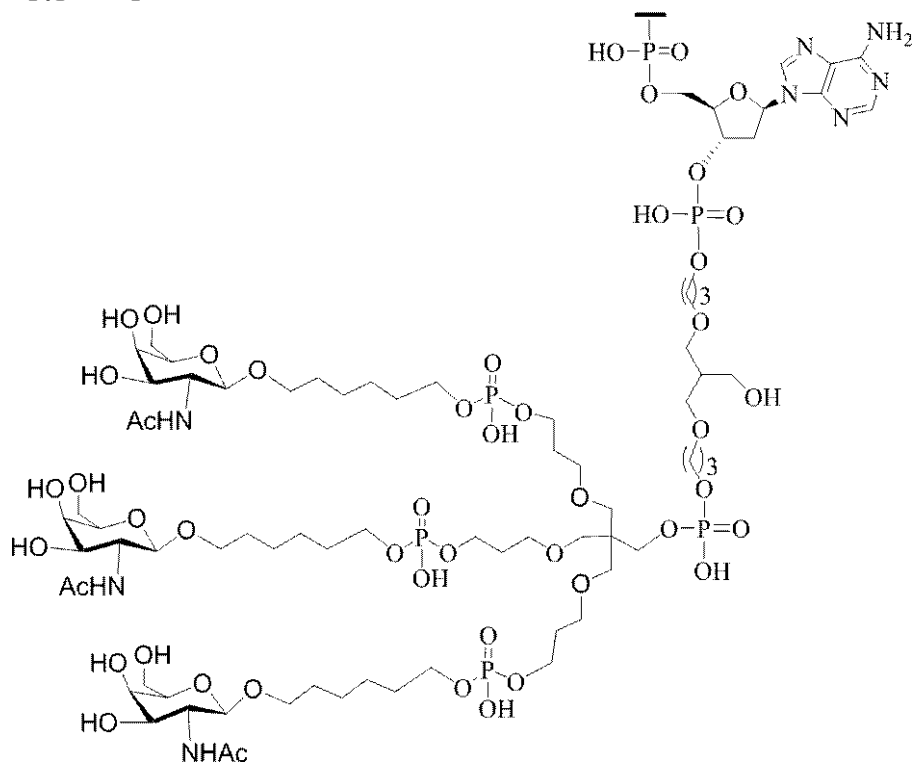
20

【0487】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0488】

【化82】



30

40

【0489】

ある特定の実施形態において、共役体はピロリジンを含まない。

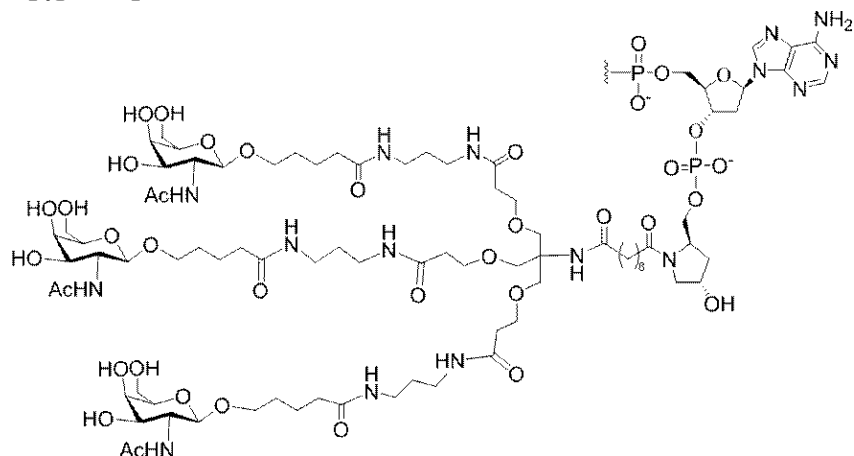
【0490】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

50

【0491】

【化83】



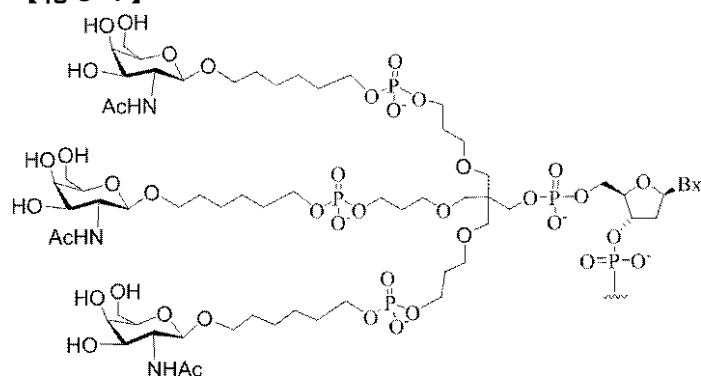
10

【0492】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0493】

【化84】



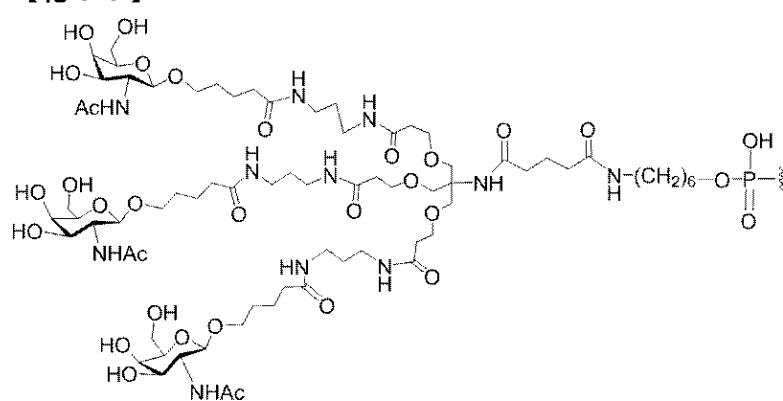
20

【0494】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0495】

【化85】



40

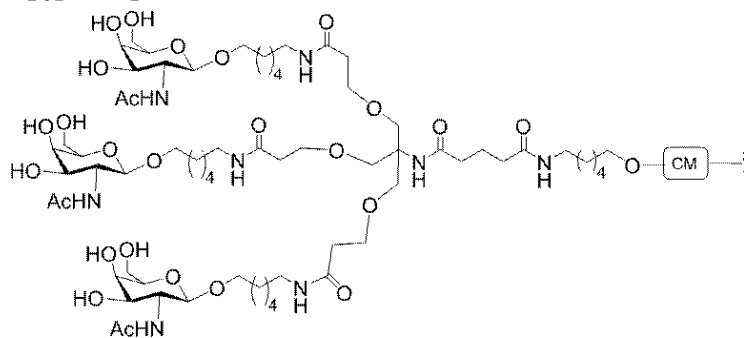
【0496】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0497】

50

【化 8 6】



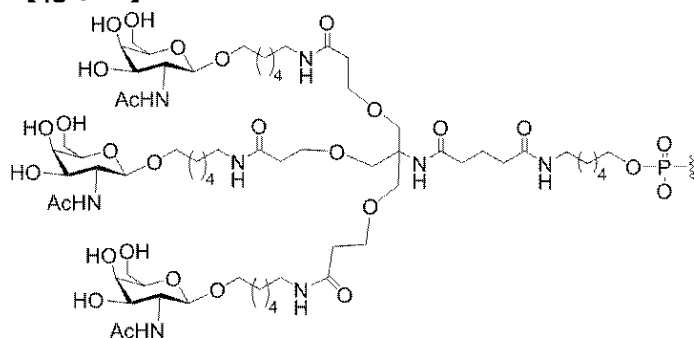
10

【 0 4 9 8】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 4 9 9】

【化 8 7】



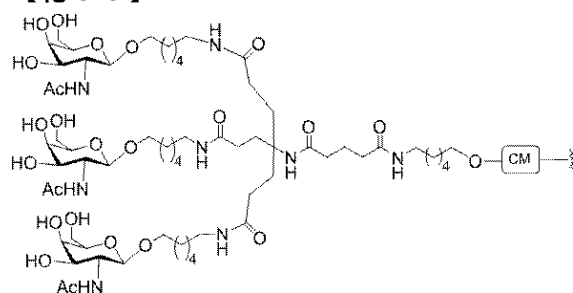
20

【 0 5 0 0】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 0 1】

【化 8 8】



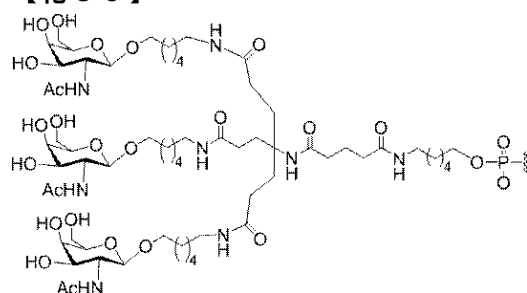
30

【 0 5 0 2】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 0 3】

【化 8 9】



40

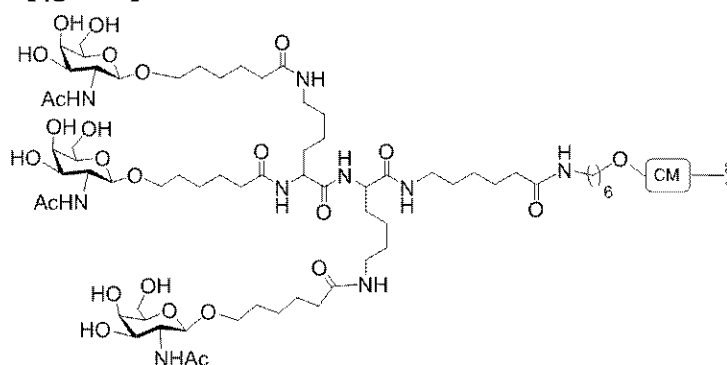
【 0 5 0 4】

50

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0505】

【化90】



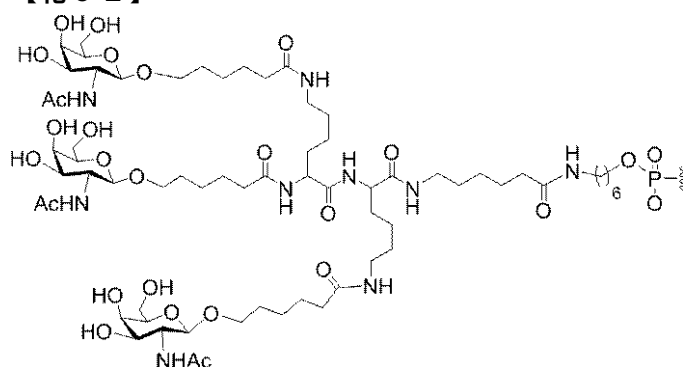
10

【0506】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0507】

【化91】



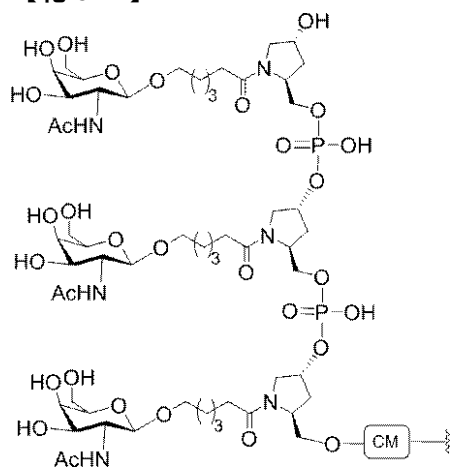
20

【0508】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0509】

【化92】



40

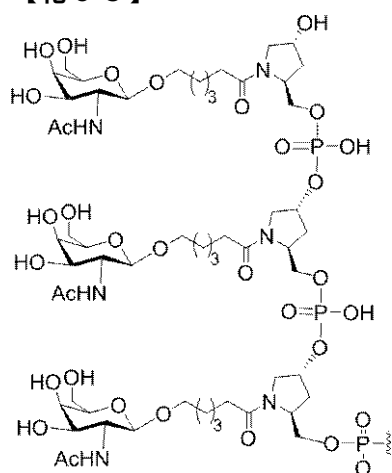
【0510】

ある特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0511】

50

【化 9 3】



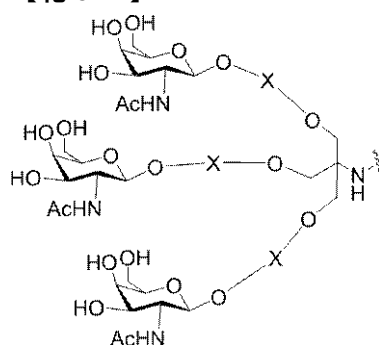
10

【 0 5 1 2】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 1 3】

【化 9 4】



20

式中、Xは、6～11個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーである。

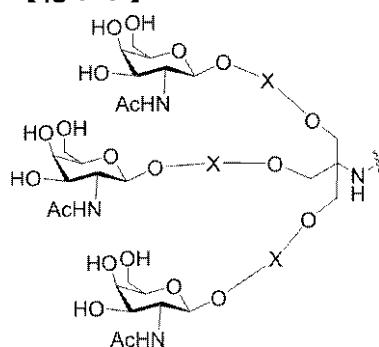
30

【 0 5 1 4】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 1 5】

【化 9 5】



40

式中、Xは、10個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーである。

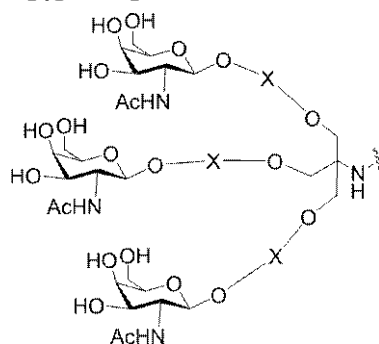
【 0 5 1 6】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 1 7】

50

【化 9 6】



10

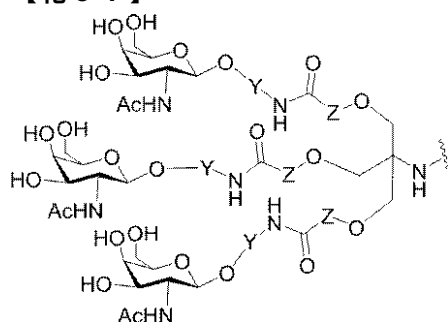
式中、Xは、4～11個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、当該テザーは、1個だけアミド結合を含む。

【0518】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0519】

【化 9 7】



20

式中、Y及びZは、C₁～C₁₂置換もしくは無置換アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基、またはエーテル、ケトン、アミド、エステル、カルバメート、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、トリアゾール、ピロリジン、ジスルフィド、もしくはチオエーテルを含む基から独立して選択される。

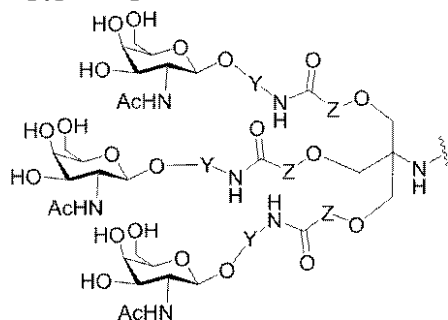
30

【0520】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0521】

【化 9 8】



40

式中、Y及びZは、C₁～C₁₂置換もしくは無置換アルキル基、またはエーテル1個だけもしくはエーテル2個だけ、アミド、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、またはホスホロチオエートを含む基から独立して選択される。

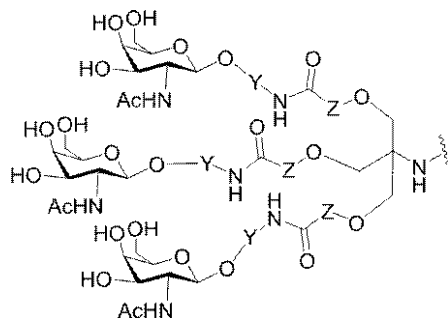
【0522】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

50

【0523】

【化99】



10

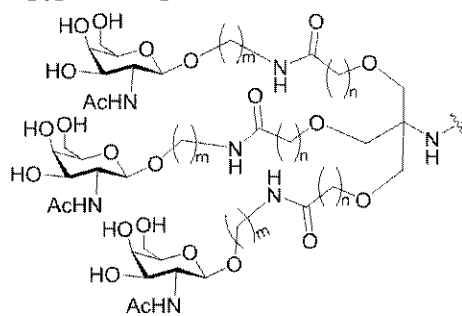
式中、Y及びZは、C₁－C₁₂置換または無置換アルキル基から独立して選択される。

【0524】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0525】

【化100】



20

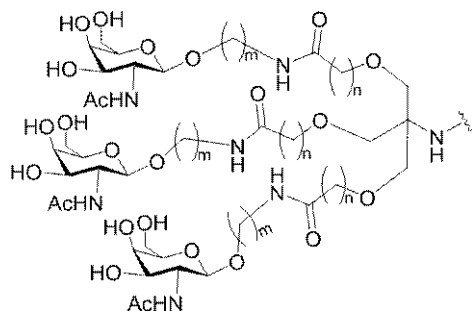
式中、m及びnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び12から独立して選択される。

【0526】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0527】

【化101】



40

式中、mは、4、5、6、7、または8であり、nは、1、2、3、または4である。

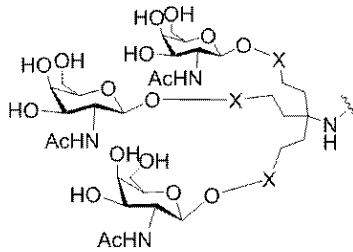
【0528】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0529】

50

【化 1 0 2】



式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、Xは、エーテル基を含まない。

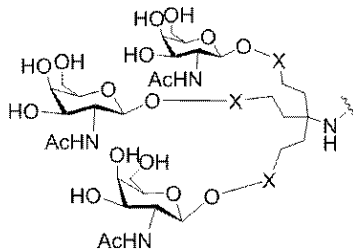
10

【0 5 3 0】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0 5 3 1】

【化 1 0 3】



20

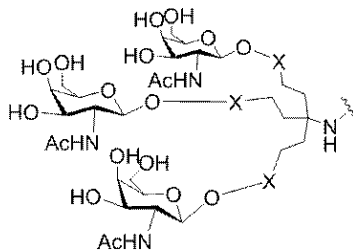
式中、Xは、8個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、Xは、エーテル基を含まない。

【0 5 3 2】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0 5 3 3】

【化 1 0 4】



30

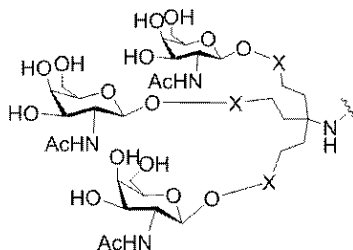
式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、当該テザーは、1個だけアミド結合を含み、Xはエーテル基を含まない。

【0 5 3 4】

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0 5 3 5】

【化 1 0 5】



40

式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、当該テザーは、アミド結合及び置換または無置換C₂-C₁₁アルキル基からなる。

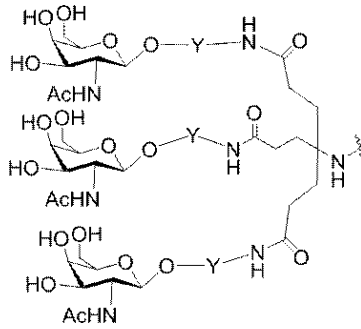
【0 5 3 6】

50

ある特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0537】

【化106】



10

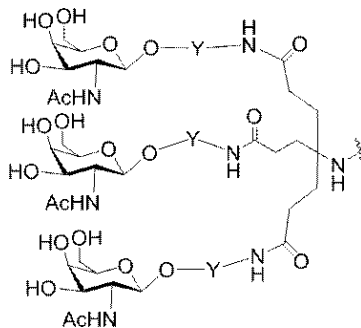
式中、Yは、C₁－C₁₂置換もしくは無置換アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基、またはエーテル、ケトン、アミド、エステル、カルバメート、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、トリアゾール、ピロリジン、ジスルフィド、もしくはチオエーテルを含む基から選択される。

【0538】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0539】

【化107】



20

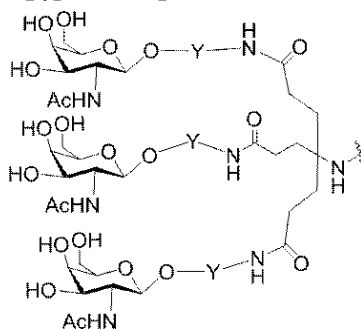
式中、Yは、C₁－C₁₂置換もしくは無置換アルキル基、またはエーテル、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、もしくはホスホロチオエートを含む基から選択される。

【0540】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0541】

【化108】



30

式中、Yは、C₁－C₁₂置換または無置換アルキル基から選択される。

【0542】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構

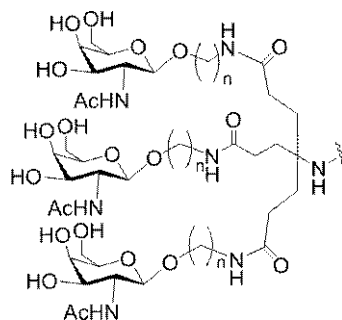
40

50

造を有し、

【0543】

【化109】



10

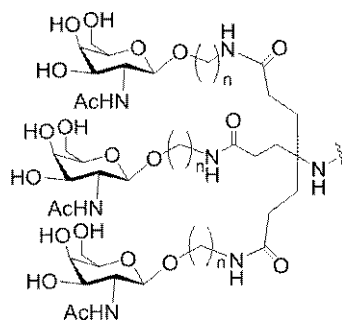
式中、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12である。

【0544】

ある特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0545】

【化110】



20

式中、 n は、4、5、6、7、または8である。

【0546】

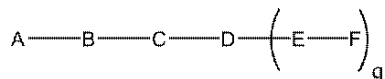
a. あり特定の共役アンチセンス化合物

30

ある特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの2'、3'、または5'位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0547】

【化111】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

40

Bは、切断可能部分であり、

Cは、共役リンカーであり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、

q は、1～5の整数である。

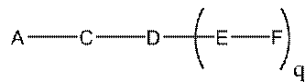
【0548】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0549】

50

【化 1 1 2】



式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

C は、共役リンカーであり、

D は、分岐基であり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、

q は、1～5 の整数である。

ある特定のそのような実施形態において、共役リンカーは、少なくとも 1 つの切断可能な結合を含む。

ある特定のそのような実施形態において、分岐基は、少なくとも 1 つの切断可能な結合を含む。

ある特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも 1 つの切断可能な結合を含む。

【0 5 5 0】

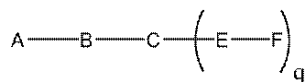
ある特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの 2'、3'、または 5' 位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。

【0 5 5 1】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0 5 5 2】

【化 1 1 3】



式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

B は、切断可能部分であり、

C は、共役リンカーであり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、かつ

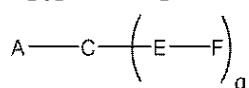
q は、1～5 の整数である。

【0 5 5 3】

ある特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの 2'、3'、または 5' 位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0 5 5 4】

【化 1 1 4】



式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

C は、共役リンカーであり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、かつ

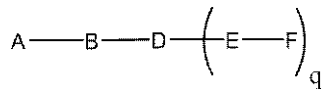
q は、1～5 の整数である。

【0 5 5 5】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0556】

【化115】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Bは、切断可能部分であり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、かつ

qは、1～5の整数である。

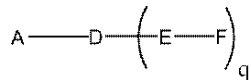
10

【0557】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0558】

【化116】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、かつ

qは、1～5の整数である。

20

【0559】

ある特定のそのような実施形態において、共役リンカーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0560】

ある特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

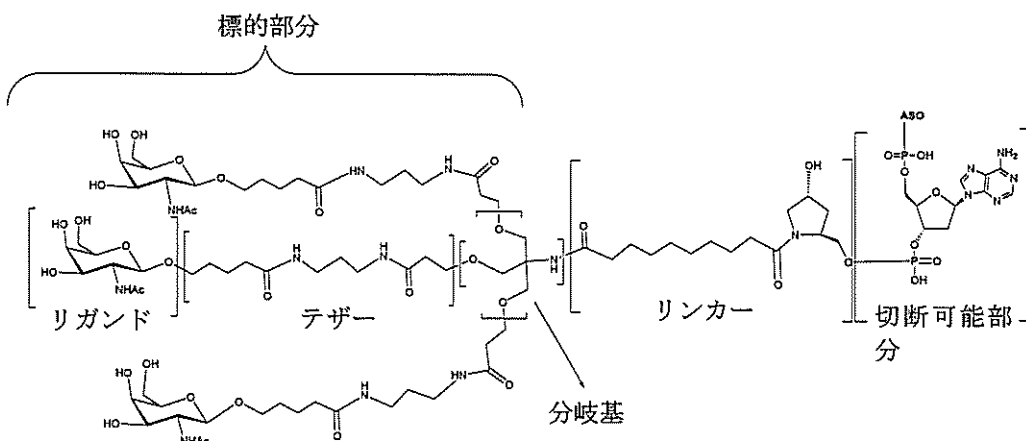
30

【0561】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構造を有する。

【0562】

【化117】



40

【0563】

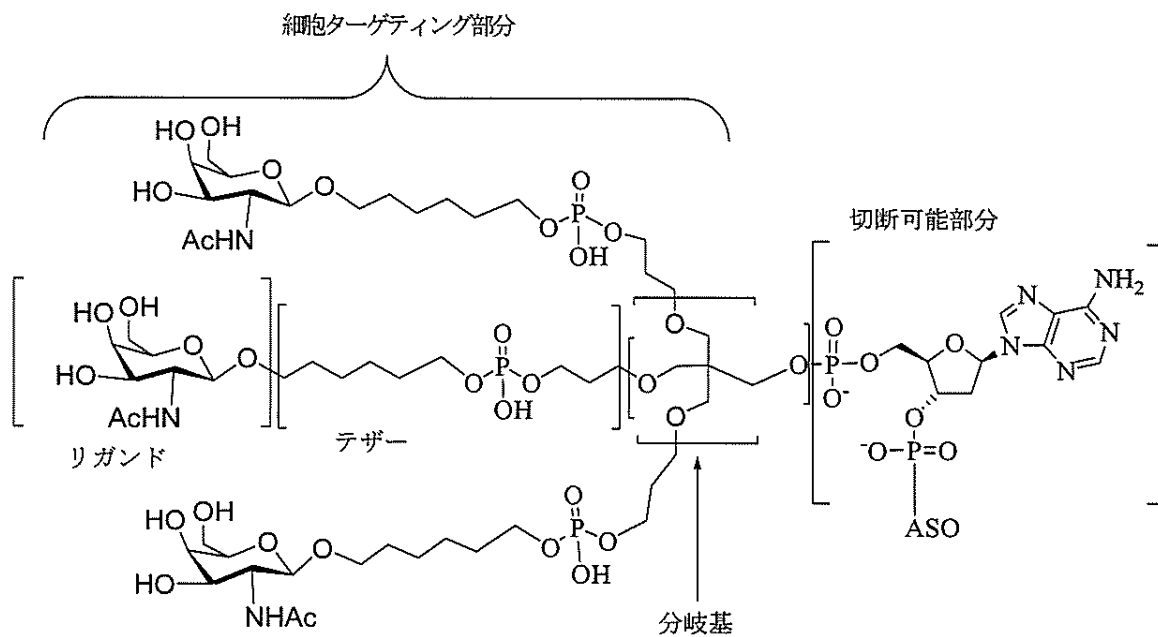
ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構

50

造を有する。

【0564】

【化118】



【0565】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構造を有する。

【0566】

30

40

50

切断可能部分



30

40

50

上述の共役体、共役アンチセンス化合物、テザー、リンカー、分岐基、リガンド、切断可能部分、ならびに他の修飾のいくつかの調製を教示する代表的な出版物には、BIESSEN et al. 「The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent」 J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852、BIESSEN et al. 「Synthesis of Cluster Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor」 J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546、LEE et al. 「New and more efficient multivalent glyco-ligands for asi

aloglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes」*Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2011) 19:2494-2500、RENSSEN et al. 「Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo」*J. Biol. Chem.* (2001) 276 (40):37577-37584、RENSSEN et al. 「Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor」*J. Med. Chem.* (2004) 47:5798-5808、SLIEDREGT et al. 「Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor」*J. Med. Chem.* (1999) 42:609-618、及びValentijn et al. 「Solid-phase synthesis of lysine-based Cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor」*Tetrahedron*, 1997, 53 (2), 759-770が含まれるが、これらに限定されず、これらの文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0569】

ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は、RNase Hベースのオリゴヌクレオチド（ギャップマーなど）またはスプライス調節オリゴヌクレオチド（完全修飾オリゴヌクレオチドなど）、及び少なくとも1つ、2つ、または3つのGalNAc基を含む任意の共役基を含む。ある特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は、以下の参考文献：Lee, *Carbohydr Res*, 1978, 67, 509-514、Connolly et al., *J Biol Chem*, 1982, 257, 939-945、Pavia et al., *Int J Pep Protein Res*, 1983, 22, 539-548、Lee et al., *Biochem*, 1984, 23, 4255-4261、Lee et al., *Glycoconjugate J*, 1987, 4, 317-328、Toyokuni et al., *Tetrahedron Lett*, 1990, 31, 2673-2676、Biessen et al., *J Med Chem*, 1995, 38, 1538-1546、Valentijn et al., *Tetrahedron*, 1997, 53, 759-770、Kim et al., *Tetrahedron Lett*, 1997, 38, 3487-3490、Lee et al., *Bioconjug Chem*, 1997, 8, 762-765、Kato et al., *Glycobiol*, 2001, 11, 821-829、Rensen et al., *J Biol Chem*, 2001, 276, 37577-37584、Lee et al., *Methods Enzymol*, 2003, 362, 38-43、Westerlind et al., *Glycoconj J*, 2004, 21, 227-241、Lee et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16 (19), 5132-5135、Maierhofer et al., *Bioorg Med Chem*, 2007, 15, 7661-7676、Khorev et al., *Bioorg Med Chem*, 2008, 16, 5216-5231、Lee et al., *Bioorg Med Chem*, 2011, 19, 2494-2500、Kornilova et al., *Analyt Biochem*, 2012, 425, 43-46、Pujol et al., *Angew Chemie Int Ed Engl*, 2012, 51, 7445-7448、Biess

10

20

30

40

50

en et al., J Med Chem, 1995, 38, 1846-1852、Sliedregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609-618、Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798-5808、Rensen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26, 169-175、van Rossenberget al., Gene Ther, 2004, 11, 457-464、Sato et al., J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022、Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564-7571、Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792、Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940、Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321、Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14, 18-29、Jayaprakash et al., Org

Lett, 2010, 12, 5410-5413、Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128、Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620、Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281、国際出願WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; 米国特許4, 751, 219; 8, 552, 163; 6, 908, 903; 7, 262, 177; 5, 994, 517; 6, 300, 319; 8, 106, 022; 7, 491, 805; 7, 491, 805; 7, 582, 744; 8, 137, 695; 6, 383, 812; 6, 525, 031; 6, 660, 720; 7, 723, 509; 8, 541, 548; 8, 344, 125; 8, 313, 772; 8, 349, 308; 8, 450, 467; 8, 501, 930; 8, 158, 601; 7, 262, 177; 6, 906, 182; 6, 620, 916; 8, 435, 491; 8, 404, 862; 7, 851, 615; 米国特許出願公開US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; 及びUS2009/0203132のうちのいずれかにおいて見いだされる任意の共役基を含み、これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が組み込まれる。

【0570】

10

20

30

40

50

細胞培養及びアンチセンス化合物による治療

アンチセンス化合物がPKK核酸のレベル、活性または発現に与える効果は、様々な細胞型で*in vitro*で試験を行うことができる。このような分析に使用する細胞型は、市販の販売者（例えば、American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC; Clonetics Corporation, Walkersville, MD）から入手可能であり、市販で入手可能な試薬（例えばLife Technologies、カリフォルニア州カールズバッド）を使用して、販売者の指示書に従って培養する。例示的な細胞型としては、HepaRGTMT細胞及びマウス初代培養肝細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0571】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ試験

本明細書には、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置するための方法を記載する。この方法には、他のアンチセンス化合物による処置のために、適宜変更を加えることができる。

【0572】

細胞は、細胞が培養中で約60～80%コンフルエントに達した時に、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することができる。

【0573】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するためによく使用される試薬の一つに、カチオン性脂質トランスフェクション試薬LIPOFECTIN（Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド）がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM1（Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド）中でLIPOFECTINと混合することで、所望の最終アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度と、100 nMアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12 µg/mLの範囲に及びうるLIPOFECTIN濃度にする。

20

【0574】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用されるもう一つの試薬は、LIPOFECTAMINE（Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド）である。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM1還元血清培地（Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド）中でLIPOFECTAMINEと混合することで、所望のアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度と、100 nMアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12 µg/mLの範囲に及びうるLIPOFECTAMINE濃度にする。

30

【0575】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用されるもう一つの技法に、エレクトロポレーションがある。

【0576】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用されるさらにもう一つの技法に、細胞によるオリゴヌクレオチド自由取り込みがある。

40

【0577】

細胞は、常法により、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理される。細胞はアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の16～24時間後に収集することができ、その時点で、標的核酸のRNAレベルまたはタンパク質レベルが、当技術分野に知られておりかつ本明細書に記載する方法によって測定される。一般に、複数の複製試料で処理を行う場合は、複製試料処理の平均としてデータを表す。

【0578】

使用するアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに異なる。ある特定細胞株に関して最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を決定するための方法は、当技術分野では周知である。LIPOFECTAMINEによるトランスフェクションの場合

50

、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、1 nM～300 nMの範囲の濃度で使用される。エレクトロポレーションによるトランスフェクションの場合は、それより高い625 nMから20,000 nMまでの範囲の濃度で、アンチセンスオリゴヌクレオチドが使用される。

【0579】

RNAの単離

RNA分析は、全細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAで行うことができる。RNA単離の方法は当技術分野ではよく知られている。RNAは当技術分野において周知の方法を使って、例えばTRIzol試薬(Life Technologies, カリフォルニア州カールズバッド)を製造者が推奨するプロトコルに従って使用することによって、調製される。

【0580】

標的レベルまたは発現の阻害の分析

PKK核酸のレベルまたは発現の阻害は、当技術分野で周知の様々な方法でアッセイすることができる。例えば、標的核酸レベルは、例えばノーザンブロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、または定量的リアルタイムPCRによって定量することができる。RNA分析は、全細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAで行うことができる。RNA単離の方法は当技術分野ではよく知られている。ノーザンブロット分析は、また当技術分野ではルーチンになっている。定量的リアルタイムPCRは、PE-Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティから入手できる市販のABI PRISM 7600、7700、または7900配列検出システムを、製造者の指示書に従って使用することで好都合に達成することができる。

【0581】

標的RNAレベルの定量的リアルタイムPCR分析

標的RNAレベルの定量は、製造業者の説明書に従ってABI PRISM 7600、7700、または7900配列検出システム(PE-Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ)を用いて定量的リアルタイムPCRによって達成することができる。定量的リアルタイムPCRの方法は、当技術分野でよく知られている。

【0582】

リアルタイムPCRの前に、単離されたRNAは、逆転写酵素(RT)反応に供し、リアルタイムPCR増幅のための基質として使用される相補的DNA(cDNA)を生成する。RT及びリアルタイムPCR反応は、同じ試料ウェル中で順次実施する。RT及びリアルタイムPCR試薬は、Life Technologies社(カリフォルニア州カールズバッド)から得ることができる。RTリアルタイムPCR反応は、当業者に周知の方法によって実施される。

【0583】

リアルタイムPCRによって得られる遺伝子(またはRNA)標的量は、シクロフィリンA等の、発現が一定である遺伝子の発現レベルを使用、またはRIBOGREEN(Life Technologies, Inc. カリフォルニア州カールズバッド)を使用した総RNAの定量化のどちらかによって正規化する。シクロフィリンAの発現は、リアルタイムPCR、標的と同時、多重化、または別個に実行することによって定量する。総RNAは、RIBOGREENによるRNA定量試薬(Invetrogen, Inc. オレゴン州ユーージーン)を使用して定量する。RIBOGREENによるRNA定量化の方法は、Jones, L. J., et al., (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)に教示されている。CYTOFLUOR 4000装置(PE Applied Biosystems)は、RIBOGREEN蛍光を測定するために使用する。

【0584】

プローブ及びプライマーは、PKK核酸にハイブリダイズするように設計する。リアル

10

20

30

40

50

タイムPCRプローブ及びプライマーの設計方法は、当該分野で周知であり、PRIMER EXPRESSソフトウェア (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ) 等のソフトウェアを使用してもよい。

【0585】

タンパク質レベルの分析

PKK核酸のアンチセンス阻害は、PKKタンパク質レベルを測定することによって評価することができる。PKKのタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンブロット分析 (イムノブロットティング)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、定量タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ (例えば、カスパーゼ活性アッセイ)、免疫組織化学、免疫細胞化学または蛍光活性化細胞選別 (FACS) 等の当該技術で周知の様々な方法で評価または定量化することができる。標的に対する抗体を同定し、抗体のMSRSカタログ (Aerie Corporation、ミズーリ州バーミンガム) 等の種々のソースから得ることができ、当該技術で周知の従来のモノクローナルまたはポリクローナル抗体生成法で調製することができる。

10

【0586】

アンチセンス化合物の *in vivo* 試験

PKKの発現を阻害し、表現型の変化を起こす能力を評価するために、アンチセンス化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を動物で行う。

【0587】

ある特定の実施形態では、そのような表現型の変化は、炎症性疾患に関連するもの、例えば、炎症、浮腫／腫脹、血管透過性、及び血管漏出の減少を含む。ある特定の実施形態では、炎症は、動物の浮腫、体温、痛み、組織の色、及び腹部の機能の増加または減少を測定することによって測定する。

20

【0588】

ある特定の実施形態では、そのような表現型の変化として、血栓塞栓性疾患に関連するもの、例えば、長時間のaPTT、正常なPTと組み合わせた場合の長時間のaPTT時間、血小板第4因子 (PF-4) の量の減少、血栓の形成の減少または血栓形成の時間の増加が挙げられる。

【0589】

正常な動物、または実験的疾患モデルで、試験を実施してもよい。動物に投与するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、リン酸緩衝生理食塩水等の医薬上許容される希釈剤中で製剤化する。腹腔内、静脈内、及び皮下等の非経口投与経路で投与を行う。アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量及び投与頻度の計算は当業者の能力の範囲内で行われ、投与経路及び動物の体重等の要因に依存する。アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた処置期間の後、RNAを肝臓組織から単離し、PKK核酸発現の変化を測定する。

30

【0590】

ある特定の適応

ある特定の実施形態では、本発明は、個体の治療方法を提供し、本明細書に記載の1つ以上の医薬組成物を投与することを含む。

【0591】

ある特定の実施形態では、個体は、炎症性疾患を有する。ある特定の実施形態では、個体は、以下に限定されないが、遺伝性血管浮腫 (HAE)、浮腫、血管浮腫、腫脹、目蓋の血管浮腫、眼の浮腫、黄斑浮腫、及び脳浮腫を含む炎症性の症状を発症する危険性がある。これは、炎症のリスクをもたらす後天性の問題、疾患または障害、例えば、炎症性の病態に対する遺伝的素因、環境因子、及びACE阻害剤及びARBといった特定の医薬品への暴露を有する個体を含む。ある特定の実施形態では、当該個体は、抗炎症治療を必要とする個体であると判断されている。当該個体の例として、補体1エステラーゼ阻害剤 (すなわち、C1-INH) または因子12の遺伝子コードに変異を有する個体含まれるが、これに限定されない。ある特定の実施形態では、異常なコードは、C1-INH (I型HAE) の欠損、適切に機能するための既存のC1-INHの不能 (II型HAE)、ま

40

50

たは超機能亢進性因子 1 2 (I I I 型 H A E) につながる可能性がある。

【 0 5 9 2 】

ある特定の実施形態では、個体は、血栓塞栓性疾患を有している。ある特定の実施形態では、個体は、血液凝固障害の危険性があり、これらに限定されないが、梗塞、血栓症、塞栓症、深部静脈血栓症等の血栓塞栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、及び脳卒中を含む。これは、例えば、手術、がん、不働、敗血症、アテローム性動脈硬化症、心房細動といった血栓症のリスクにつながる後天性の問題、疾患、または障害、ならびに遺伝的素因、例えば抗リン脂質抗体症候群及び常染色体の有意性条件、第 V 因子ライデンがを有する個体を含む。ある特定の実施形態では、当該個体は、抗炎症治療を必要とする個体であると判断されている。このような個体の例として、限定されないが、主要な整形外科手術（例えば、腰／膝関節の交換または股関節骨折手術）を受けている個体、動脈細動を罹患しており、脳卒中を予防するために慢性治療の必要がある患者が挙げられる。

10

【 0 5 9 3 】

ある特定の実施形態では、本発明は、個体の P K K 発現を予防の目的で減少させる方法を提供している。ある特定の実施形態は、個体に P K K 核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物を投与することにより、治療を必要とする個体を治療することを含む。

【 0 5 9 4 】

一実施形態では、P K K 核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物の投与は、アンチセンス化合物の投与に対する個体の反応を測定するために、個体の血清中の P K K レベルのモニタリングを伴う。アンチセンス化合物の投与に対する個体の応答は、治療介入の量及び持続時間を決定するために医師が使用する。

20

【 0 5 9 5 】

ある特定の実施形態では、P K K 核酸を標的とするアンチセンス化合物を投与することにより、少なくとも 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、または 9 9 %、またはこれらの 2 つの値によって定義される範囲で P K K 発現を減少させる。ある特定の実施形態では、P K K を標的とするアンチセンス化合物を含む医薬組成物は、炎症性疾患または血栓塞栓性疾患を罹患している、またはその疑いのある患者を治療するために、医薬品を調製するために使用する。

30

【 0 5 9 6 】

ある特定の組成物

1. I S I S 5 4 6 2 5 4

ある特定の実施形態では、I S I S 5 4 6 2 5 4 は、5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーを特徴とし、(5 ' から 3 ') T G C A A G T C T C T T G G C A A A C A (配列番号 5 7 0 として本明細書に組み込まれる) の配列を有し、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5 ' - メチルシトシンであり、ヌクレオシド 1 - 5 及び 1 6 - 2 0 のそれぞれは、2 ' - O - メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド 6 - 1 5 のそれぞれは、2 ' - デオキシヌクレオシドである。

40

【 0 5 9 7 】

ある特定の実施形態では、I S I S 5 4 6 2 5 4 は、以下の化学表記法：T e s G e s m C e s A e s A e s G d s T d s m C d s T d s m C d s T d s T d s G d s G d s m C d s A e s A e s A e s m C e s A e によって記述され、ここで、

A = アデニン、

m C = 5 ' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

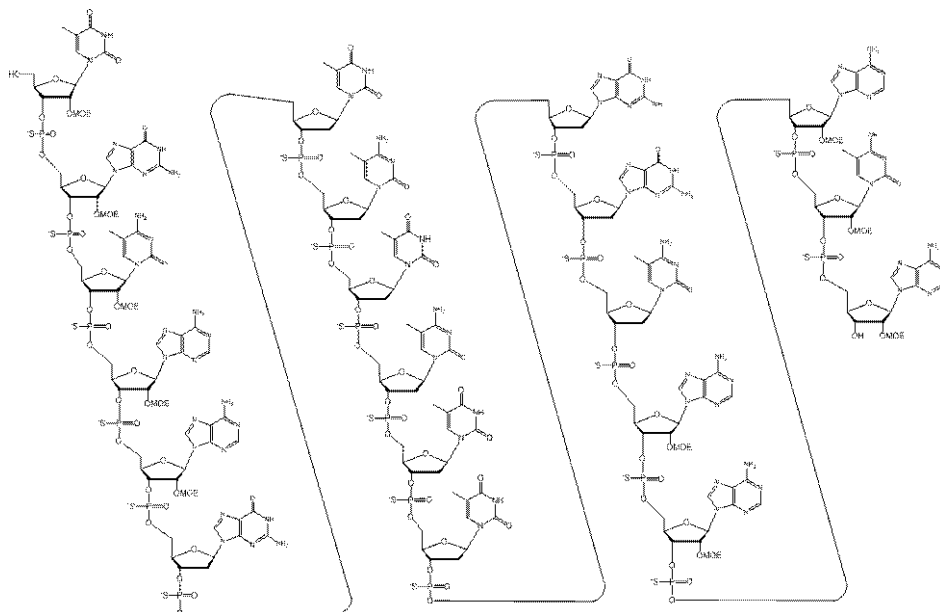
e = 2 ' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

50

s = ホスホリチオエートヌクレオシド間結合である。

ある特定の実施形態では、I S I S 5 4 6 2 5 4は、以下の化学構造によって記述される。

【化 1 2 0】



構造 1 I S I S 5 4 6 2 5 4

ある特定の実施形態では、実施例 2（以下）に提供されるように、ISIS 5462 54 は、処理時間 24 時間の後に、エレクトロポレーションを用いて 5,000 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトし、ヒトプライマープローブセット RTS3454 を使用することによって測定し、定量的リアルタイム PCR により測定し、RIBOGREEN（登録商標）によって測定された総 RNA 含量に従って調整した場合に、培養された HepaRG（商標）細胞（ウェル当たり 20,000 細胞の密度）中のヒト PKK mRNA を 95% 阻害した。

ある特定の実施形態では、実施例 5（以下の表 3 4 及び 4 1 参照）に提供されるように、I S I S 5 4 6 2 5 4 は、処理時間 1 6 時間の後に、エレクトロポーションを用いてトランスフェクトし、ヒトプライマープローブセット R T S 3 4 5 4 を用いて、定量的リアルタイム P C R によって測定し、R I B O G R E E N（登録商標）によって測定された総 R N A 含量に従って調整した場合に、培養された H e p a R G（商標）細胞（ウェルあたり 2 0, 0 0 0 細胞の密度）中で、4 点用量反応曲線（0. 1 9 μ M、0. 5 6 μ M、1. 6 7 μ M、及び 5. 0 μ M）で、0. 2 μ M 及び 0. 3 μ M の I C 5 0 を達成した。

ある特定の実施形態では、実施例 7（以下）に提供されるように、I S I S 5 4 6 2 5 4 は、ヒト P K K 遺伝子配列を保有するトランスジェニックマウスに、2.5 mg/kg/週、5.0 mg/kg/週、10 mg/kg/週または 20 mg/kg/週の I S I S 5 4 6 2 5 4 を、3 週間、週 2 回皮下注射した場合に、31%、55%、84%、及び 83% のヒト P K K mRNA 阻害及び 0%、36%、51%、及び 76% のヒト P K K タンパク質阻害を達成した。

ある特定の実施形態では、実施例 8（以下）に提供されるように、I S I S I 5 4 6

254は、PKK mRNA及びタンパク質の発現の阻害に有効であり、霊長類に許容される。

【0604】

2. ISIS 546343

ある特定の実施形態では、ISIS 546343は、5'-10-5MOEギャップマーを特徴とし、(5'から3') CCCCCCTTCTTTATAGCCAGC (配列番号705として本明細書に組み込まれる)の配列を有し、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、各シトシンは、5'-メチルシトシンであり、ヌクレオシド1-5及び16-20のそれぞれは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド6-15のそれぞれは、2'-デオキシヌクレオシドである。

【0605】

ある特定の実施形態では、ISIS 546343は、以下の化学表記法：mCes mCes mCes mCes Tds Tds mCds Tds Tds Tds Ads Tds Ads Gds mCes mCes Aes Ges mCeで記述され、ここで、

A = アデニン、

mC = 5'-メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2'-O-メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d = 2'-デオキシヌクレオシド、及び

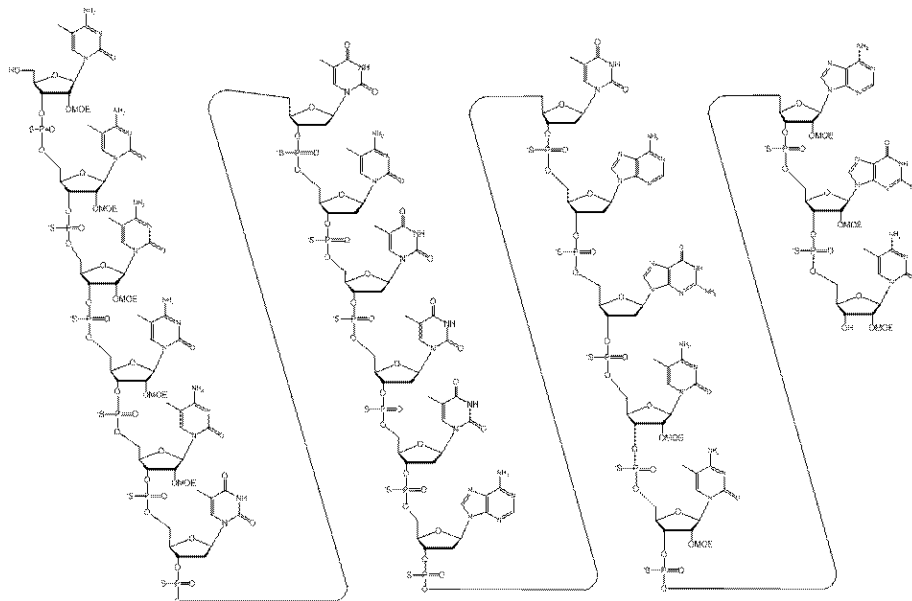
s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0606】

ある特定の実施形態では、ISIS 546343は、以下の化学構造によって記述される。

【0607】

【化121】



【0608】

構造2 ISIS 546343

ある特定の実施形態では、実施例2 (以下の表9及び10を参照のこと) に提供されるように、ISIS 546343は、処理時間24時間の後に、エレクトロポレーションを用いて5,000nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトし、ヒトプライマープローブセットRTS3454を使用することによって測定し、RIBOGRREEN (登録商標) によって測定された総RNA含量に従って調整された定量的リアルタ

イムPCRにより測定した場合に、培養されたHepaRG（商標）細胞（ウェル当たり20,000細胞の密度）中のヒトPKK mRNAを97%及び91%阻害した。

【0609】

ある特定の実施形態では、実施例5（以下の表34及び41参照）に提供されるように、ISIS546343は、処理時間16時間の後に、エレクトロポーションを用いてトランスフェクトし、ヒトプライマープロベセットRTS3454を使用して定量的リアルタイムPCRによって測定し、RIBOGREEN（登録商標）によって測定された総RNA含量に従って調整した場合に、培養されたHepaRG（商標）細胞（ウェルあたり20,000細胞の密度）中で、4点用量反応曲線（0.19 μ M、0.56 μ M、1.67 μ M、及び5.0 μ M）で、0.4 μ MのIC₅₀を達成した。

10

【0610】

ある特定の実施形態では、実施例7（以下）に提供されるように、ISIS546343は、ヒトPKK遺伝子配列を保有するトランスジェニックマウスに、2.5 mg/kg/週、5.0 mg/kg/週、10 mg/kg/週または20 mg/kg/週のISIS546343を、3週間、週2回皮下注射した場合に、46%、66%及び86%のヒトPKK mRNA阻害及び0%、38%及び79%のヒトPKKタンパク質阻害を達成した。

【0611】

ある特定の実施形態では、実施例8（以下）に提供されるように、ISIS546343は、PKK mRNA及びタンパク質の発現の阻害に有効であり、霊長類に許容される。

20

【0612】

3. ISIS548048

ある特定の実施形態では、ISIS548048は、核酸塩基配列（5'から3'）CGATATCATGATTCCC（配列番号1666として本明細書に取り込まれる）を有する修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを特徴とし、16個の2'-デオキシヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシド、及びcEt修飾ヌクレオシドの組み合わせから成り、ヌクレオシド1、2及び16のそれぞれは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド3、14、及び15のそれぞれはcEt修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド4-13のそれぞれは2'-デオキシヌクレオシドであり、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、各シトシンは、5'-メチルシトシンである。

30

【0613】

ある特定の実施形態では、ISIS548048は、以下の化学表記：mCes Ges Aks Tds Ads Tds mCds Ads Tds Gds Ads Tds Tds mCks mCks mCeによって記述され、ここで

A = アデニン、

mC = 5'-メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2'-O-メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

k = cEt修飾ヌクレオシド、

d = 2'-デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

40

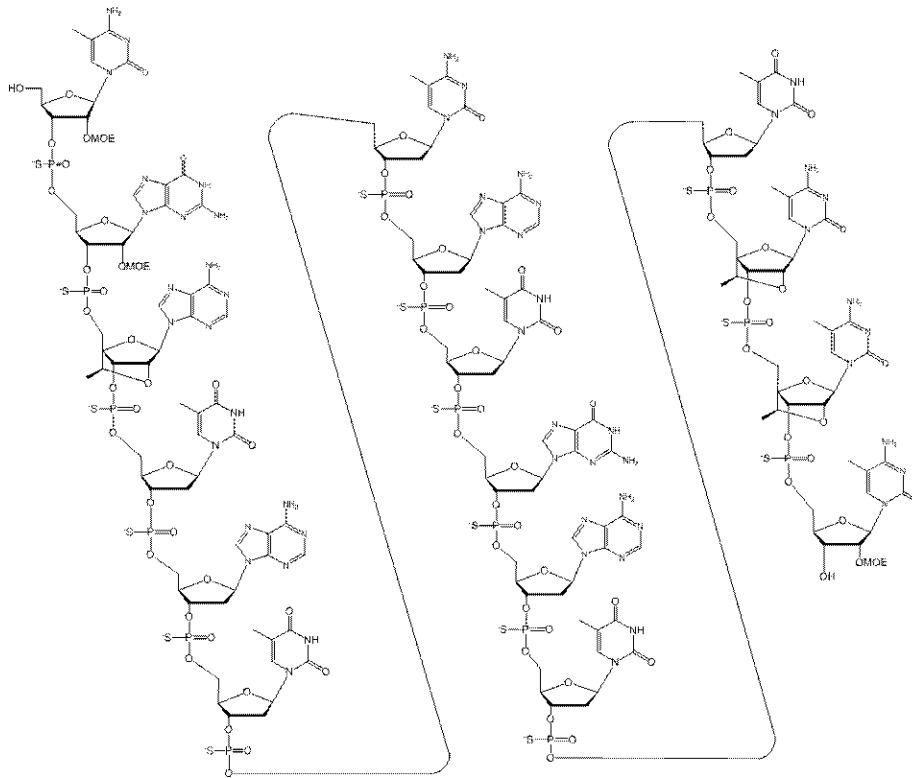
【0614】

ある特定の実施形態では、ISIS548048は、以下の化学構造によって記述される。

【0615】

50

【化 1 2 2】



10

20

【0 6 1 6】

構造 3 ISIS 548048

ある特定の実施形態では、実施例 3（以下）に提供されるように、ISIS 548048 は、処理時間 24 時間の後に、エレクトロポーションを用いて 1,000 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトし、ヒトプライマープローブセット RTS 3454 を使用して定量的リアルタイム PCR により測定し、RIBOGREEN（登録商標）によって測定された総 RNA 含量に従って調整した場合に、培養された HepaRG（商標）細胞（ウェルあたり 20,000 細胞の密度）中の mRNA を 84% 阻害した。

30

【0 6 1 7】

ある特定の実施形態では、実施例 6（以下）に提供されるように、ISIS 548048 は、処理時間 16 時間の後に、エレクトロポーションを用いてトランスフェクトし、ヒトプライマープローブセット RTS 3454 を用いて、定量的リアルタイム PCR によって測定し、RIBOGREEN（登録商標）によって測定された総 RNA 含量に従って調整した場合に、培養された HepaRG（商標）細胞（ウェルあたり 20,000 細胞の密度）中で、4 点用量反応曲線（0.11 μM、0.33 μM、1.00 μM、及び 3.00 μM）で、0.1 μM の IC₅₀ を達成した。

【0 6 1 8】

ある特定の実施形態では、実施例 7（以下）に提供されるように、ISIS 548048 は、ヒト PKK 遺伝子配列を保有するトランスジェニックマウスに、ISIS 548048 を、2.5 mg/kg/週、5.0 mg/kg/週、10 mg/kg/週または 20 mg/kg/週の 3 週間で、週 2 回皮下注射した場合に、7%、77%、72% 及び 80% のヒト PKK mRNA 阻害及び 23%、70%、89% 及び 98% のヒト PKK タンパク質阻害を達成した。

40

【0 6 1 9】

ある特定の実施形態では、実施例 8（以下）に提供されるように、ISIS 548048 は、PKK mRNA 及びタンパク質の発現の阻害に有効であり、霊長類に許容される。

【0 6 2 0】

50

4. ISIS 721744

ある特定の実施形態では、ISIS 721744は、5'-10-5MOEギャップマーとして特徴を有し、(5'から3')TGCAAGTCTCTTGGCAAACA(配列番号570として本明細書に組み込まれる)の配列を有し、ヌクレオシド3~4、4~5、16~17、及び17~18の間のヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合であり、ヌクレオシド1~2、2~3、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、11~12、12~13、13~14、14~15、15~16、18~19、及び19~20の間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシンは5'-メチルシトシンであり、ヌクレオシド1~5及び16~20のそれぞれは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド6~15のそれぞれは、2'-デオキシヌクレオシドである。

10

【0621】

ある特定の実施形態では、ISIS 721744は、以下の化学表記：GalNAc 3-7a-o Tes Ges mCeo Aeo Aes Gds Tds mCds Tds mCds Tds Tds Gds Gds mCds Aeo Aeo Aes mCes Aeによって記述され、ここで、

A=アデニン、

mC=5'-メチルシトシン、

G=グアニン、

T=チミン、

e=2'-O-メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d=2'-デオキシヌクレオシド、及び

o=ホスホジエステルヌクレオシド間結合、

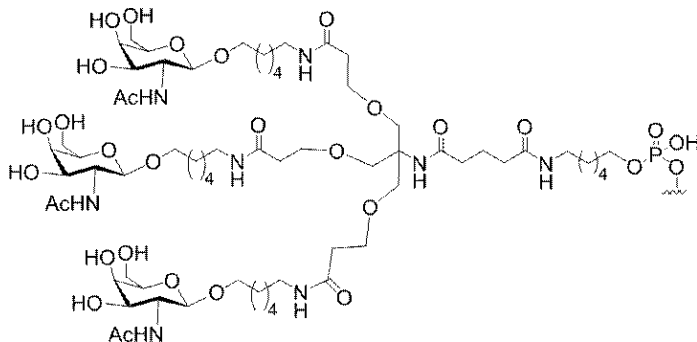
s=ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、及び

GalNAc 3-7a-o =

20

【0622】

【化123】



30

【0623】

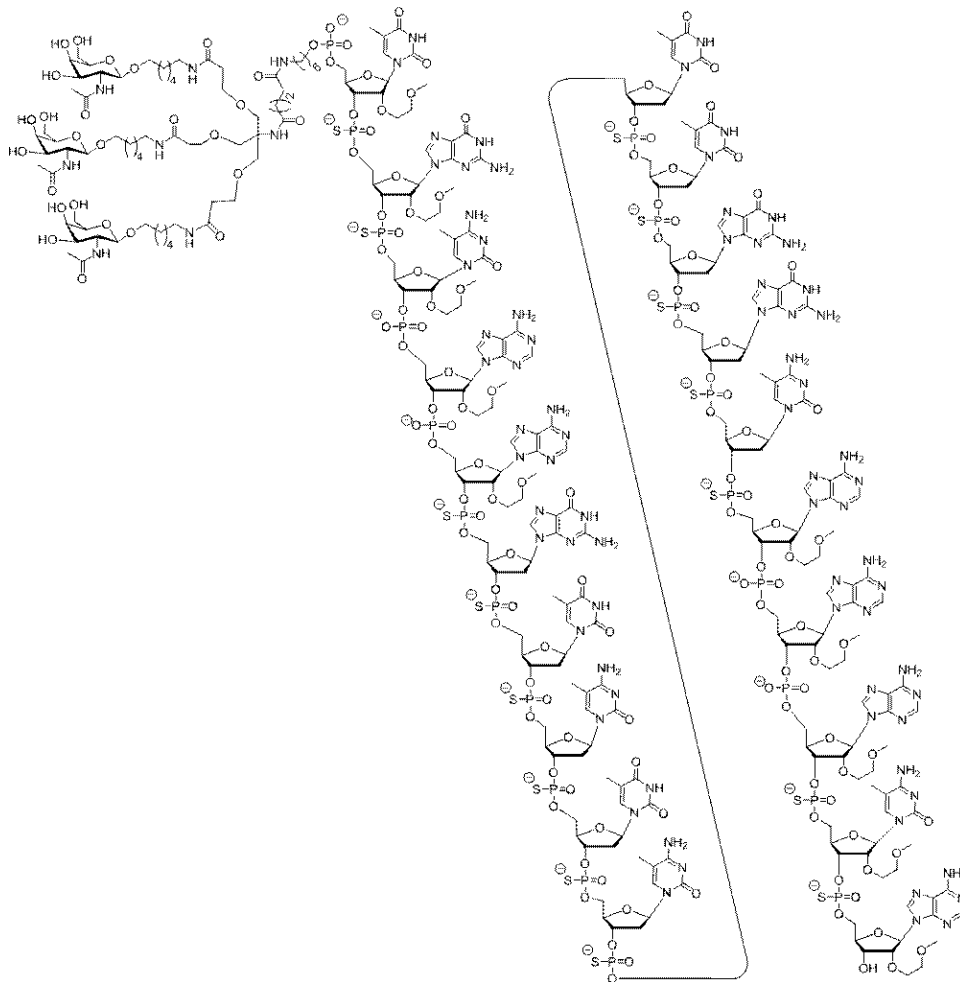
ある特定の実施形態では、ISIS 721744は、以下の化学構造によって記述される。

40

【0624】

50

【化 1 2 4】



【0 6 2 5】

ある特定のホットスポット領域

1. 配列番号10の核酸塩基27427～27466

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基27427～27466を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27466は、ホットスポット領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27466はアンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5 MOE及びc E tギャップマー、4-9-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-3 MOE及びc E tギャップマー、3-10-4 MOE及びc E tギャップマー、または3-10-3 MOE及びc E tギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0 6 2 6】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27466は、I S I S番号：530993、530994、530995、546251、546252、5

4 6 2 5 3、5 4 6 2 5 4、5 4 6 2 5 5、5 4 6 2 5 6、5 4 7 4 1 0、5 4 7 4 1 1、5 4 7 9 7 8、5 4 7 9 7 9、5 4 7 9 8 0、及び5 4 7 9 8 1によって標的とされる。

【0 6 2 7】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基2 7 4 2 7～2 7 4 6 6は、配列番号9 4、9 5、9 6、5 6 6、5 6 7、5 6 8、5 6 9、5 7 0、5 7 1、5 7 2、5 7 3、1 5 9 7、1 5 9 8、1 5 9 9、及び1 6 0 0によって標的とされる。

【0 6 2 8】

ある実施形態では、配列番号10の核酸塩基2 7 4 2 7～2 7 4 6 6を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*でPKK及び／またはタンパク質のレベルの減少を達成する。

【0 6 2 9】

2. 配列番号10の核酸塩基3 3 1 8 3～3 3 2 4 2

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基3 3 1 8 3～3 3 2 4 2を標的とするように設計する（核酸塩基1 1 1 6 9 3 0 0 1～1 1 1 7 3 0 0 0 0を切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_0 1 6 3 5 4. 1 9）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基3 3 1 8 3～3 3 2 4 2はホットスポット領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基3 3 1 8 3～3 3 2 4 2は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5 MOE及びc E tギャップマー、4-9-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-3 MOE及びc E tギャップマー、3-10-4 MOE及びc E tギャップマー、または3-10-3 MOE及びc E tギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0 6 3 0】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基3 3 1 8 3～3 3 2 4 2は、ISS番号：5 3 1 0 5 2、5 3 1 0 5 3、5 3 1 0 5 4、5 3 1 0 5 5、5 3 1 0 5 6、5 3 1 0 5 7、5 3 1 1 5 8、5 4 6 3 4 3、5 4 6 3 4 5、5 4 7 4 8 0、5 4 7 4 8 1、5 4 7 4 8 2、及び5 4 7 4 8 3によって標的とされる。

【0631】

ある特定の実施形態では、配列番号10の33183～33242は、配列番号155、156、157、158、159、160、261、702、703、704、705、706、及び707によって標的とされる。

【0632】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基33183～33242を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*で、PKK mRNA及び／またはタンパク質のレベルの減少を達成する。

【0633】

3. 配列番号10の核酸塩基30570～30610

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基30570～30610を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30570～30610は、ホットスポットの領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30570～30610は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5 MOE及びc E tギャップマー、4-9-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-4 MOE及びc E tギャップマー、4-10-3 MOE及びc E tギャップマー、3-10-4 MOE及びc E tギャップマー、または3-10-3 MOE及びc E tギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0634】

ある特定の実施形態では、配列番号10の30570～30610は、ISIS番号531026、546309、546310、546311、546313、547453、547454、547455、547456、547457、547458、548046、548047、548048、548049、及び548050によって標的とされる。

【0635】

ある特定の実施形態では、配列番号10の30570～30610は、配列番号129、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、1664、1665、1666年、1667、及び1668によって標的とされる。

【0636】

ある特定の実施形態であ、配列番号10の核酸塩基30570～30610を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*でPKK mRNA及び／またはタンパク質のレベルを減少させる。

【0637】

4. 配列番号10の核酸塩基27427～27520

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基27427～27520を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27520は、ホットスポット領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27520はアンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5 MOE及びcEtギャップマー、4-9-4 MOE及びcEtギャップマー、4-10-4 MOE及びcEtギャップマー、4-10-3 MOE及びcEtギャップマー、3-10-4 MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3 MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0638】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27520は、ISS番号530993～530999、546251～546256、546258～546260、546263、546265～546268、547410～547417、及び547978～547992によって標的とされる。

【0639】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基の27427～27520は、配列番号94～100、566～587、及び1597～1611によって標的と

10

20

30

40

50

される。

【0640】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27427～27520を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*でPKK及び／またはタンパク質のレベルの減少を達成する。

【0641】

5. 配列番号10の核酸塩基33085～33247

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基33085～33247を標的とするように設計する（核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_016354.19）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基33085～33247は、ホットスポットの領域である。ある特定の実施形態は、配列番号10の33085～33247は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5MOEギャップマー、4-9-4MOEギャップマー、4-10-4MOEギャップマー、4-10-3MOEギャップマー、3-10-4MOEギャップマー、または3-10-3MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5MOE及びcEtギャップマー、4-9-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-3MOE及びcEtギャップマー、3-10-4MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0642】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基33085～33247は、ISS番号531041～531158、546336、546339、546340、546343、546345、547474～547483、547778、548077～548082、及び548677～548678によって標的とされる。

【0643】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基33085～33247は、配列番号144～160、261、693～707、1256、1320～1325、2214、及び2215によって標的とされる。

【0644】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基33085～33247を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vitro*で、PKK及び／またはタンパク質レベルの減少を達成する。

【0645】

6. 配列番号10の核酸塩基30475～30639

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基30475～30639を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30475～30639は、ホットスポットの領域である。ある特定の実施形態は、配列番号10の核酸塩基30475～30639は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5 MOE及びcEtギャップマー、4-9-4 MOE及びcEtギャップマー、4-10-4 MOE及びcEtギャップマー、4-10-3 MOE及びcEtギャップマー、3-10-4 MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3 MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0646】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30475～30639は、ISS番号531021～531029、531146、546297、546299～546304、546306～546311、546313、546316～546319、547444～547462、548031、548032、及び548034～548056によって標的とされる。

【0647】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基30475～30639は、配列番号124～132、249、633～669、及び1650～1674によって標的とされる。

【0648】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30475～30639を標的とす

るアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、*in vivo*及び／または*in vitro*で、PKK及び／またはタンパク質のレベルの減少を達成する。

【0649】

7. 配列番号10の核酸塩基27362～27524

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基27362～27524を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、核酸塩基27362から27524は、PKKのエクソン9に対応する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27362～27524は、ホットスポットの領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27362～27524は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5MOEギャップマー、4-9-4MOEギャップマー、4-10-4MOEギャップマー、4-10-3MOEギャップマー、3-10-4MOEギャップマー、または3-10-3MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5MOE及びcEtギャップマー、4-9-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-3MOE及びcEtギャップマー、3-10-4MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0650】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27361～27524は、ISS番号530985～530999、546244、546247～546256、546258～546260、546263、546265～546268、547403～547417、547723、547968～547970、及び547972～547992によって標的とされる。

【0651】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基27361～27524は、配列番号86～100、554～587、1217、及び1588～1611によって標的とされる。

【0652】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基27362～27524を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*でPKK及び／またはタンパク質のレベルの減少を達成する。

【0653】

8. 配列番号10の核酸塩基33101～33240

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基33101～33240を標的とするように設計する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、核酸塩基33101～33240は、PKKのエクソン14に対応する（GENBANK寄託番号NT_016354.19、核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられた）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基33101～33240は、ホットスポット領域である。ある特定の実施形態は、配列番号10の核酸塩基33101～33240は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5MOEギャップマー、4-9-4MOEギャップマー、4-10-4MOEギャップマー、4-10-3MOEギャップマー、3-10-4MOEギャップマー、または3-10-3MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5MOE及びcEtギャップマー、4-9-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-3MOE及びcEtギャップマー、3-10-4MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドはホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0654】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基33101～33240は、ISIS番号531041～531158、546336、546339、546340、546343、546345、547474～547483、548077～548082、及び548678～548678によって標的とされる。

【0655】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基の核酸塩基33101～33240は、配列番号144～160、261、693～707、1320～1325、及び22

15によって標的とされる。

【0656】

ある実施形態では、配列番号10の核酸塩基33101～33240を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも30%、少なくとも31%、少なくとも32%、少なくとも33%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも37%、少なくとも38%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも41%、少なくとも42%、少なくとも43%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも47%、少なくとも48%、少なくとも49%、少なくとも50%、少なくとも51%、少なくとも52%、少なくとも53%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも57%、少なくとも58%、少なくとも59%、少なくとも60%、少なくとも61%、少なくとも62%、少なくとも63%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも67%、少なくとも68%、少なくとも69%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%、*in vitro*及び／または*in vivo*で、PKK及び／またはタンパク質レベルの減少を達成する。

【0657】

9. 配列番号10の核酸塩基30463～30638

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号10の核酸塩基30463～30638を標的とするように設計する（核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_016354.19）。ある特定の実施形態では、核酸塩基30463～30638はPKKのエクソン12に対応する（核酸塩基111693001～111730000を切り捨てられたGENBANK寄託番号NT_016354.19）。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30463～30638は、ホットスポット領域である。ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30463～30638は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的とされる。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが15、16、17、18、19、または20の核酸塩基である。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは5-10-5MOEギャップマー、4-9-4MOEギャップマー、4-10-4MOEギャップマー、4-10-3MOEギャップマー、3-10-4MOEギャップマー、または3-10-3MOEギャップマーである。ある特定の実施形態では、ギャップマーは、5-10-5MOE及びcEtギャップマー、4-9-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-4MOE及びcEtギャップマー、4-10-3MOE及びcEtギャップマー、3-10-4MOE及びcEtギャップマー、または3-10-3MOE及びcEtギャップマーである。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって連結されている。

【0658】

ある特定の実施形態では、配列番号10の核酸塩基30463～30638は、ISS番号531021～531029、531146、546297、546299～546304、546306～546311、546313、546316～546319、547444～547462、548031、548032、及び548034～548056によって標的とされる。

【0659】

ある特定の実施形態では、配列番号 10 の核酸塩基の核酸塩基 30463～30638 は、配列番号 124～132、249、633～669、及び 1650～1674 によって標的とされる。

【0660】

ある実施形態では、配列番号 10 の核酸塩基 30463～30638 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも 30%、少なくとも 31%、少なくとも 32%、少なくとも 33%、少なくとも 34%、少なくとも 35%、少なくとも 36%、少なくとも 37%、少なくとも 38%、少なくとも 39%、少なくとも 40%、少なくとも 41%、少なくとも 42%、少なくとも 43%、少なくとも 44%、少なくとも 45%、少なくとも 46%、少なくとも 47%、少なくとも 48%、少なくとも 49%、少なくとも 50%、少なくとも 51%、少なくとも 52%、少なくとも 53%、少なくとも 54%、少なくとも 55%、少なくとも 56%、少なくとも 57%、少なくとも 58%、少なくとも 59%、少なくとも 60%、少なくとも 61%、少なくとも 62%、少なくとも 63%、少なくとも 64%、少なくとも 65%、少なくとも 66%、少なくとも 67%、少なくとも 68%、少なくとも 69%、少なくとも 70%、少なくとも 71%、少なくとも 72%、少なくとも 73%、少なくとも 74%、少なくとも 75%、少なくとも 76%、少なくとも 77%、少なくとも 78%、少なくとも 79%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99%、*in vitro* 及び／または *in vivo* で、PKK 及び／またはタンパク質レベルの減少を達成する。

【実施例】

【0661】

参照による非限定的な開示と組み込み

本明細書に記載のある特定の化合物、組成物及び方法を、ある特定の実施形態に従って具体的に説明してきたが、以下の実施例は、本明細書に記載の化合物を例示するためにのみあり、これを限定するものではない。本出願に記載の参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0662】

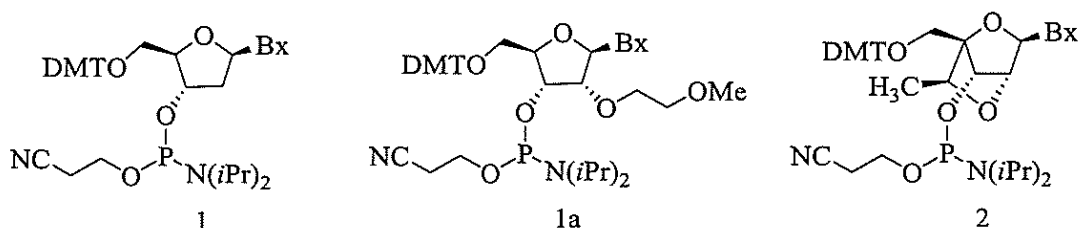
以下の実施例は、本開示のある特定の実施形態を例証するものであり、限定するものではない。さらに、具体的実施形態を記載する場合、本発明者らは、それらの具体的実施形態の一般的応用を企図している。例えば、ある特定モチーフを有するオリゴヌクレオチドの開示は、そのモチーフまたは同様のモチーフを有する他のオリゴヌクレオチドの合理的裏付けになる。同様に、例えば、ある特定高親和性修飾がある特定位置に見られる場合は、別段の表示がある場合を除き、同じ位置での他の高親和性修飾も好適であるとみなされる。

【0663】

実施例 1：ホスホラミダイト（化合物 1、1a、及び 2）の調製のための一般的方法

【0664】

【化 125】



Bx は複素環式塩基である

10

20

30

40

50

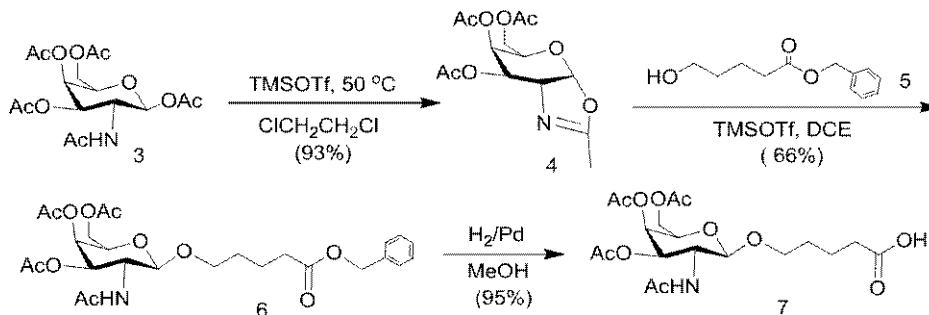
化合物 1、1 a、及び 2 を、本明細書に記載する当技術分野で周知の手順どおりに調製した (Seth et al., Bioorg. Med. Chem., 2011, 21 (4), 1122-1125, J. Org. Chem., 2010, 75 (5), 1569-1581, Nucleic Acids Symposium Series, 2008, 52 (1), 553-554)、ならびに公開された PCT 国際出願 (国際公開第 WO 2011/115818 号、同第 WO 2010/077578 号、同第 WO 2010/036698 号、同第 WO 2009/143369 号、同第 WO 2009/006478、及び同第 WO 2007/090071 号)、ならびに米国特許第 7,569,686 号も参照のこと)。

【0665】

実施例 2：化合物 7 の調製

【0666】

【化 126】



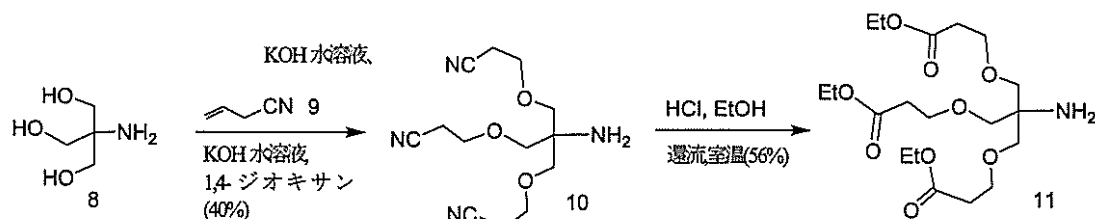
化合物 3 (2-アセトアミド-1,3,4,6-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノースまたはガラクトサミンペンタアセテート) は、市販のものである。化合物 5 を公開された手順 (Weber et al., J. Med. Chem., 1991, 34, 2692) に従って調製した。

【0667】

実施例 3：化合物 11 の調製

【0668】

【化 127】



化合物 8 及び 9 は、市販のものである。

【0669】

実施例 4：化合物 18 の調製

【0670】

10

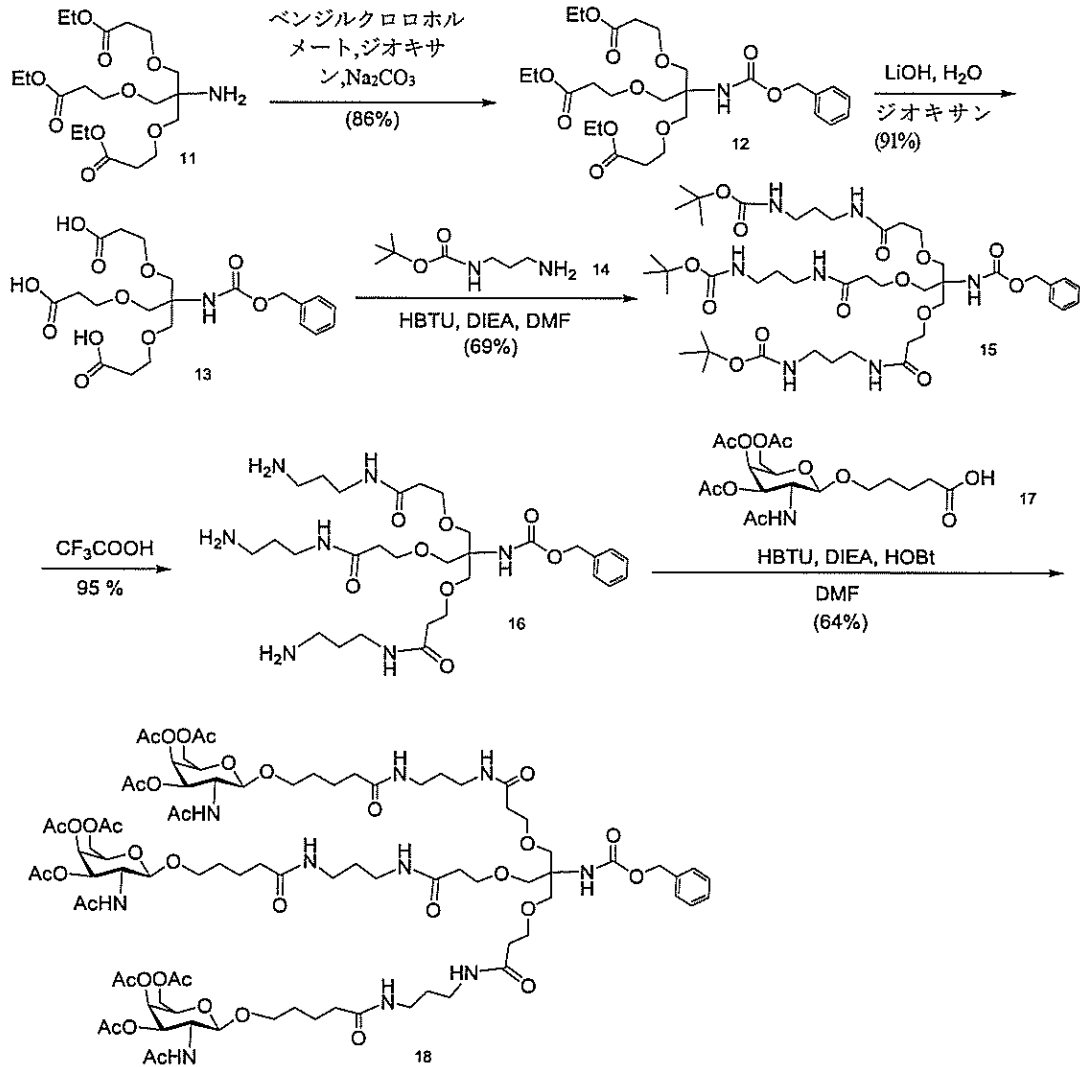
20

30

40

50

【化 1 2 8】



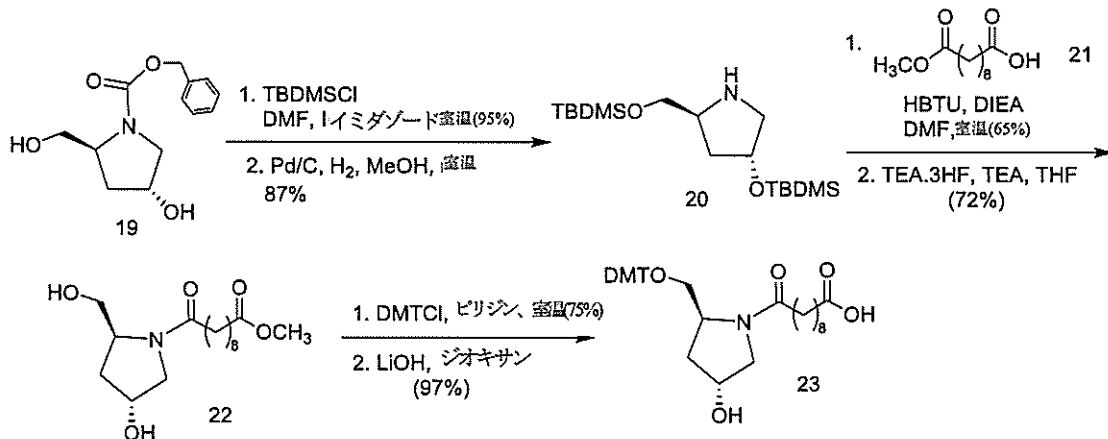
化合物 11 を実施例 3 に例証される手順どおりに調製した。化合物 14 は、市販のものである。化合物 17 を、Rensen et al. (J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808) によって報告された同様の手順を用いて調製した。

【0671】

実施例 5：化合物 23 の調製

【0672】

【化 1 2 9】



10

20

30

40

50

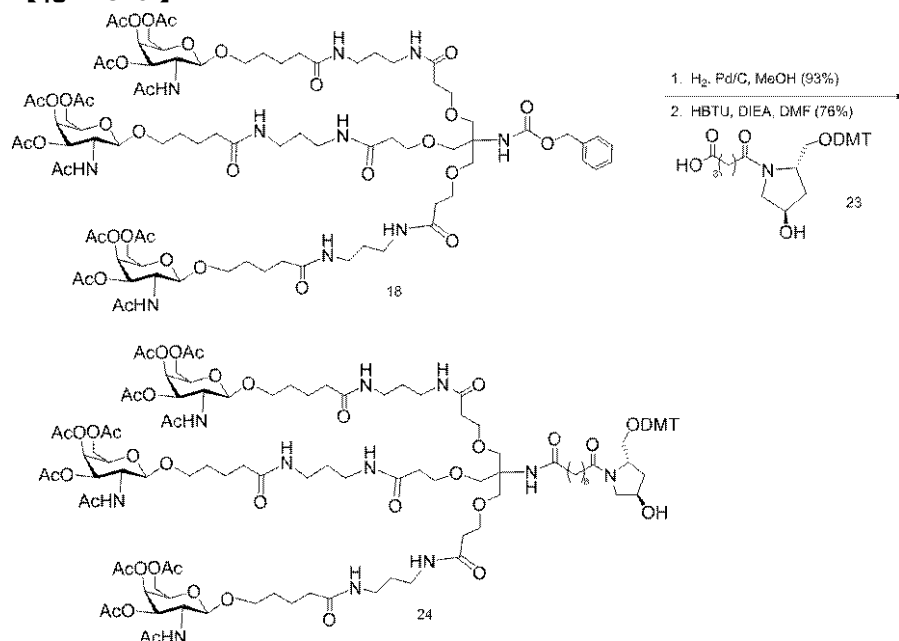
化合物 19 及び 21 は、市販のものである。

【0673】

実施例 6：化合物 24 の調製

【0674】

【化130】



10

20

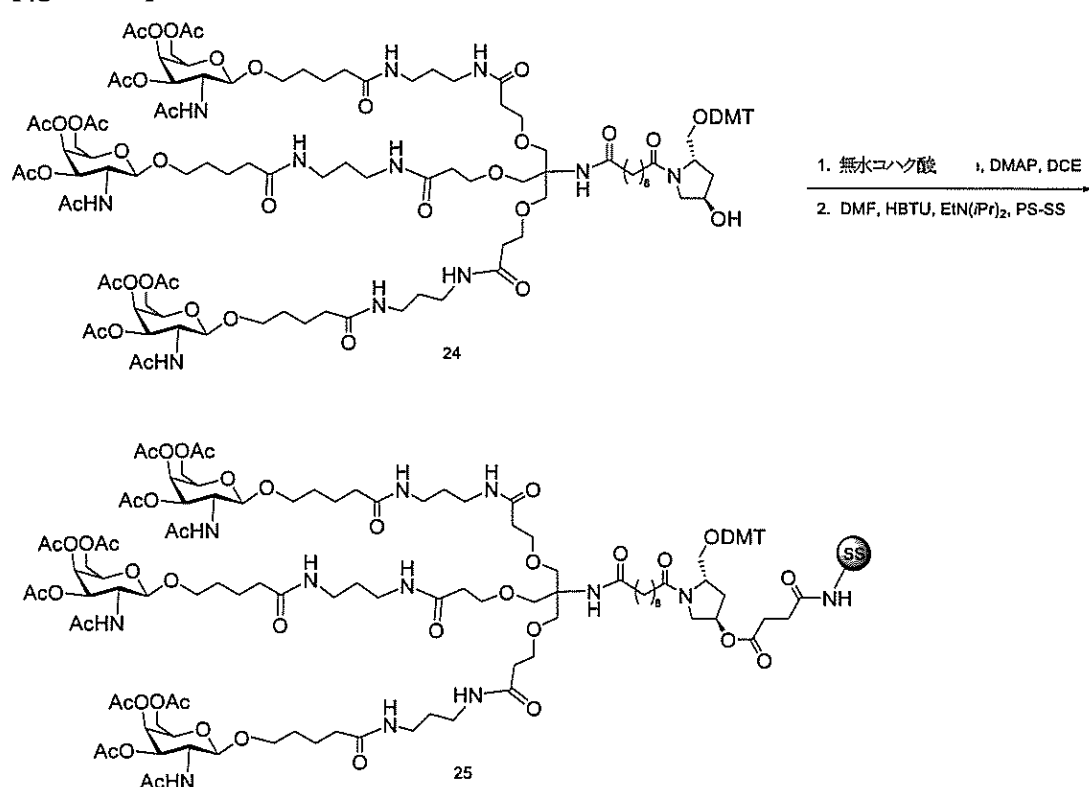
化合物 18 及び 23 を実施例 4 及び 5 に例証される手順どおりに調製した。

【0675】

実施例 7：化合物 25 の調製

【0676】

【化131】



30

40

化合物 24 を実施例 6 に例証される手順どおりに調製した。

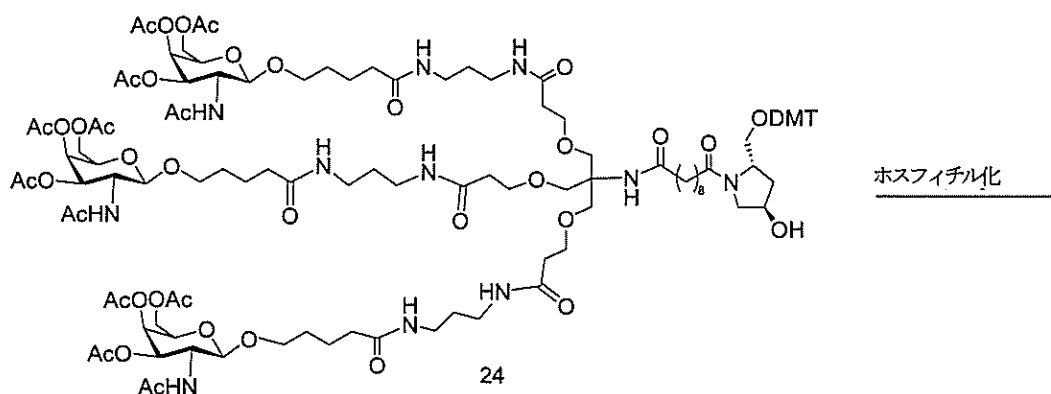
【0677】

50

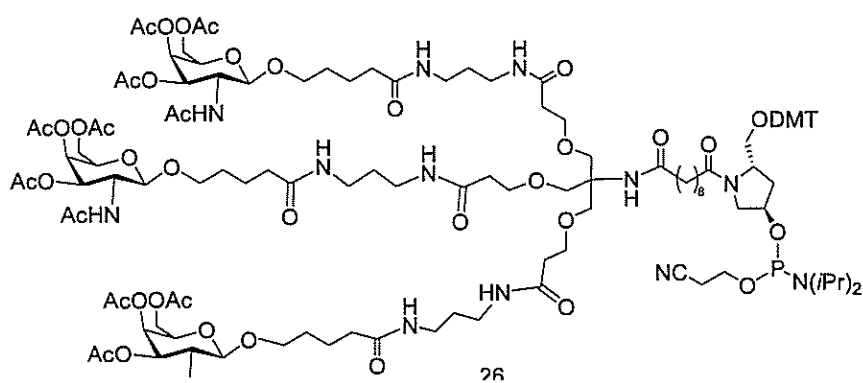
実施例 8：化合物 26 の調製

【0678】

【化132】



10



20

化合物 24 を実施例 6 に例証される手順どおりに調製する。

【0679】

実施例 9：3' 末端に GalNAc-1 を含む共役 ASO（化合物 29）の一般的調製

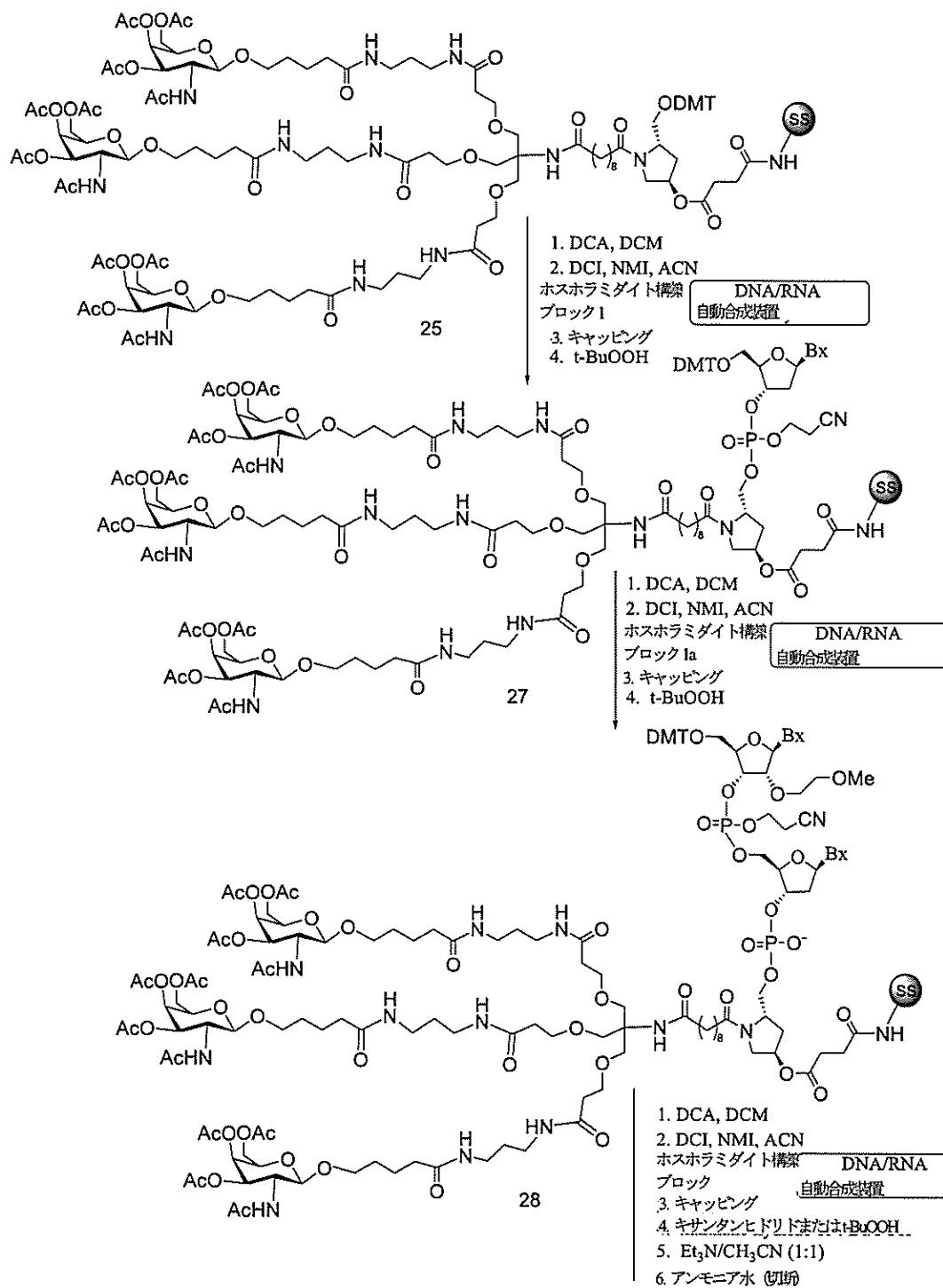
【0680】

30

40

50

【化 1 3 3】



10

20

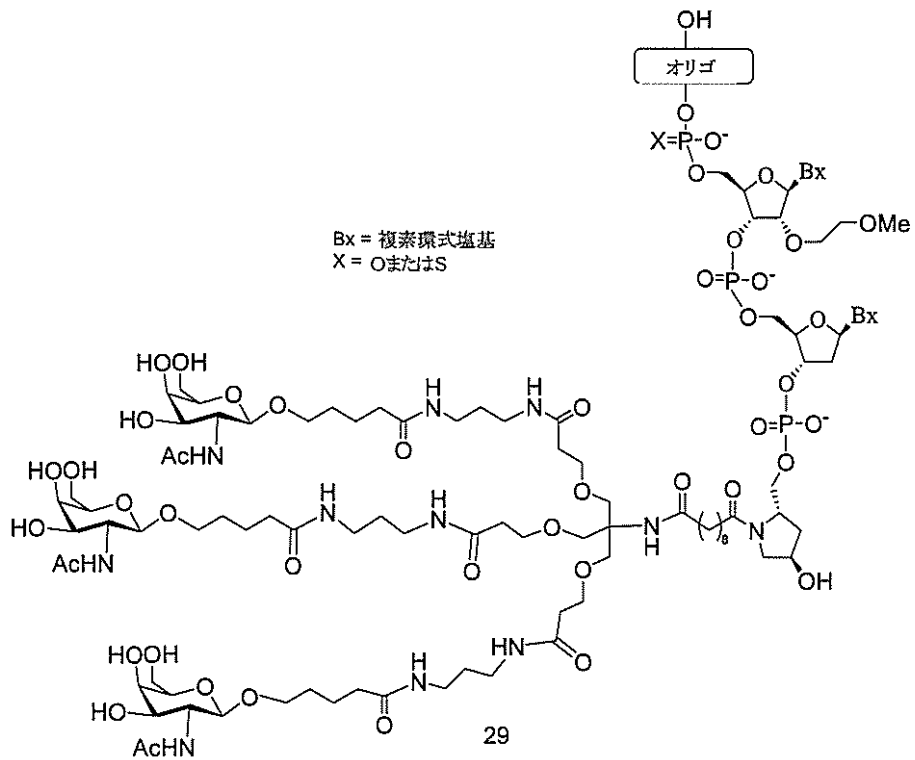
30

40

【 0 6 8 1】

50

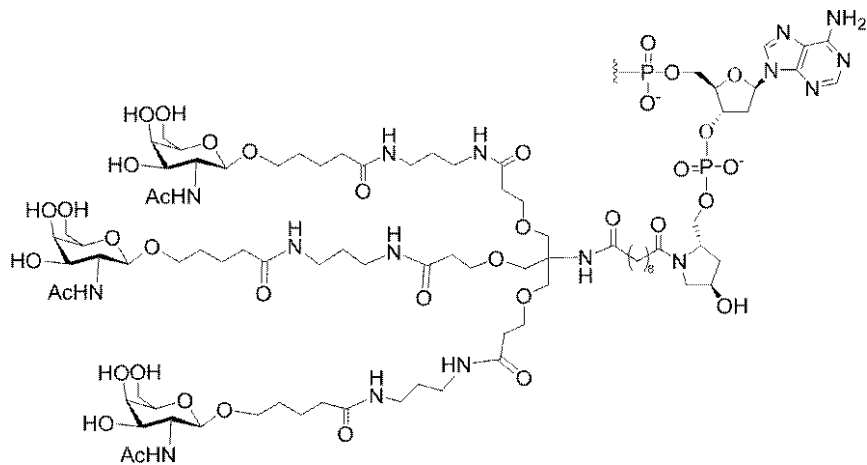
【化 1 3 4】



保護された GalNAc3-1 は以下の構造を有する。

【0682】

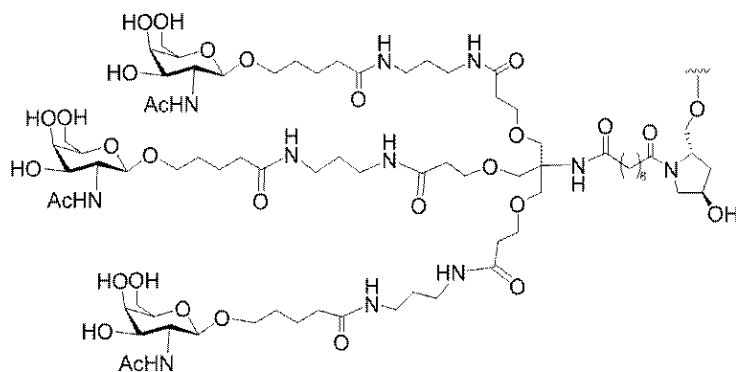
【化 1 3 5】



共役基 GalNAc3-1 (GalNAc3-1a) の GalNAc3 クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc3-1a は、以下の式を有する。

【0683】

【化 1 3 6】



10

【 0 6 8 4】

固体支持体に結合された保護GalNAc₃-1（化合物25）を実施例7に例証される手順どおりに調製した。3'末端にGalNAc₃-1を含むオリゴマー化合物29を、自動DNA/RNA合成における標準的手順を用いて調製した（Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627を参照のこと）。ホスホラミダイト構築ブロック（化合物1及び1a）を実施例1に例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて既定の配列及び組成を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、本明細書に記載するギャプトオリゴマー化合物を調製することができる。そのようなギャプトオリゴマー化合物は、任意の所与の標的によって指示される既定の組成及び塩基配列を有する。

20

【 0 6 8 5】

実施例10：5'末端にGalNAc₃-1を含む共役ASO（化合物34）の一般的調製

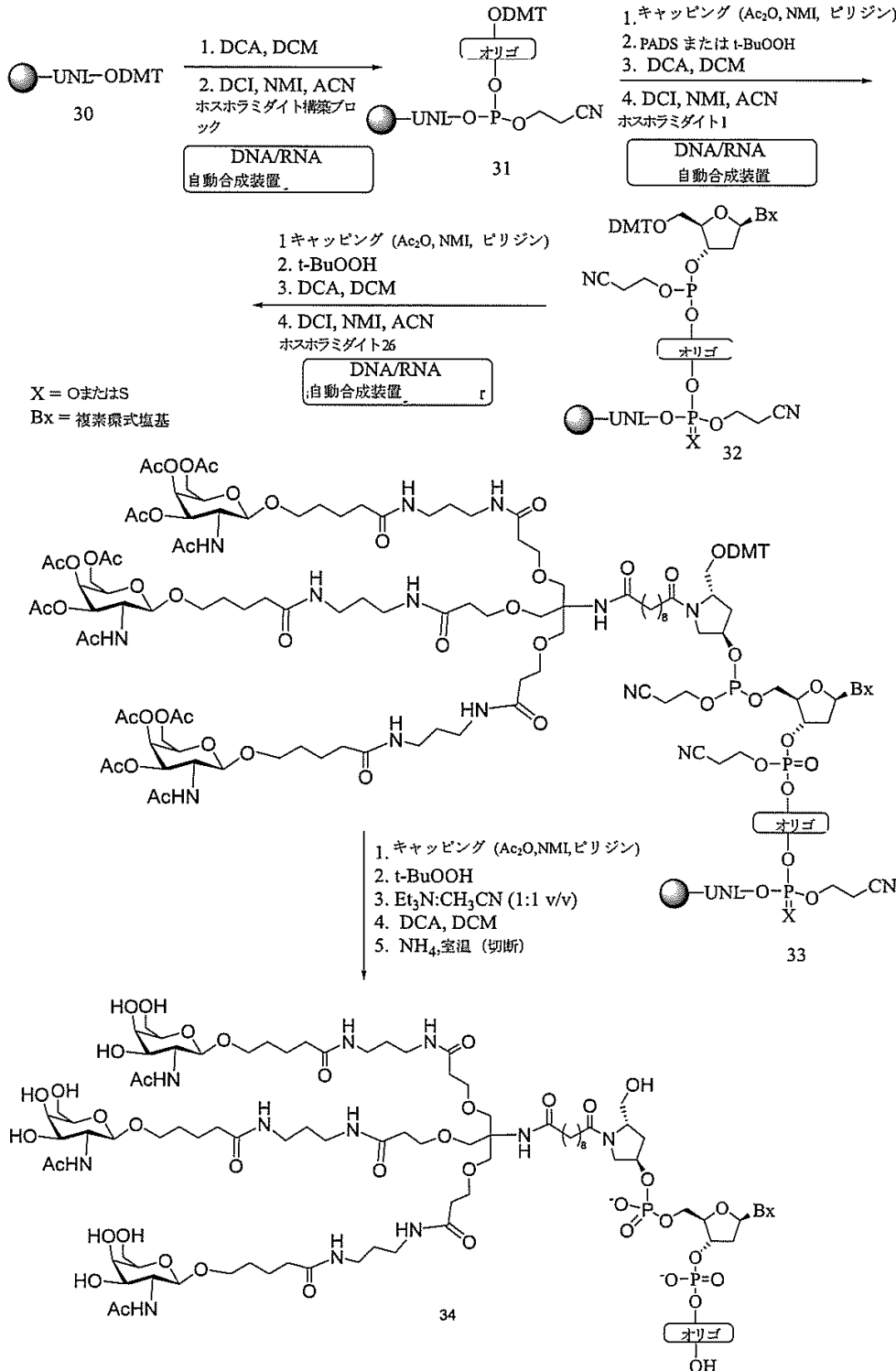
【 0 6 8 6】

30

40

50

【化 1 3 7】



Uny linker (商標) 30 は、市販のものである。5' 末端に GalNAc₃-1 クラスターを含むオリゴマー化合物 34 を、自動 DNA/RNA 合成における標準の手順を用いて調製する (Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627 を参照のこと)。ホスホラミダイト構築ブロック (化合物 1 及び 1a) を実施例 1 に例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて既定の配列及び組成を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、本明細書に記載するギャップトオリゴマー化合物を調製することができる。そのようなギャップトオ

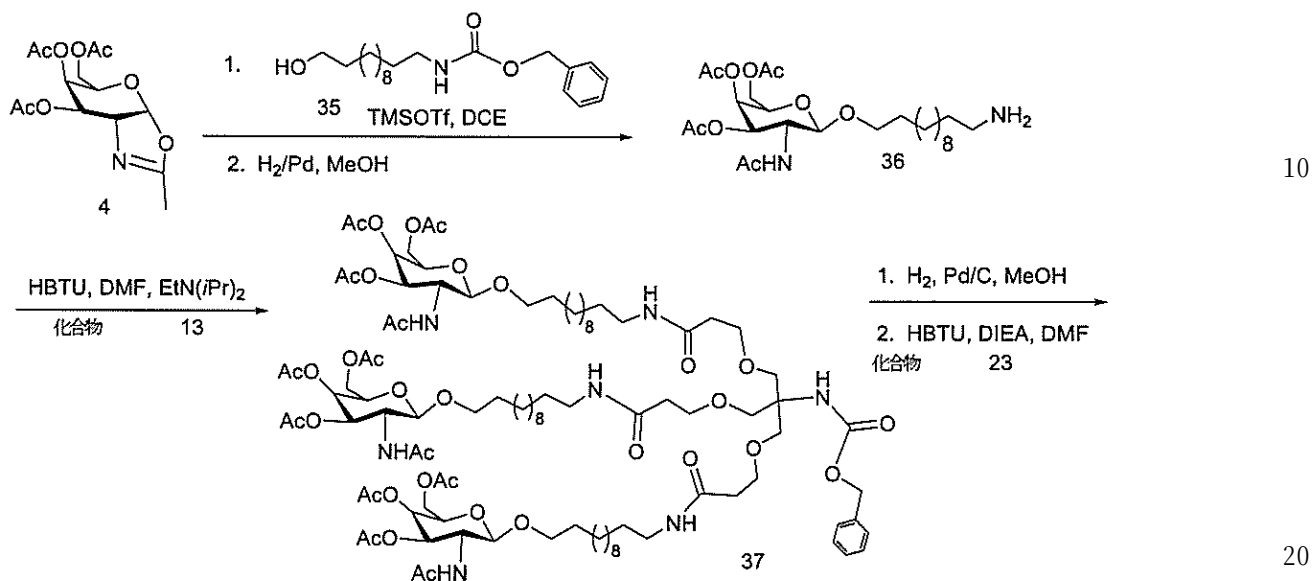
リゴマー化合物は、任意の所与の標的によって決まる既定の組成及び塩基配列を有する。

【 0 6 8 7 】

実施例 1 1 : 化合物 3 9 の調製

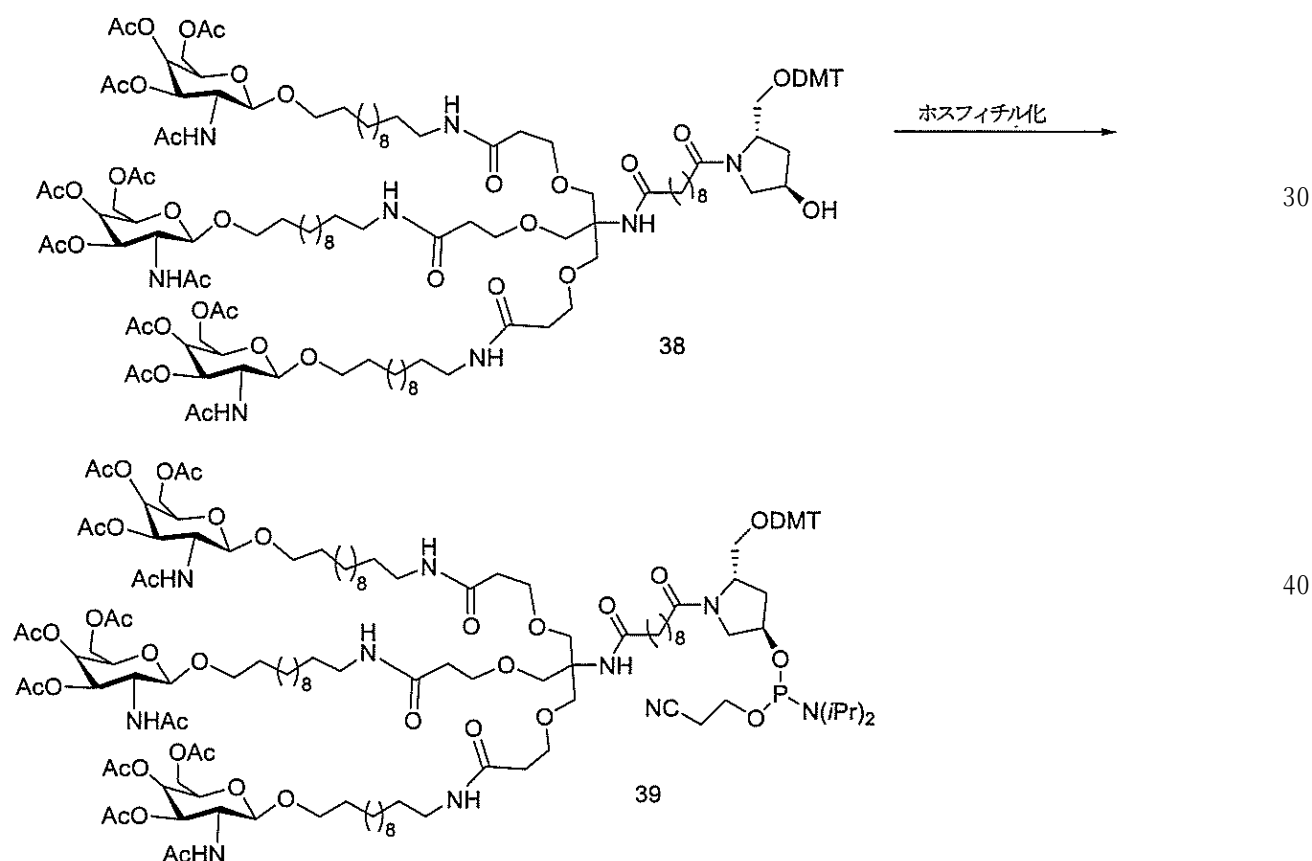
【 0 6 8 8 】

【 化 1 3 8 】



【 0 6 8 9 】

【 化 1 3 9 】



化合物 4、13、及び 23 を実施例 2、4、及び 5 に例証される手順どおりに調製した。
。化合物 35 を Rouchaud et al., Eur. J. Org. Chem., 20

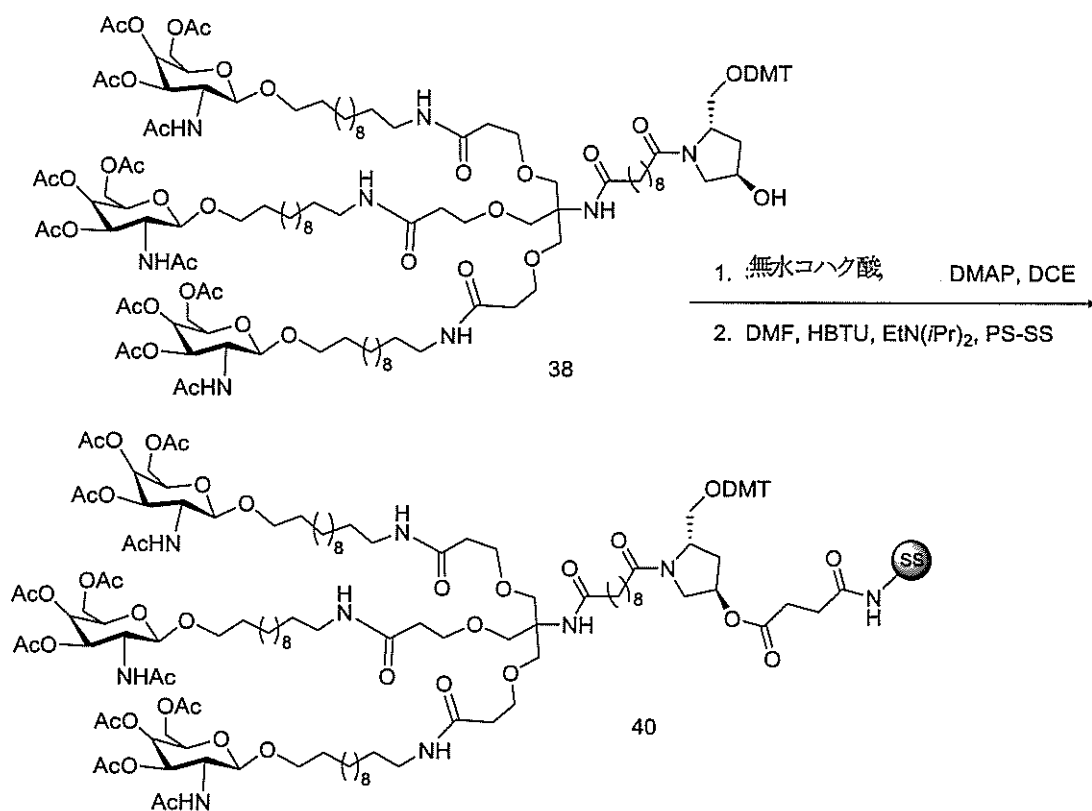
11, 12, 2346-2353に公開された同様の手順を用いて調製する。

【0690】

実施例12：化合物40の調製

【0691】

【化140】



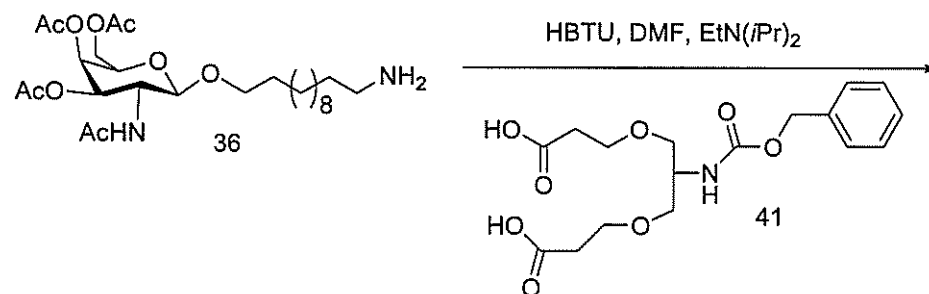
化合物38を実施例11に例証される手順どおりに調製する。

【0692】

実施例13：化合物44の調製

【0693】

【化141】



【0694】

10

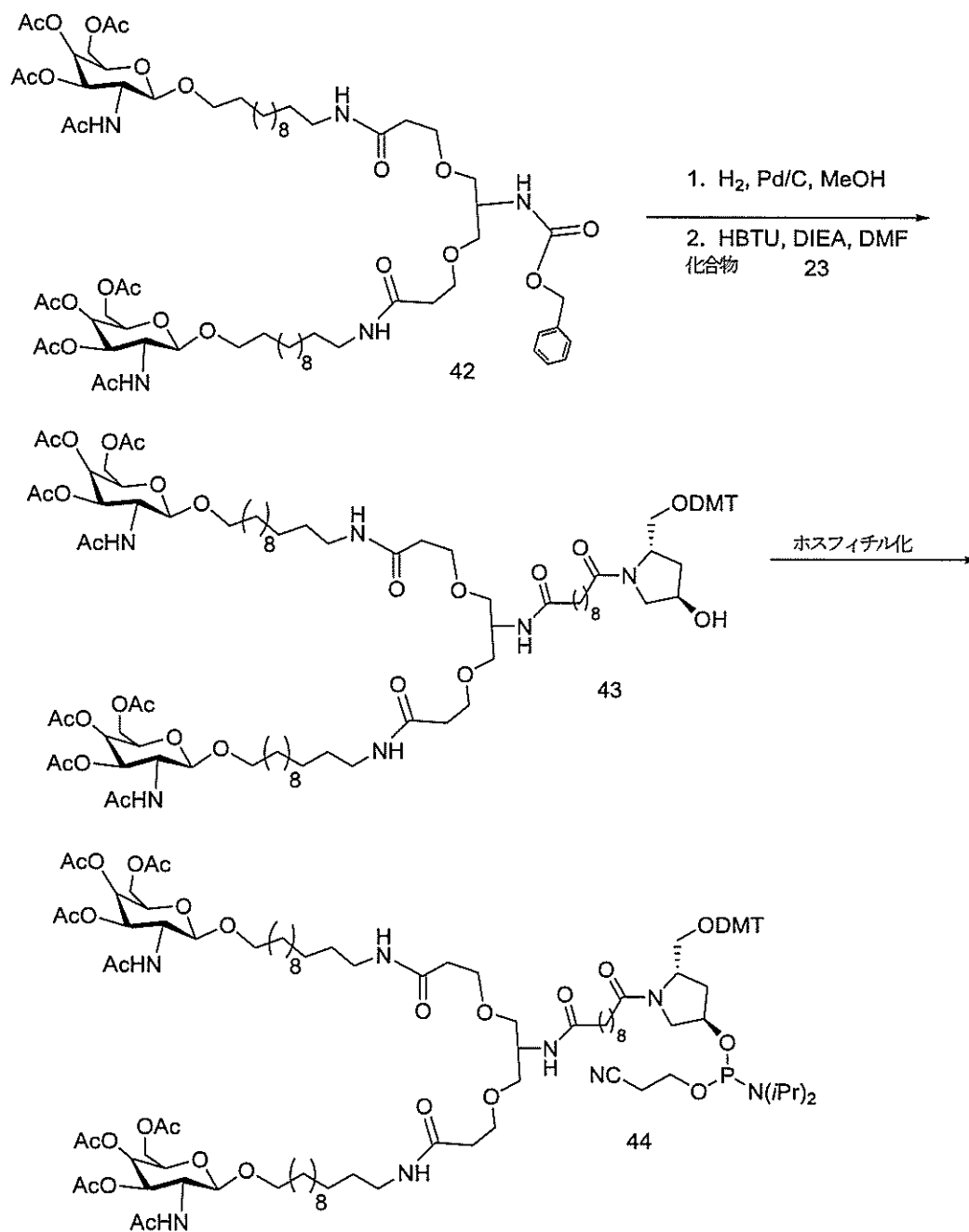
20

30

40

50

【化 1 4 2】



10

20

30

化合物 2 3 及び 3 6 を実施例 5 及び 1 1 に例証される手順どおりに調製する。化合物 4 1 を、国際公開第 WO 2 0 0 9 0 8 2 6 0 7 号に公開された同様の手順を用いて調製する。

【 0 6 9 5】

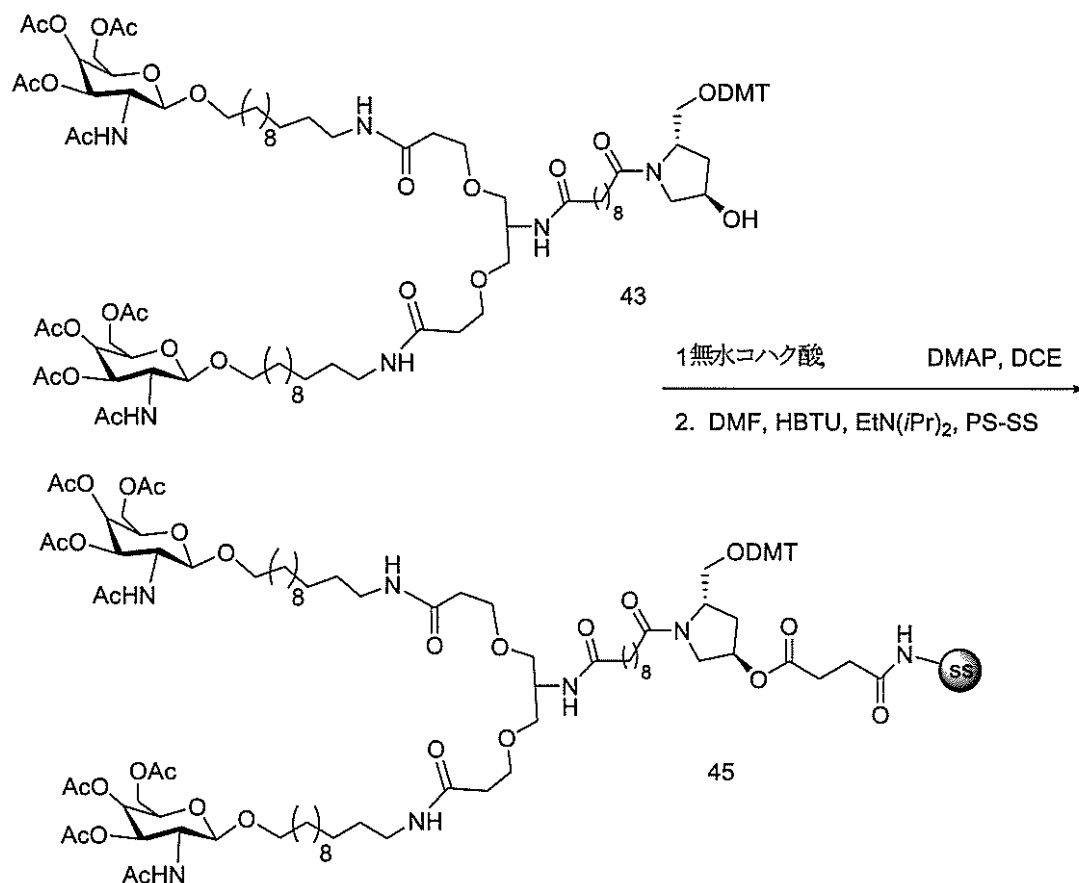
実施例 1 4：化合物 4 5 の調製

【 0 6 9 6】

40

50

【化 1 4 3】



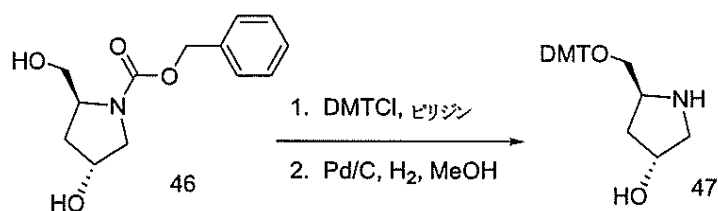
化合物 4 3 を実施例 1 3 に例証される手順どおりに調製する。

【 0 6 9 7】

実施例 1 5 : 化合物 4 7 の調製

【 0 6 9 8】

【化 1 4 4】



化合物 4 6 は、市販のものである。

【 0 6 9 9】

実施例 1 6 : 化合物 5 3 の調製

【 0 7 0 0】

10

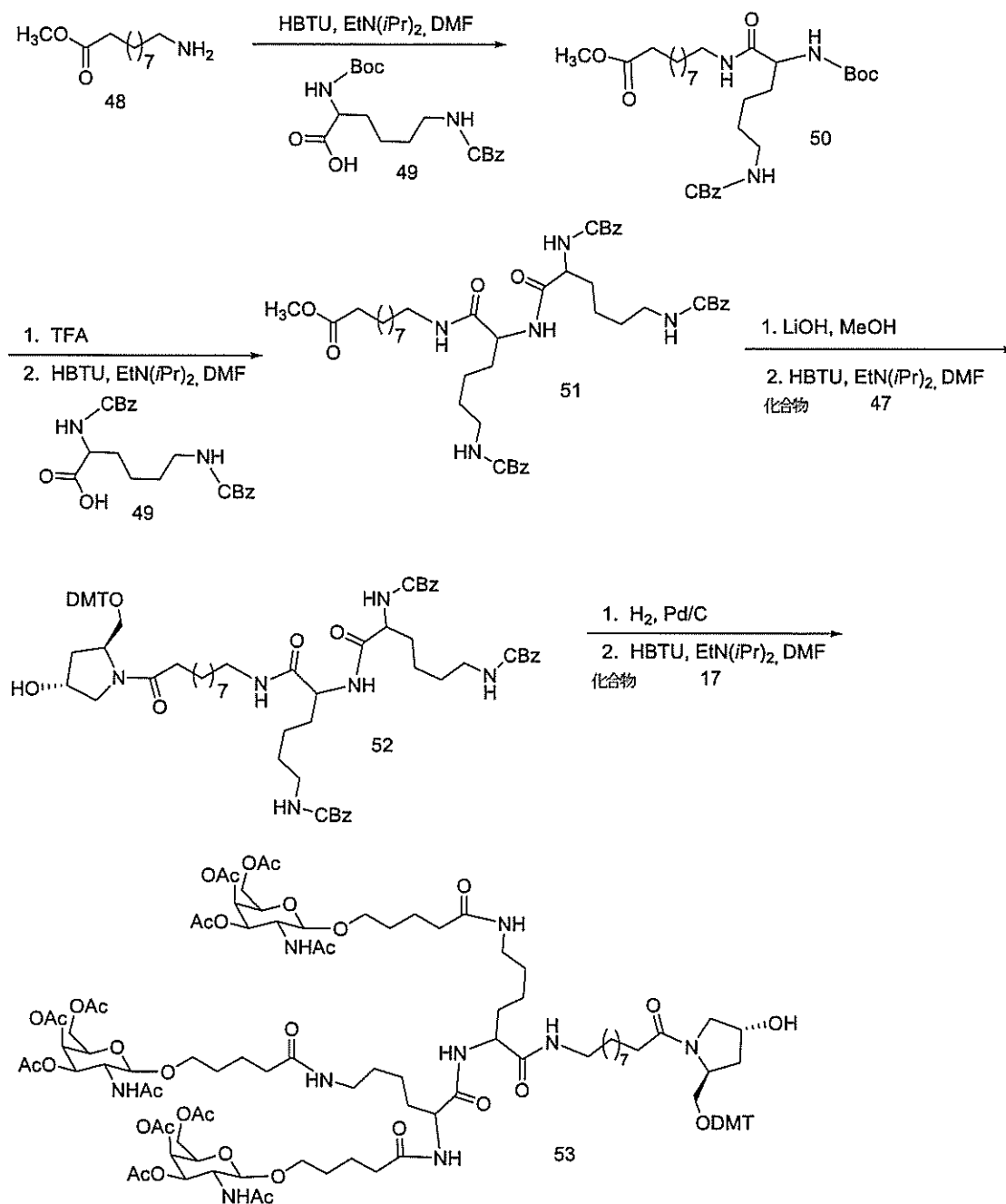
20

30

40

50

【化 1 4 5】



化合物 4 8 及び 4 9 は、市販のものである。化合物 1 7 及び 4 7 を実施例 4 及び 1 5 に例証される手順どおりに調製する。

【 0 7 0 1】

実施例 1 7：化合物 5 4 の調製

【 0 7 0 2】

10

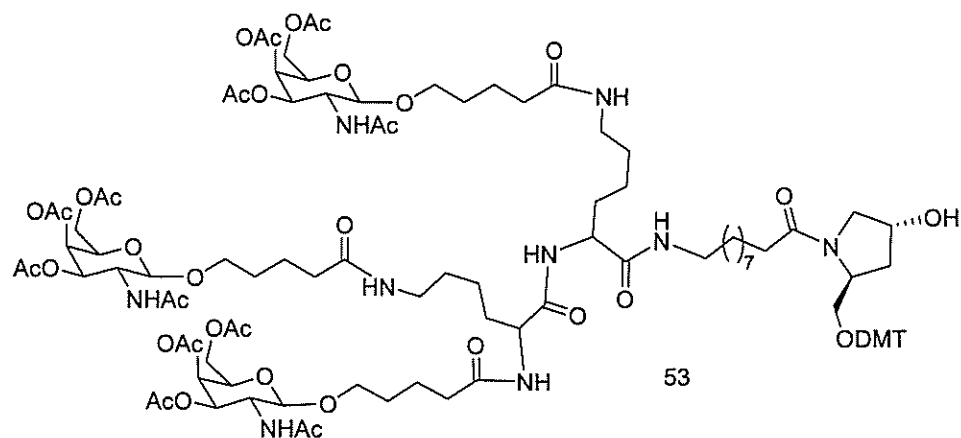
20

30

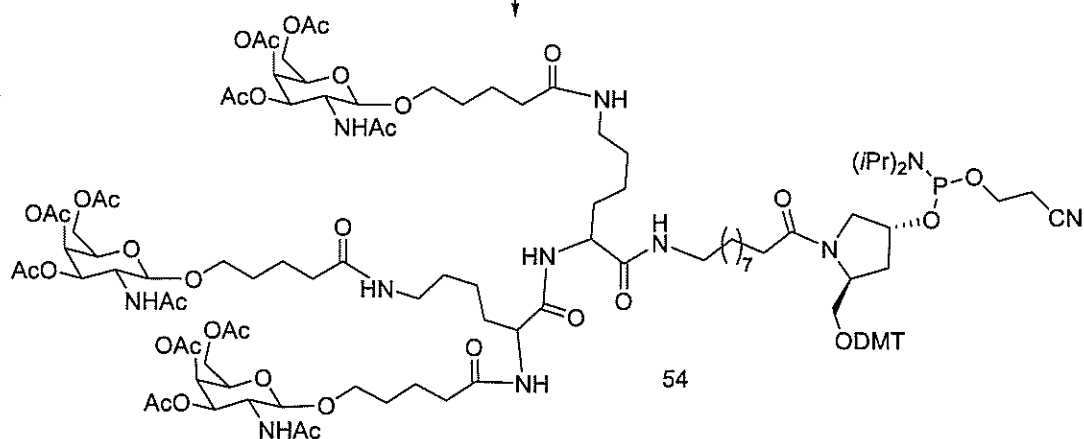
40

50

【化 1 4 6】



ホスフィチル化



化合物 53 を実施例 16 に例証される手順どおりに調製する。

【 0 7 0 3】

実施例 18：化合物 55 の調製

【 0 7 0 4】

10

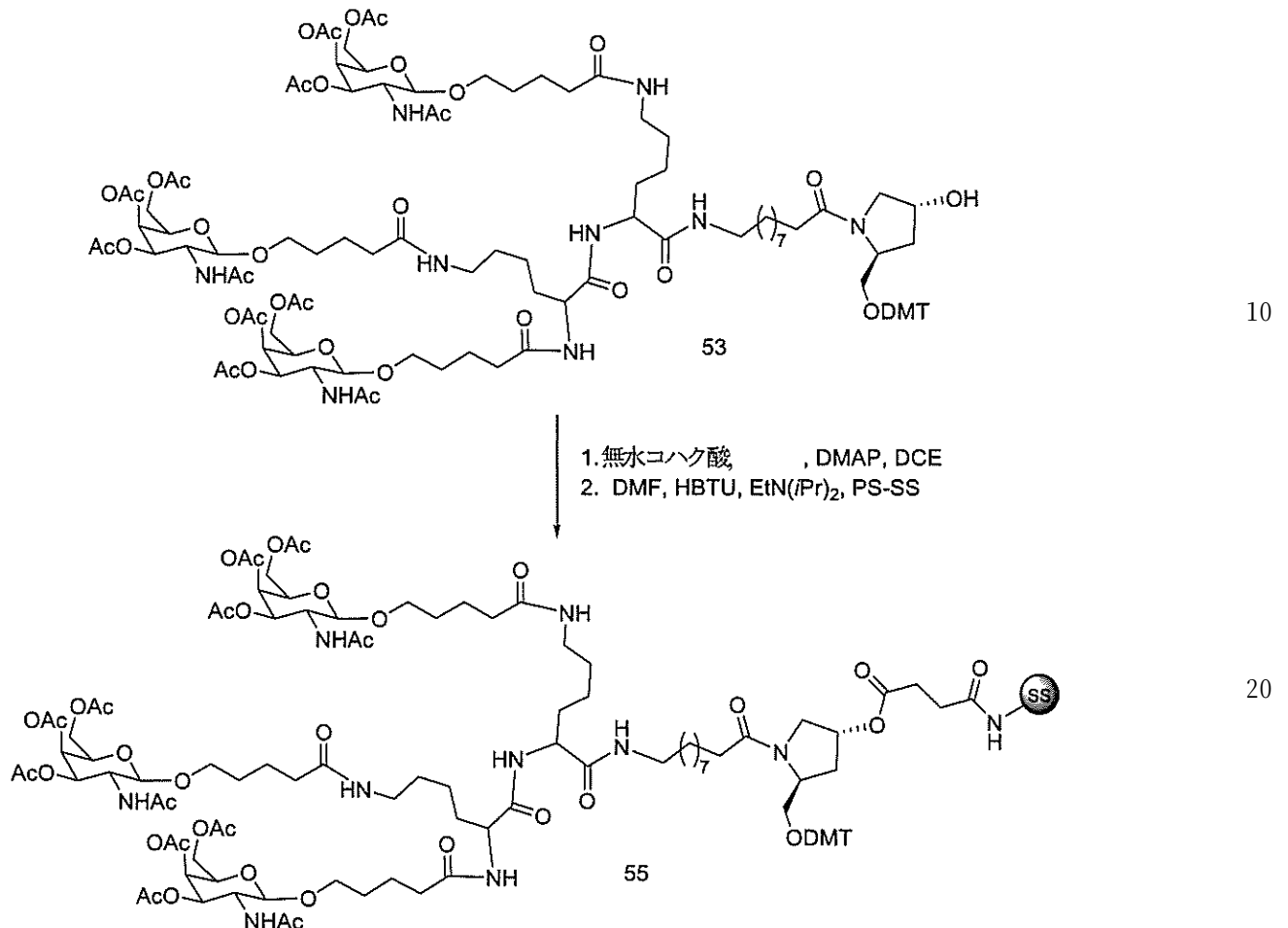
20

30

40

50

【化 1 4 7】



化合物 53 を実施例 16 に例証される手順どおりに調製する。

【0705】

実施例 19：固相技法による 3' 位に GalNAc₃-1 を含む共役 ASO の調製のための一般的方法 (ISIS 647535、647536、及び 651900 の調製)

別段の明示がある場合を除き、オリゴマー化合物の合成に用いるすべての試薬及び溶液を商業的供給源から購入する。標準のホスホラミダイト構築ブロック及び固体支持体を、例えば、T、A、G、及び mC 残基を含む、ヌクレオシド残基の組み込みのために用いる。無水アセトニトリル中のホスホラミダイトの 0.1 M 溶液を b-D-2'-デオキシリボヌクレオシド及び 2'-MOE に用いた。

【0706】

カラムに充填した GalNAc₃-1 負荷 VIMAD 固体支持体 (110 μmol/g、Guzaev et al., 2003) でのホスホラミダイトカップリング法により、ASO 合成を、ABI 394 合成装置 (1~2 μmol の規模) または GE Healthcare Bioscience AKTA オリゴパイロット合成装置 (40~200 μmol の規模) で実行した。このカップリングステップでは、固体支持体の負荷量に対して 4 倍量のホスホラミダイトを送達し、ホスホラミダイト縮合を 10 分間行った。他のすべてのステップは、製造業者から提供された標準のプロトコルに従った。トルエン中の 6% ジクロロ酢酸溶液を用いて、ヌクレオチドの 5'-ヒドロキシル基からジメチルトリチル (DMT) 基を除去した。カップリングステップ中、無水 CH₃CN 中の 4,5-ジシアノイミダゾール (0.7 M) を活性化剤として用いた。ホスホロチオエート連結部を、3 分間の接触時間で、1:1 のピリジン/CH₃CN 中のキサンタンヒドリドの 0.1 M 溶液による硫化によって導入した。6% の水を含む CH₃CN 中の 20% の tert-ブチルヒドロペルオキシドの溶液を酸化剤として用いて、12 分間の接触時間で、ホスホ

ジエステルヌクレオシド間連結部を得た。

【0707】

所望の配列が構築された後、シアノエチルホスフェート保護基を、45分間の接触時間で、トリエチルアミンとアセトニトリルの1:1 (v/v) の混合物を用いて脱保護した。固体支持体に結合されたASOをアンモニア水(28~30重量%)中に懸濁し、55℃で6時間加熱した。

【0708】

その後、非結合型ASOを濾過し、アンモニアを沸去した。残渣を強アニオン交換カラムでの高圧液体クロマトグラフィーによって精製した(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q、30μm、2.54×8cm、A=30%CH₃CN水溶液中100mM酢酸アンモニウム、B=A中1.5M NaBr、60分後0~40%のB、流量14mL/分-1、λ=260nm)。残渣を逆相カラムでのHPLCにより脱塩して、固体支持体への初期負荷量に基づいて15~30%の単離収率で所望のASOを得た。ASOを、Agilent 1100 MSDシステムを用いたイオン対HPLC/MS分析によって特徴付けた。

【0709】

当技術分野で周知の標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて共役体を含まないアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成した。

【0710】

これらの方法を用いて、ApoC IIIを標的とする3個の別個のアンチセンス化合物を調製した。以下の表17に要約されるように、ApoC IIIを標的とする3個のアンチセンス化合物のそれぞれは、同一の核酸塩基配列を有し、ISIS 304801は、すべてがホスホロチオエート連結部である5-10-5MOEギャップマーであり、ISIS 647535は、GalNAc₃-1をその3'末端で共役させたことを除いて、ISIS 304801と同一であり、ISIS 647536は、その化合物の特定のヌクレオシド間連結部がホスホジエステル連結部であることを除いて、ISIS 647535と同一であった。表17にさらに要約されるように、SRB-1を標的とする2つの別個のアンチセンス化合物を合成した。ISIS 440762は、すべてがホスホロチオエートヌクレオシド間連結部である2-10-2cEtギャップマーであり、ISIS 651900は、その3'末端にGalNAc₃-1を含めたことを除いて、ISIS 440762と同一であった。

【0711】

【表1】

表17

ApoC III及びSRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	標的	計算された質量	観察された質量	配列番号
ISIS 304801	A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	ApoC III	7165.4	7164.4	2248
ISIS 647535	A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _{cs} A _{do} -GalNAc ₃ -I _n	ApoC III	9239.5	9237.8	2249
ISIS 647536	A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _{cs} A _{do} -GalNAc ₃ -I _n	ApoC III	9142.9	9140.8	2249
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	SRB-I	4647.0	4646.4	2250
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} A _{do} -GalNAc ₃ -I _n	SRB-I	6721.1	6719.4	2251

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₂二環式ヌクレオシド(例えば、cEt)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)

を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、
-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを
示す。「GalNAc₃-1」は、先の実施例9に示された構造を有する共役基を示す。
GalNAc₃-1が、ASOを共役体の残りの部分に連結させる切断可能なアデノシン
を含み、「GalNAc₃-1a」と指定されることに留意されたい。上述の表ではこの
命名法を用いて、共役体の一部であるアデノシンを含む全核酸塩基配列を示す。したがっ
て、上述の表において、「Ado」を省略して「GalNAc₃-1」で終了する配列を
列記することもできる。下付き文字「a」を用いて切断可能なヌクレオシドまたは切断可
能部分を欠く共役基の部分を示すこの慣例をこれらの実施形態の全体を通して用いる。切
断可能部分を欠く共役基のこの部分は、本明細書において「クラスター」または「共役ク
ラスター」または「GalNAc₃クラスター」と称される。特定の事例において、これ
は、そのクラスター及びその切断可能部分を別々に提供することによって共役基を説明す
るのに好都合である。

【0712】

実施例20：huApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるヒトApoC III
の用量依存的アンチセンス阻害

それぞれヒトApoC IIIを標的とし、かつ上に記載されるISIS 304801
及びISIS 647535を別々に試験し、用量依存的試験において、ヒトApoC

IIIトランスジェニックマウスにおけるヒトApoC IIIを阻害するそれらの能
力について評価した。

処理

【0713】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスを12時間の明暗周期で維持し、Tek
lad実験食餌を不断給餌した。実験開始前に動物を研究施設で少なくとも7日間順化さ
せた。ASOをPBS中に調製し、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過して滅菌し
た。注入のためにASOを0.9%PBS中に溶解した。

【0714】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスに、ISIS 304801もしくは6
47535を、0.08、0.25、0.75、2.25、もしくは6.75 μmol/
kgで、または対照としてPBSを、週1回2週間、腹腔内に注入した。各処理群は、4
匹の動物からなった。最終用量の投与から48時間後に血液を各マウスから採取し、マウ
スを殺し、組織を収集した。

ApoC III mRNA分析

【0715】

標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）R
NA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を
用いてマウスの肝臓におけるApoC III mRNAレベルを決定した。PBS処理対
照に対して正規化する前に（Ribogreenを用いて）ApoC III mRNAレ
ベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS処理対照に対して正
規化された各処理群のApoC III mRNAレベルの平均パーセントとして提示され
、「%PBS」で表示される。各ASOの半数効果濃度（ED₅₀）も以下の表18に示
される。

【0716】

例証されるように、PBS対照と比較して、両方のアンチセンス化合物がApoC I
II RNAを減少させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化
合物（ISIS 647535）は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物
（ISIS 304801）よりもはるかに強力であった。

【0717】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 18

ヒト ApoC III トランスジェニックマウスにおける ApoC III mRNA レベルへの ASO 処理の影響

ASO	用量 (μmol/kg)	% PBS	ED ₅₀ (μmol/kg)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	100	--	—	--	
ISIS 304801	0.08	95	0.77	なし	PS/20	2248
	0.75	42				
	2.25	32				
	6.75	19				
ISIS 47535	0.08	50	0.074	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	0.75	15				
	2.25	17				
	6.75	8				

【0718】

ApoC III タンパク質分析 (比濁アッセイ)

2013年3月29日の出版前にオンラインで公開された Graham et al (Circulation Research) によって報告された手順を用いて、血漿 ApoC III タンパク質分析を行った。

【0719】

マウスから単離した約 100 μL の血漿を、希釈することなく、Olympus 臨床分析器及び市販の比濁 ApoC III アッセイ (Kamiya、カタログ番号 KAI-006、Kamiya Biomedical, Seattle, WA) を用いて分析した。アッセイプロトコルを供給業者が説明するとおりに実行した。

【0720】

以下の表 19 に示されるように、PBS 対照と比較して、両方のアンチセンス化合物が ApoC III タンパク質を減少させた。さらに、GalNAc₃-1 に共役されるアンチセンス化合物 (ISIS 647535) は、GalNAc₃-1 共役体を欠くアンチセンス化合物 (ISIS 304801) よりもはるかに強力であった。

【0721】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 19

ヒト ApoC III トランスジェニックマウスにおける ApoC III 血漿タンパク質レベルへの ASO 処理の影響

ASO	用量 (μmol/kg)	% PBS	ED ₅₀ (μmol/kg)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	86	0.73	なし	PS/20	2248
	0.75	51				
	2.25	23				
	6.75	13				
ISIS 647535	0.08	72	0.19	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	0.75	14				
	2.25	12				
	6.75	11				

【0722】

血漿トリグリセリド及びコレステロールを、Bligh and Dyerの方法 (Bligh, E. G. and Dyer, W. J. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917, 1959) (Bligh, E. and Dyer, W. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917, 1959) (Bligh, E. and Dyer, W. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917, 1959) を用いて抽出し、Beckmann Coulter臨床分析器及び市販の試薬を用いて測定した。

【0723】

トリグリセリドレベルを、PBSを注入したマウスとの比較で相対的に測定し、「%PBS」で表示する。結果が表20に提示される。例証されるように、両方のアンチセンス化合物がトリグリセリドレベルを低下させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化合物 (ISIS 647535) は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物 (ISIS 304801) よりも実質的にはるかに強力であった。

【0724】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 20

トランスジェニックマウスにおけるトリグリセリドレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	% P B S	ED ₅₀ ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	100	---	---	---	
ISIS 304801	0.08	87	0.63	なし	PS/20	2248
	0.75	46				
	2.25	21				
	6.75	12				
ISIS 647535	0.08	65	0.13	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	0.75	9				
	2.25	8				
	6.75	9				

10

【0725】

血漿試料をHPLCによって分析して、総コレステロールの量及びコレステロールの異なる画分（HDL及びLDL）の量を決定した。結果が表21及び22に提示される。例証されるように、両方のアンチセンス化合物が総コレステロールレベルを低下させ、LDLを低下させ、HDLを上昇させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化合物（ISIS 647535）は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物（ISIS 304801）よりも実質的にはるかに強力であった。HDLレベルの増加及びLDLレベルの減少は、ApoC IIIのアンチセンス阻害の心臓血管の有益な影響である。

20

【0726】

【表 5】

表 21

トランスジェニックマウスにおける総コレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	総コレステロール (mg/dL)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	257	---	---	
ISIS 304801	0.08	226	なし	PS/20	2248
	0.75	164			
	2.25	110			
	6.75	82			
ISIS 647535	0.08	230	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	0.75	82			
	2.25	86			
	6.75	99			

30

40

【0727】

50

【表 6】

表 2 2

トランスジェニックマウスにおけるHDL及びLDLコレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μmol /kg)	HDL (mg /dL)	LDL (mg /dL)	3' 共役 体	ヌクレオシド 間結合/長さ	配列番 号
PBS	0	17	28	—	—	
ISIS 3048 01	0.08	17	23	なし	PS/20	224 8
	0.75	27	12			
	2.25	50	4			
	6.75	45	2			
ISIS 6475 35	0.08	21	21	GalNAc ₃ -1	PS/20	224 9
	0.75	44	2			
	2.25	50	2			
	6.75	58	2			

10

【0728】

薬物動態分析 (PK)

ASOのPKも評価した。肝臓及び腎臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出した。試料をIP-HPLC-MSを利用するMSD1で分析した。全長ISIS 304801及び647535の組織レベル ($\mu\text{g/g}$) を測定し、結果が表 2 3 に提供される。例証されるように、総全長アンチセンス化合物の肝臓濃度は、これら2つのアンチセンス化合物と同様であった。したがって、GalNAc₃-1 共役アンチセンス化合物が肝臓でより活性であるが (上のRNA及びタンパク質データによって実証されるように)、肝臓内で著しく高い濃度では存在しない。実際には、計算されたEC₅₀ (表 2 3 に提供される) は、共役化合物の力価の観察された増加が蓄積の増加に完全に起因するわけではないことを裏付ける。この結果は、共役体が、肝臓蓄積単独以外の機構によって、おそらくアンチセンス化合物の細胞への生産的な取り込みを改善することによって、力価を改善したことを示唆する。

20

30

【0729】

結果は、腎臓におけるGalNAc₃-1 共役アンチセンス化合物の濃度が、GalNAc 共役体を欠くアンチセンス化合物の濃度よりも低いことも示す。これは、いくつかの有益な治療的意味を有する。腎臓における活性が要求されない治療的指標において、腎臓への曝露は、腎毒性の危険性を有し、それに見合う利益がない。さらに、腎臓における高濃度は、典型的には、尿への化合物の損失をもたらし、より迅速なクリアランスをもたらす。したがって、非腎臓標的の場合、腎臓蓄積は望ましくない。これらのデータは、GalNAc₃-1 共役が腎臓蓄積を減少させることを示唆する。

40

【0730】

50

【表 7】

表 2 3

トランスジェニックマウスにおけるASO処理のPK分析

ASO	用量 (μmol / kg)	肝臓 (μg / g)	腎臓 (μg / g)	肝臓EC ₅₀ (μg / g)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合 / 長さ	配列番号
ISIS 304801	0.1	5.2	2.1	53	なし	PS / 20	2248
	0.8	62.8	119.6				
	2.3	142.3	191.5				
	6.8	202.3	337.7				
ISIS 647535	0.1	3.8	0.7	3.8	GalNAc ₃ -1	PS / 20	2249
	0.8	72.7	34.3				
	2.3	106.8	114.4				
	6.8	237.2	179.3				

【0731】

ISIS 647535の代謝物も特定し、それらの質量を高分解能質量分析によって確認した。観察された代謝物の切断部位及び構造が以下に示される。標準的手順を用いて全長ASOの相対%を計算し、結果が表23aに提示される。ISIS 647535の主な代謝物は、全共役体を欠く全長ASO（すなわち、ISIS 304801）であり、これは、以下に示される切断部位Aでの切断に由来する。さらに、他の切断部位に由来するさらなる代謝物も観察された。これらの結果は、細胞内の酵素によって切断されうるか、またはサイトゾルの還元環境下で切断されうるか、またはエンドソーム及びリソソーム内の酸性pHに対して不安定な、GalNAc₃-1糖とASOとの間のエステル、ペプチド、ジスルフィド、ホスホラミデート、またはアシルヒドラゾンなどの他の切断可能な結合の導入も有用でありうることを示唆する。

【0732】

10

20

30

40

50

【表 8】

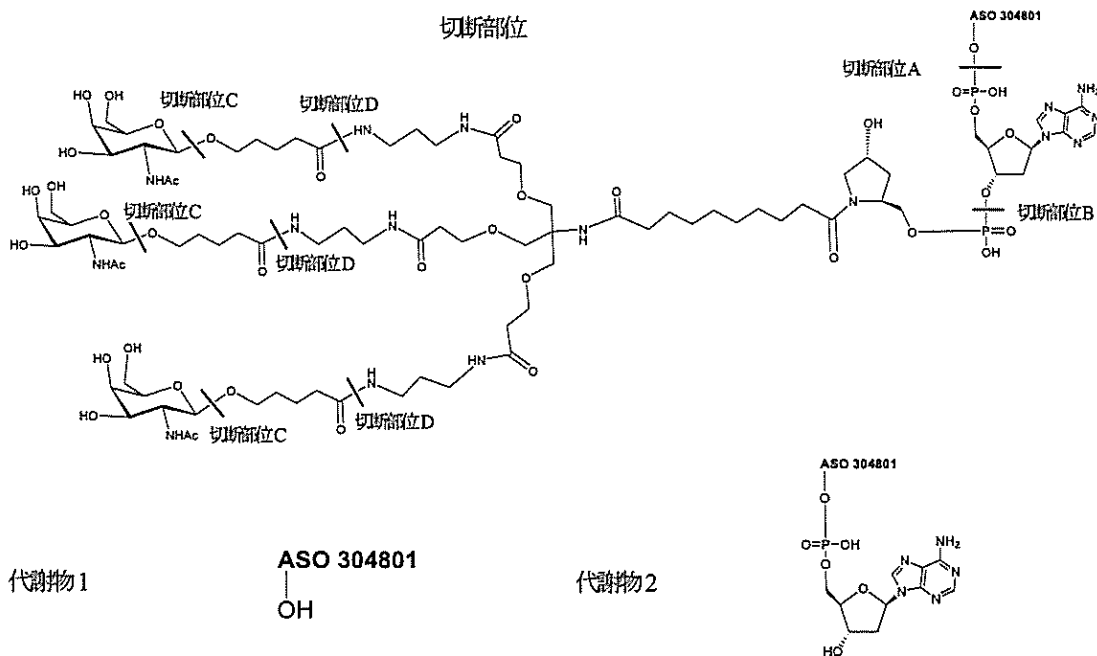
表 23 a

ISIS 647535 の観察された全長代謝物

代謝物	ASO	切断部位	相対 %
1	ISIS 304801	A	36.1
2	ISIS 304801 + dA	B	10.5
3	ISIS 647535 minus [3 GalNAc] C	C	16.1
4	ISIS 647535 minus [3 GalNAc + 1 5-ヒドロキシ- -ペンタン酸テザー]	D	17.6
5	ISIS 647535 minus [2 GalNAc + 2 5-ヒドロキシ- -ペンタン酸テザー]	D	9.9
6	ISIS 647535 minus [3 GalNAc + 3 5-ヒドロキシ- -ペンタン酸テザー]	D	9.8

【0733】

【化148】



【0734】

10

20

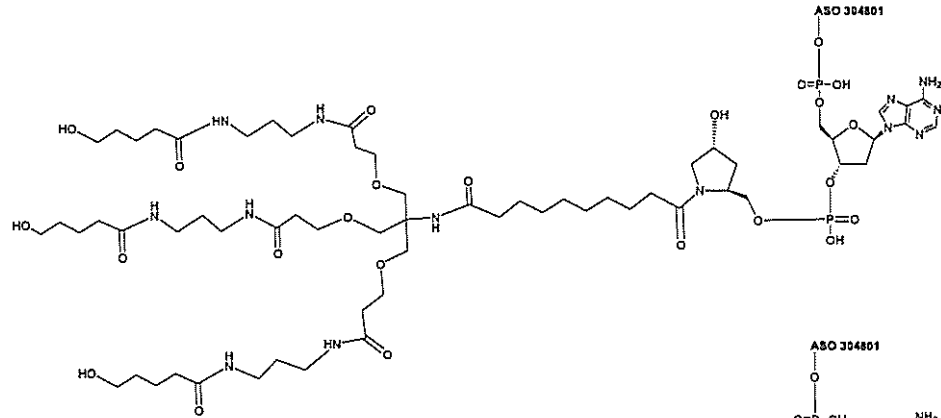
30

40

50

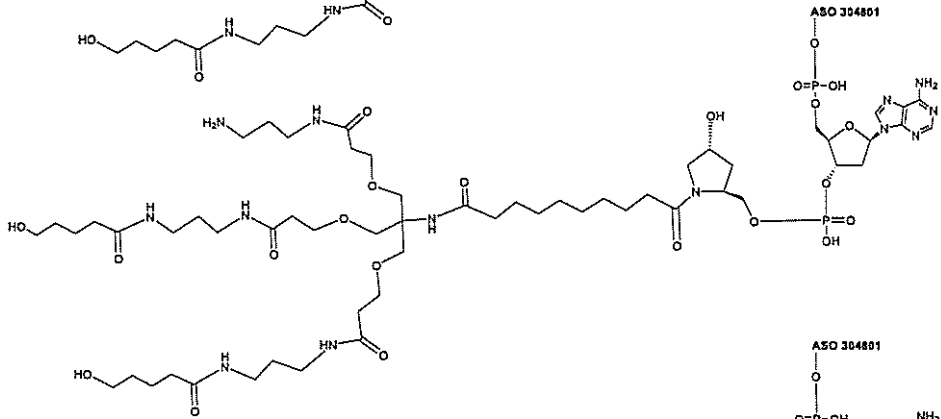
【化 1 4 9】

代謝物3



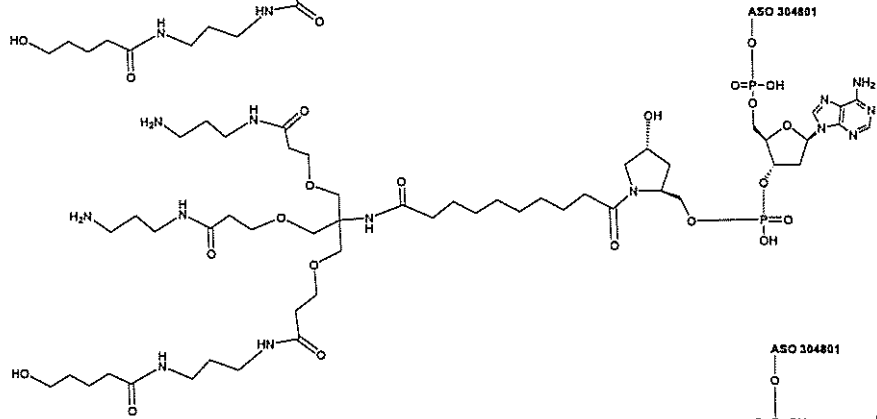
10

代謝物4



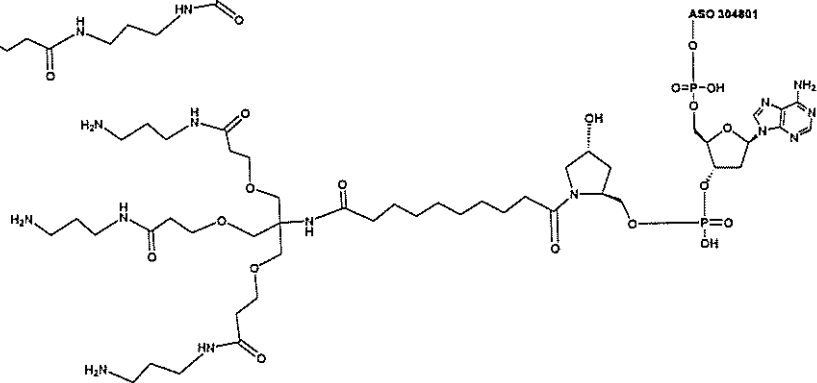
20

代謝物5



30

代謝物6



【0 7 3 5】

実施例 2 1：単回投与試験におけるヒト Apo C III トランスジェニックマウスにおけるヒト Apo C III のアンチセンス阻害

それぞれヒト Apo C III を標的とし、かつ表 1 7 に記載される ISIS 304801、647535、及び 647536 を、単回投与試験において、ヒト Apo C III トランスジェニックマウスにおけるヒト Apo C III を阻害するそれらの能力についてさらに評価した。

【0 7 3 6】

処理

ヒト Apo C III トランスジェニックマウスを 12 時間の明暗周期に維持し、Teklad 実験食餌を不断給餌した。実験開始前に動物を研究施設で少なくとも 7 日間順化さ

40

50

せた。A S OをP B S中に調製し、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌した。注入のためにA S Oを0.9% P B S中に溶解した。

【0737】

ヒトA p o C I I Iトランスジェニックマウスに、I S I S 304801、647535、もしくは647536（上述のもの）、またはP B S処理対照を、以下に示される投与量で1回、腹腔内注入した。処理群は、3匹の動物から成り、対照群は、4匹の動物からなった。治療前及び最終用量後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の72時間後にマウスを 殺した。

【0738】

試料を収集し、分析して、肝臓におけるA p o C I I I mRNA及びタンパク質レベル、血漿トリグリセリド、ならびにH D L及びL D L画分を含むコレステロールを決定し、上述（実施例20）のように評価した。これらの分析からのデータは、以下の表24～28に提示される。血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（A L T）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（A S T）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。A L T及びA S Tレベルは、アンチセンス化合物がすべての投与量で良好な耐性であったことを示した。

【0739】

これらの結果は、G a l N A c₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物（I S I S 304801）と比較して、3'末端にG a l N A c₃-1共役体を含むアンチセンス化合物（I S I S 647535及び647536）の力価の改善を示す。さらに、G a l N A c₃-1共役体及びいくつかのホスホジエステル連結部を含むI S I S 647536は、同一の共役体を含むI S I S 647535と同程度に強力であり、A S O内のすべてのヌクレオシド間連結部は、ホスホロチオエート連結部である。

【0740】

【表9】

表24

ヒトA p o C I I IトランスジェニックマウスにおけるA p o C I I I mRNAレベルへのA S O処理の影響

A S O	用量 (m g / k g)	% P B S	ED ₅₀ (m g / k g)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
P B S	0	99	—	—	—	
I S I S 304801	1	104	13.2	なし	P S / 20	2248
	3	92				
	10	71				
	30	40				
I S I S 647535	0.3	98	1.9	G a l N A c ₃ -1	P S / 20	2249
	1	70				
	3	33				
	10	20				
I S I S 647536	0.3	103	1.7	G a l N A c ₃ -1	P S / P O / 20	2249
	1	60				
	3	31				
	10	21				

【0741】

【表 10】

表 25

ヒト ApoC III トランスジェニックマウスにおける ApoC III 血漿タンパク質レベルへの ASO 処理の影響

ASO	用量 (mg / kg)	% P B S	ED ₅₀ (mg / kg)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 3048 01	1	104	23.2	なし	PS/20	2248
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 6475 35	0.3	98	2.1	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 6475 36	0.3	103	1.8	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	2249
	1	60				
	3	31				
	10	21				

【0742】

【表 11】

表 26

トランスジェニックマウスにおけるトリグリセリドレベルへの ASO 処理の影響

ASO	用量 (mg / kg)	% P B S	ED ₅₀ (mg / kg)	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列番号
PBS	0	98	--	--	--	
ISI S 3 048 01	1	80	29.1	なし	PS/20	2248
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISI S 6 475 35	0.3	100	2.2	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISI S 6 475 36	0.3	95	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	2249
	1	66				
	3	31				
	10	23				

【0743】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 2 7

トランスジェニックマウスにおける総コレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (mg/kg)	% P BS	3' 共役 体	ヌクレオシド 間結合/長さ	配列番号
PBS	0	9.6	--	--	
ISIS 3048 01	1	10.4	なし	PS/20	2248
	3	9.6			
	10	8.6			
	30	7.2			
ISIS 6475 35	0.3	9.3	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	1	8.5			
	3	6.1			
	10	5.3			
ISIS 6475 36	0.3	11.5	GalNAc ₃ -1	PS/PO/ 20	2249
	1	7.9			
	3	5.1			
	10	5.4			

【0 7 4 4】

【表 1 3】

表 2 8

トランスジェニックマウスにおけるHDL及びLDLコレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (mg/kg)	HDL % P BS	LDL % P BS	3' 共役 体	ヌクレオシド 間結合/長さ	配列番号
PBS	0	13.1	9.0	--	--	
ISIS 3048 01	1	13.0	7.2	なし	PS/20	2248
	3	18.6	7.9			
	10	22.6	6.3			
	30	24.0	4.6			
ISIS 6475 35	0.3	9.8	8.6	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
	1	21.4	6.7			
	3	21.2	3.9			
	10	21.8	3.5			
ISIS 6475 36	0.3	14.3	8.9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/ 20	2249
	1	18.7	5.6			
	3	21.3	3.3			
	10	22.1	3.4			

【0 7 4 5】

これらの結果は、GalNAc₃-1共役体がアンチセンス化合物の力価を改善することを裏付ける。これらの結果は、GalNAc₃-1共役アンチセンス化合物の同等の力価も示し、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、混成連結部（6個のホスホジエステル連結部を有するISIS 647536）及び同一のアンチセンス化合物の完全な

ホスホロチオエートバージョン (ISIS 647535) を有する。

【0746】

ホスホロチオエート連結部は、アンチセンス化合物にいくつかの特性を提供する。例えば、これらは、ヌクレアーゼ消化に抵抗し、タンパク質に結合し、腎臓／尿ではなく肝臓における化合物の蓄積をもたらす。これらは、肝臓における徴候を治療する際に特に望ましい特性である。しかしながら、ホスホロチオエート連結部は、炎症性応答とも関連している。したがって、化合物におけるホスホロチオエート連結部の数を減少させることにより、炎症の危険性の減少が見込まれるが、肝臓中の化合物の濃度も低下させ、腎臓及び尿中の濃度を増加させ、ヌクレアーゼの存在下で安定性を低下させ、全体の力価を低下させる。これらの結果は、特定のホスホロチオエート連結部がホスホジエステル連結部に置換された GalNAc₃-1 共役アンチセンス化合物が、肝臓における標的に対して、完全なホスホロチオエート連結部を有する対応物と同程度に強力であることを示す。そのような化合物は、より炎症誘発性が低いと見込まれる (PS の減少が炎症性効果の減少をもたらすことを示す実験を説明する実施例 24 を参照のこと)。

10

【0747】

実施例 22：生体内における SRB-1 を標的とする GalNAc₃-1 共役修飾 ASO の影響

それぞれ SRB-1 を標的とし、かつ表 17 に記載される ISIS 440762 及び 651900 を、用量依存的試験において、Balb/c マウスにおける SRB-1 を阻害するそれらの能力について評価した。

20

【0748】

処理

6 週齢の雄 Balb/c マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、ISIS 440762、651900、または PBS 処理対照を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 48 時間後にマウスを殺して、標準のプロトコルに従ってリアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓における SRB-1 mRNA レベルを決定した。PBS 処理対照に対して正規化する前に (Ribogreen を用いて) SRB-1 mRNA レベルを全 RNA との比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS 処理対照に対して正規化された各処理群の SRB-1 mRNA レベルの平均パーセントとして提示され、「% PBS」で表示される。

30

【0749】

表 29 に例証されるように、両方のアンチセンス化合物が SRB-1 mRNA レベルを低下させた。さらに、GalNAc₃-1 共役体 (ISIS 651900) を含むアンチセンス化合物は、GalNAc₃-1 共役体を欠くアンチセンス化合物 (ISIS 440762) よりもはるかに強力であった。これらの結果は、異なる標的に相補的であり、かつ異なる化学修飾ヌクレオシドを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、GalNAc₃-1 共役体の力価利益が観察されることを実証し、この事例において、修飾ヌクレオシドは、拘束エチル糖部分 (二環式糖部分) を含む。

40

【0750】

【表 14】

表 29

Balb/c マウスにおける SRB-1 mRNA レベルへの ASO 処理の影響

ASO	用量 (mg / kg)	肝臓 % P B S	ED ₅₀ (mg / kg)	3' 共役体		ヌクレオ シド間結 合 / 長さ	配列番号
PBS	0	1 0 0		—		—	
I S I S 4 4 0 7 6 2	0. 7	8 5	2. 2	なし		P S / 1 4	2 2 5 0
	2	5 5					
	7	1 2					
	2 0	3					
I S I S 6 5 1 9 0 0	0. 0 7	9 8	0. 3	G a l N A c ₃ -1		P S / 1 4	2 2 5 1
	0. 2	6 3					
	0. 7	2 0					
	2	6					
	7	5					

【0751】

実施例 23：ヒト末梢血単核細胞 (hPBMC) アッセイプロトコル

BD Vacutainer CPT チューブ法を用いて hPBMC アッセイを実行した。US HealthWorks clinic (Faraday & El Camino Real, Carlsbad) においてインフォームドコンセントを得た志願ドナー由来の全血試料を得て、4~15 個の BD Vacutainer CPT 8mL チューブ (VWR カタログ番号 BD 362753) 内に収集した。PBMC アッセイデータシートを用いて、各ドナーの CPT チューブ内の開始合計全血量の近似値を記録した。

【0752】

遠心分離の直前に、チューブを 8~10 回、穏やかに反転させることによって、血液試料を再度混合した。CPT チューブを、水平 (スイングアウト) ローター内で、室温 (18~25℃) で 30 分間、ブレーキオフで 1500~1800 RCF で遠心分離した (2700 RPM、Beckman Allegra 6R)。細胞を (Ficoll とポリマーゲル層との間の) バフィーコート界面から回収し、50mL の滅菌円錐チューブに移し、最大 5 個の CPT チューブ / 50mL の円錐チューブ / ドナーをプールした。その後、細胞を PBS (Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ を含まない; GIBCO) で 2 回洗浄した。チューブを最大 50mL まで満たし、数回反転させて混合した。その後、試料を、室温で 15 分間、330×g で遠心分離し (1215 RPM、Beckman Allegra 6R)、ペレットを乱すことなくできるだけ多くの上澄みを吸引した。チューブを穏やかに回転させて細胞ペレットを取り除き、細胞を RPMI + 10% FBS + pen / strep (約 1mL / 10mL の開始全血量) 中に再懸濁した。60μL の試料を、600μL の VersaLyse 試薬 (Beckman Coulter、カタログ番号 A09777) を有する試料バイアル (Beckman Coulter) にピペット注入し、10~15 秒間穏やかにボルテックスした。試料を室温で 10 分間インキュベートし、計数前に再度混合した。PBMC 細胞型を用いた Viscell XR 細胞生存率分析器 (Beckman Coulter) で細胞懸濁液を計数した (1:11 の希釈係数を他のパラメータと共に保存した)。生細胞 / mL 及び生存率を記録した。細胞懸濁液を RPMI + 10% FBS + pen / strep 中で 1×10⁷ 生 PBMC / mL に希釈した。

【0753】

細胞を96ウェル組織培養プレート (Falcon Microtest) の50 μ L /ウェル中に 5×10^5 でプレATINGした。RPMI+10% FBS+pen/strep中で希釈した2倍濃度のオリゴ/対照の50 μ L /ウェルを実験テンプレートに従って添加した (合計100 μ L /ウェル)。プレートを振盪器に設置し、約1分間混合させた。37℃、5% CO₂で24時間インキュベートした後、プレートを400 $\times$ gで10分間遠心分離し、その後、MSDサイトカインアッセイ (すなわち、ヒトIL-6、IL-10、IL-8、及びMCP-1) のために上澄みを除去した。

【0754】

実施例24：hPBMCアッセイにおけるGalNAc3-1共役ASOの炎症誘発作用の評価

表30に列記されるアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を、実施例23に記載されるプロトコルを用いたhPBMCアッセイにおいて炎症誘発作用について評価した。ISIS 353512は、このアッセイにおいてIL-6放出に関する高レスポnderとして知られる内部標準物である。hPBMCを新鮮な志願ドナーから単離し、0、0.0128、0.064、0.32、1.6、8、40、及び200 μ m濃度のASOで処理した。処理から24時間後、サイトカインレベルを測定した。

【0755】

IL-6のレベルを一次読み出しとして用いた。標準的手順を用いてEC50及びEmaxを計算した。結果が2つのドナー由来のEmax/EC50の平均比率として表され、「Emax/EC50」で表示される。より低い比率は、炎症誘発応答の相対的減少を示し、より高い比率は、炎症誘発応答の相対的増加を示す。

【0756】

試験化合物に関して、炎症誘発性が最も低い化合物は、PS/PO連結ASO (ISIS 616468) であった。GalNAc3-1共役ASO (ISIS 647535) は、その非共役対応物 (ISIS 304801) よりもわずかに炎症誘発性が低かった。これらの結果は、いくつかのPO連結部の組み込みが炎症誘発反応を減少させ、GalNAc3-1共役体の添加が化合物の炎症誘発性を高めず、炎症誘発応答を減少させることを示す。したがって、混成PS/PO連結部及びGalNAc3-1共役体の両方を含むアンチセンス化合物が、完全PS連結アンチセンス化合物 (GalNAc3-1共役体の有無にかかわらず) と比較して、より低い炎症誘発応答をもたらすことが予想されるであろう。これらの結果は、GalNAc3-1共役アンチセンス化合物、特に減少したPS含有量を有するものの炎症誘発性がより低いことを示す。

【0757】

総合して、これらの結果は、GalNAc3-1共役化合物、特にPS含有量を減らしたものを、対応物であるGalNAc3-1共役体を欠く完全PSアンチセンス化合物よりも高い用量で投与することができることを示唆する。これらの化合物の半減期が実質的に異なることが予想されないため、そのようなより高い投与量は、結果として低頻度の投薬につながる。実際には、GalNAc3-1共役化合物の方が力価が高く (実施例20~22を参照のこと)、再投薬は化合物の濃度が所望のレベル未満に低下した時に必要になるが、その所望のレベルは力価に基づくことから、そのような投与の頻度はさらに低くなるだろう。

【0758】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 30

修飾ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	標的	配列番号
ISI S 1 0 4 8 3 8	$G_{es}^m C_{es} T_{es} G_{es} A_{es} T_{ds} T_{ds} A_{ds} G_{ds}$ $A_{ds} G_{ds}$ $A_{ds} G_{ds} A_{ds} G_{ds} G_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	TNF α	2 2 5 2
ISI S 3 5 3 5 1 2	$T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} G_{ds}$ $G_{ds} A_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} T_{es} G_{es} G_e$	CRP	2 2 5 3
ISI S 3 0 4 8 0 1	$A_{es} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{ds} T_{ds} T_{ds} G_{ds}$ T_{ds} $^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} T_{es} T_{es} T_{es}$ $A_{es} T_e$	Apo C I I I	2 2 4 8
ISI S 6 4 7 5 3 5	$A_{es} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{ds} T_{ds} T_{ds} G_{ds}$ T_{ds} $^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} T_{es} T_{es} T_{es} A_e$ $s T_{eo} A_{do} \cdot -GalNAc_3-1_a$	Apo C I I I	2 2 4 9
ISI S 6 1 6 4 6 8	$A_{es} G_{eo}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{ds} T_{ds} T_{ds} G_{ds}$ T_{ds} $^m C_{ds}^m C_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} T_{eo} T_{eo} T_{es} A_e$ $s T_e$	Apo C I I I	2 2 4 8

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、 β -D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₂二環式ヌクレオシド（例えば、cet）を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「A_{do}-GalNAc₃-1_a」は、示されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合される、実施例9に示される構造GalNAc₃-1を有する共役体を示す。

【0759】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 31

hPBMCAッセイにおけるApoC IIIを標的とするASOの炎症誘発作用

ASO	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (μM)	E _{max} / EC ₅₀	3' 共役 体	ヌクレオシ ド間結合/ 長さ	配列番 号
ISIS 35 3512 (高反応系)	0.01	265.9	26,590	なし	PS/20	2253
ISIS 30 4801	0.07	106.55	1,522	なし	PS/20	2248
ISIS 64 7535	0.12	138	1,150	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249
ISIS 61 6468	0.32	71.52	224	なし	PS/PO /20	2248

10

【0760】

実施例 25：生体外におけるヒトApoC IIIを標的とするGalNAc₃-1共役修飾ASOの影響

上述のISIS 304801及び647535を生体外で試験した。トランスジェニックマウス由来の25,000細胞/ウェルの密度の初代肝細胞を、0.03, 0.08, 0.24, 0.74, 2.22, 6.67、及び20 μm濃度の修飾オリゴヌクレオチドで処理した。約16時間の処理期間後、RNAを細胞から単離し、mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRで測定し、hApoC III mRNAレベルをRIBOGREENで測定された全RNA含有量に従って調整した。

20

【0761】

標準的方法を用いてIC₅₀を計算し、結果が表32に提示される。例証されるように、対照ISIS 304801と比較して、同程度の力価がISIS 647535で処理した細胞において観察された。

30

【0762】

【表 17】

表 32

初代肝細胞におけるヒトApoC IIIを標的とする修飾ASO

ASO	IC ₅₀ (μM)	3' 共役体	ヌクレオシド 間結合/長さ	配列番 号
ISIS 3048 01	0.44	なし	PS/20	2248
ISIS 6475 35	0.31	GalNAc ₃ -1	PS/20	2249

40

【0763】

50

この実験において、生体内で観察される GalNAc_3-1 共役の大きな力価利益は、生体外では観察されなかった。生体外での初代肝細胞におけるその後の自由取り込み実験は、 GalNAc 共役体を欠くオリゴヌクレオチドと比較して、さまざまな GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドの力価の増加を示した（実施例 60、82、及び 92 を参照のこと）。

【0764】

実施例 26： ApoC III ASO 活性への PO/PS 連結部の影響

ヒト ApoC III トランスジェニックマウスに、 ISIS 304801 もしくは ISIS 616468 （両方ともに上述のもの）または PBS 処理対照を、 25 mg/kg で週 1 回 2 週間、腹腔内注入した。処理群は、3 匹の動物から成り、対照群は、4 匹の動物からなった。治療前及び最終服用後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の 72 時間後にマウスを殺した。

【0765】

試料を収集し、分析して、上述のように肝臓における ApoC III タンパク質レベルを決定した（実施例 20）。これらの分析からのデータが以下の表 33 に提示される。

【0766】

これらの結果は、完全 $\text{PS} (\text{ISIS 304801})$ と比較して、ウイングに PO/PS を有するアンチセンス化合物（ ISIS 616468 ）の力価の減少を示す。

【0767】

【表 18】

表 33

ヒト ApoC III トランスジェニックマウスにおける ApoC III タンパク質レベルへの ASO 処理の影響

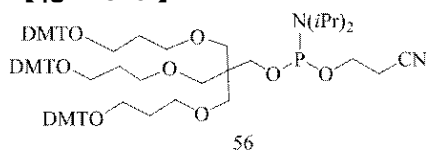
ASO	用量 (mg/kg)	% PBS	3' 共役体	ヌクレオシド間結合/長さ	配列
PBS	0	99	—	—	
ISIS 304801	25 mg/kg/週を2週間	24	なし	完全 PS	2248
ISIS 616468	25 mg/kg/週を2週間	40	なし	14 PS/6 PO	2248

【0768】

実施例 27：化合物 56

【0769】

【化 150】



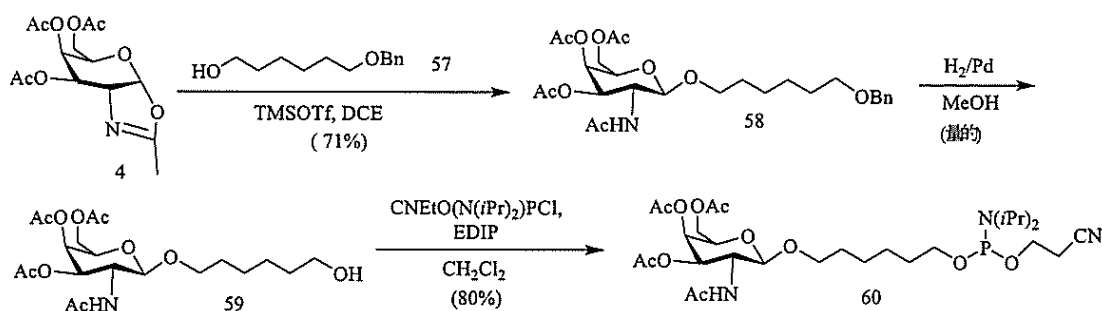
化合物 56 は、 Glen Research から市販されているか、または $\text{Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4447-4454}$ によって報告された公開された手順に従って調製することができる。

【0770】

実施例 28：化合物 60 の調製

【0771】

【化151】



10

化合物4を実施例2に例証される手順どおりに調製した。化合物57は、市販のものである。化合物60を構造分析で確認した。

【0772】

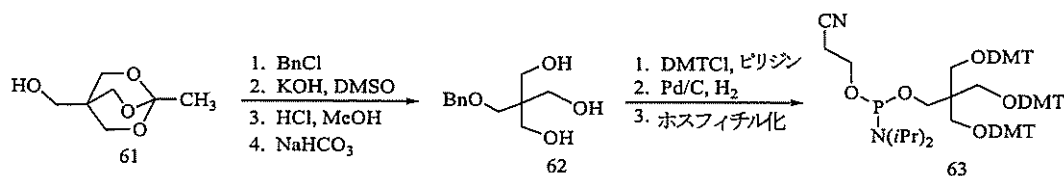
他の単保護された置換または無置換アルキルジオール、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いて既定の組成を有するホスホラミダイトを調製することができるため、化合物57は、代表的なものであり、限定する意図はない。

【0773】

実施例29：化合物63の調製

【0774】

【化152】



20

化合物61及び62を、Tober et al., Eur. J. Org. Chem., 2013, 3, 566-577、及びJiang et al., Tetrahedron, 2007, 63 (19), 3982-3988によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。

30

【0775】

あるいは、化合物63を、Kim et al. の科学文献及び特許文献 (Synlett, 2003, 12, 1838-1840、及びKim et al. の公開されたPCT国際出願第WO2004063208号) に報告される手順と同様の手順を用いて調製する。

【0776】

実施例30：化合物63bの調製

【0777】

【化153】



40

化合物63aを、Hanessian et al., Canadian Journal of Chemistry, 1996, 74 (9), 1731-1737によって報告

50

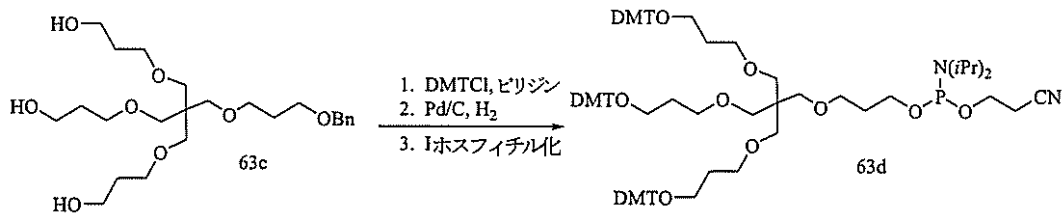
された手順と同様の手順を用いて調製する。

【0778】

実施例31：化合物63dの調製

【0779】

【化154】



10

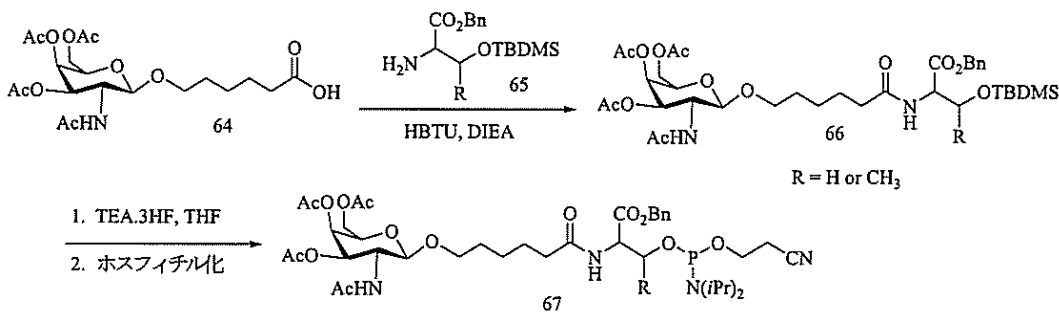
化合物63cを、Chen et al., Chinese Chemical Letters, 1998, 9 (5), 451-453によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。

【0780】

実施例32：化合物67の調製

【0781】

【化155】



20

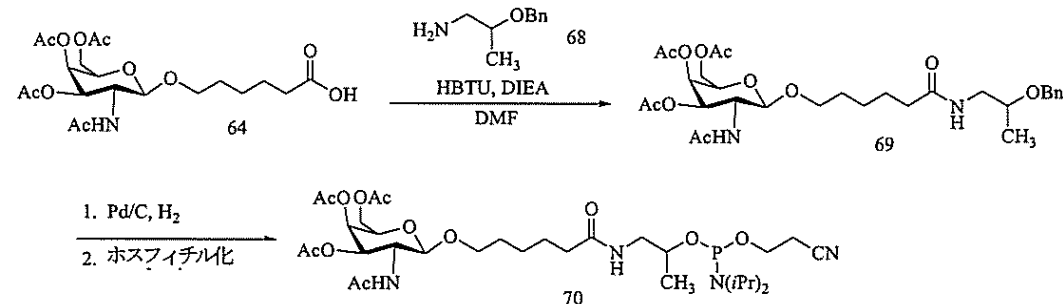
実施例2に例証される手順どおりに化合物64を調製した。化合物65を、Or et al. の公開されたPCT国際出願第WO2009003009号によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。他の保護基、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いることができるため、化合物65に用いた保護基は、代表的なものであり、限定する意図はない。

【0782】

実施例33：化合物70の調製

【0783】

【化156】



40

実施例2に例証される手順どおりに化合物64を調製した。化合物68は、市販のものである。他の保護基、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いることができるため、化合物68に用いた保護基は、代表的なものであり、限定する意図

50

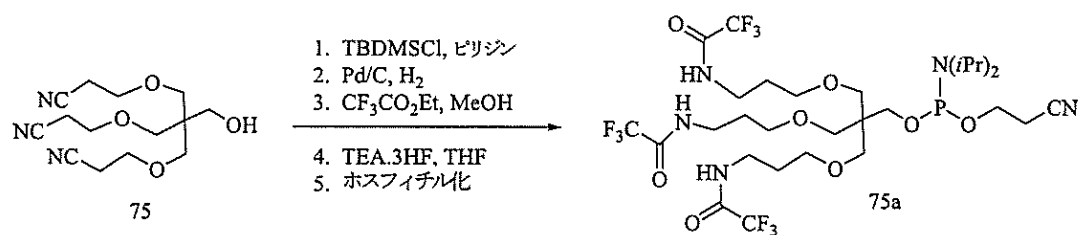
はない。

【0784】

実施例34：化合物75aの調製

【0785】

【化157】



10

化合物75をShchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4447-4454によって報告された公開された手順に従って調製する。

【0786】

実施例35：化合物79の調製

【0787】

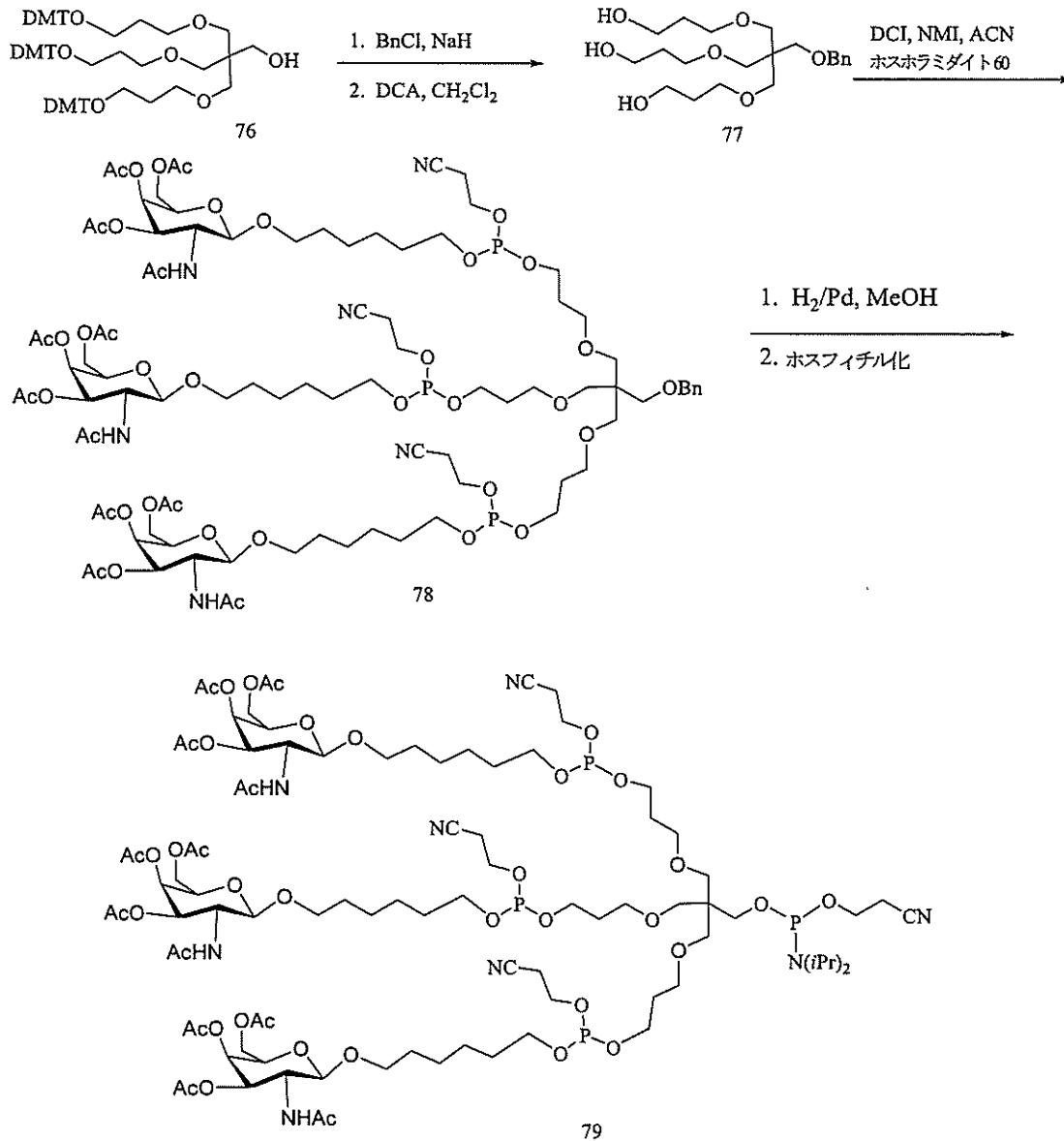
20

30

40

50

【化 1 5 8】



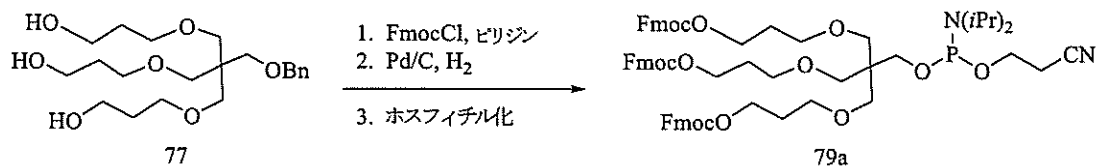
化合物 76 を Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4447-4454 によって報告された公開された手順に従って調製した。

【 0 7 8 8】

実施例 36：化合物 79 a の調製

【 0 7 8 9】

【化 1 5 9】



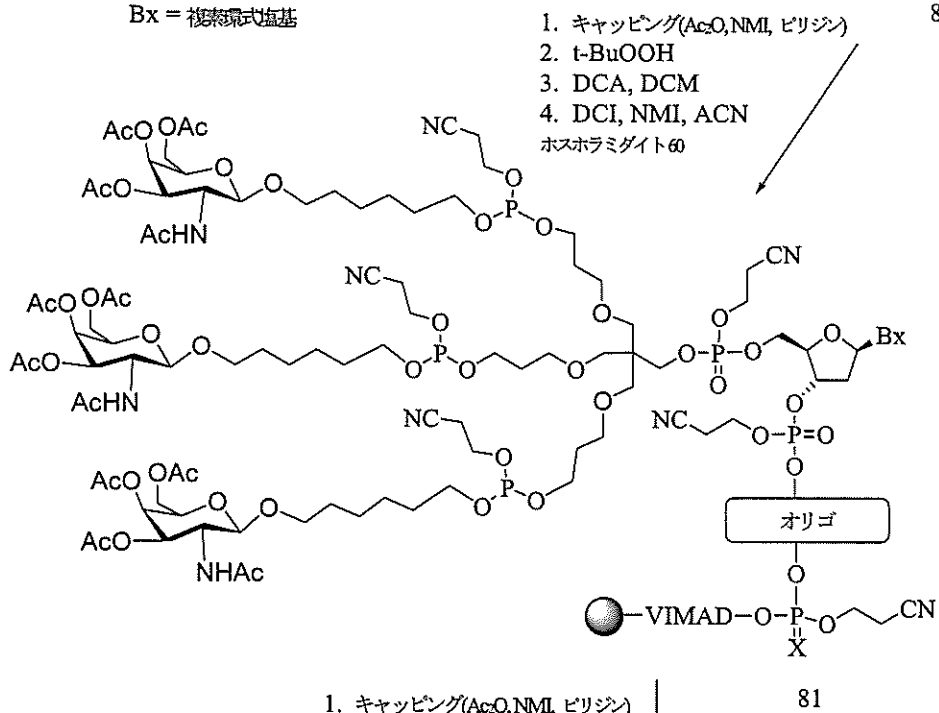
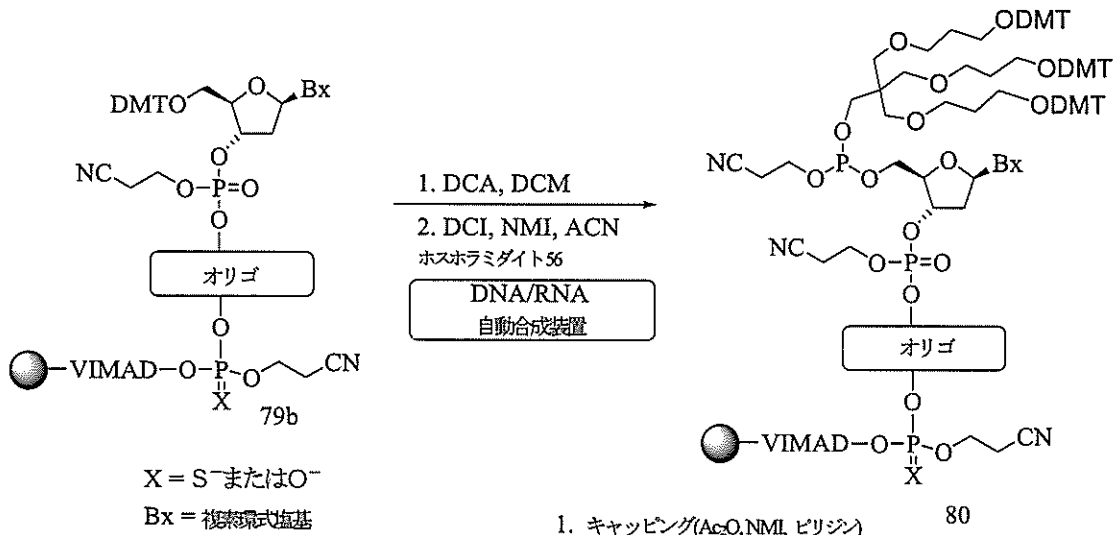
化合物 77 を実施例 35 に例証される手順どおりに調製する。

【 0 7 9 0】

実施例 37：固体支持体による 5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc-2 共役体を含む共役オリゴマー化合物 82 の調製のための一般的方法 (方法 I)

【 0 7 9 1 】

【 化 1 6 0 】



1. キヤッピング(Ac₂O, NMI, ピリジン)
 2. t-BuOOH
 3. トルエン中20%Et₃NH(v/v)
 4. NH₄, 55 °C,

【 0 7 9 2 】

10

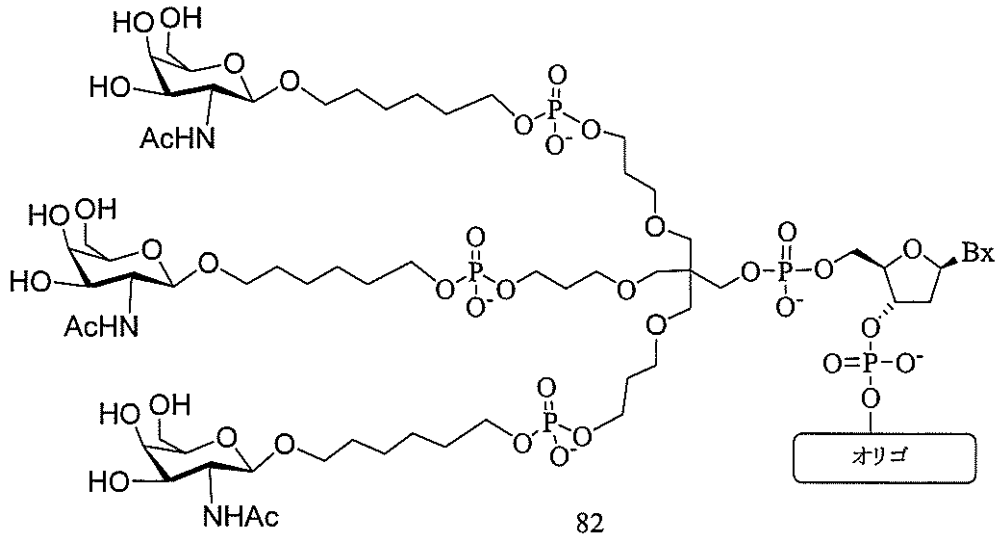
20

30

40

50

【化 1 6 1】

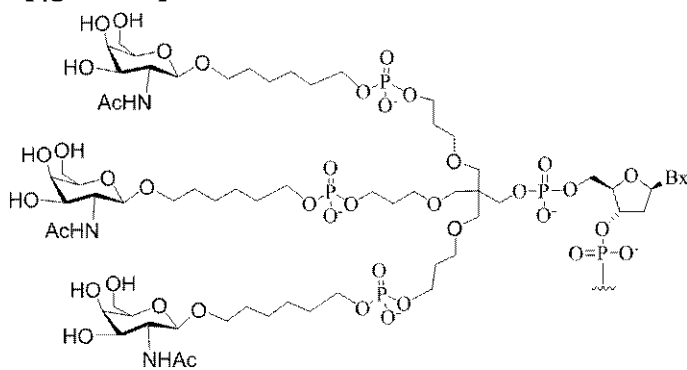


10

G a l N A c 3 - 2 が、以下の構造を有する：

【 0 7 9 3】

【化 1 6 2】



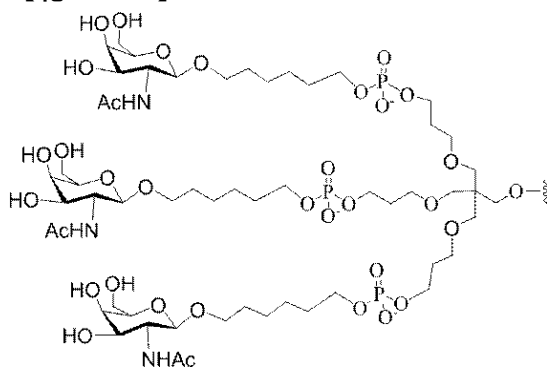
20

共役基 G a l N A c 3 - 2 (G a l N A c 3 - 2 a) の G a l N A c 3 クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。G a l N A c 3 - 2 a は、以下の式を有する：

30

【 0 7 9 4】

【化 1 6 3】



40

【 0 7 9 5】

V I M A D 結合オリゴマー化合物 7 9 b を、自動 DNA / RNA 合成における標準的手順を用いて調製した (Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627 を参照のこと)。ホスホラミダイト化合物 5 6 及び 6 0 を、それぞれ、実施例 2 7 及び 2 8 にそれぞれ例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロック、例えば限定するわけではないが、本明細書に提

50

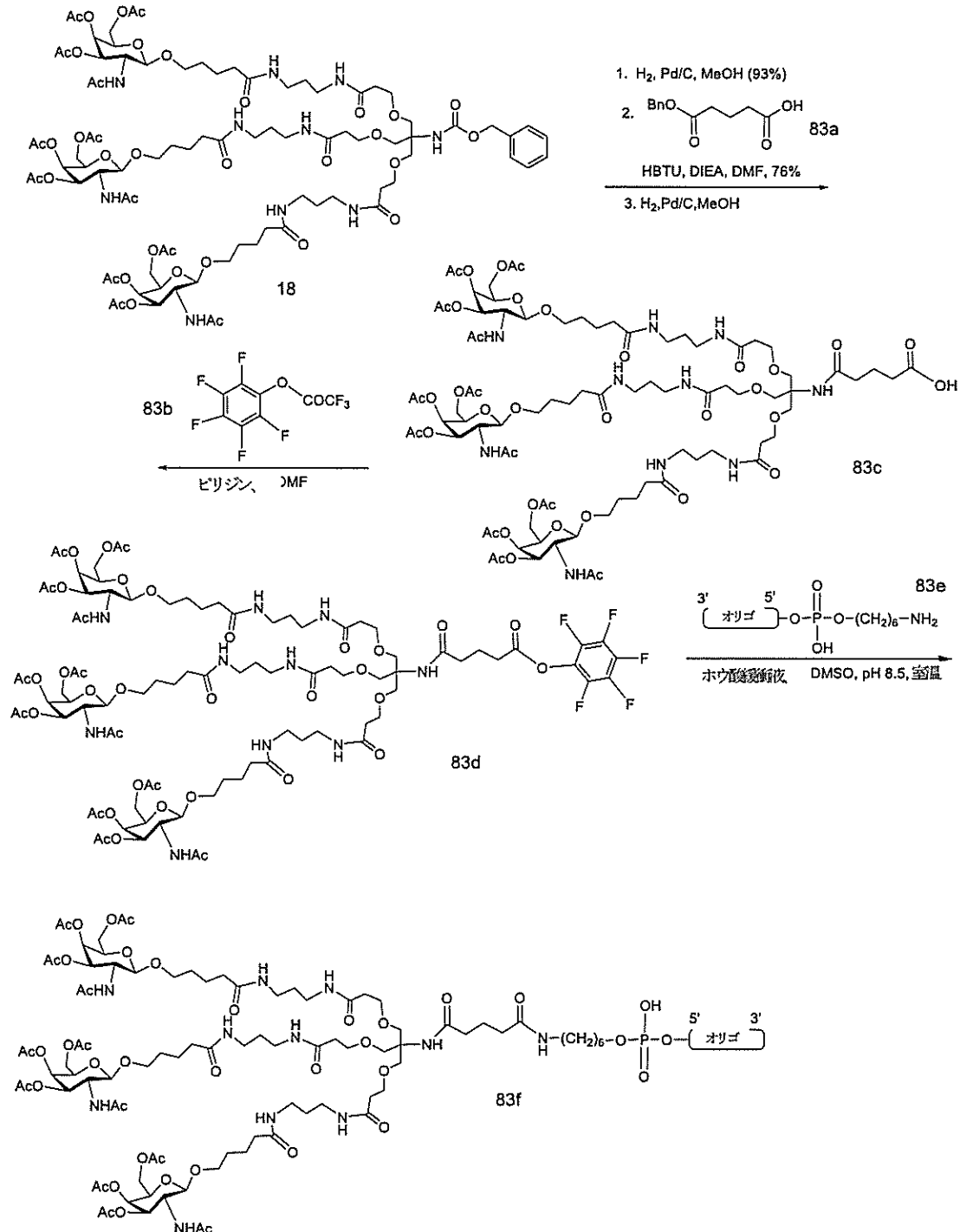
ステル共役体を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、任意の既定の配列及び組成を有する本明細書に記載するオリゴマー化合物を調製することができる。

【0798】

実施例39：固体支持体による5'末端にGalNAc-3共役体（5'末端結合のためにGalNAc-1修飾されたもの）を含むオリゴマー化合物83hの調製のための一般的方法

【0799】

【化165】



【0800】

10

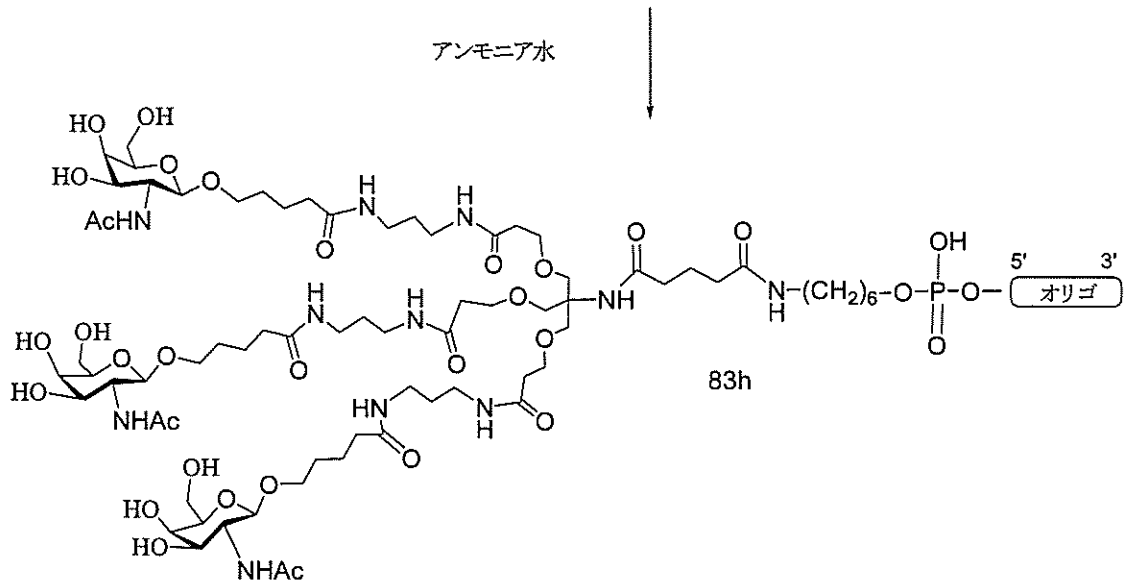
20

30

40

50

【化 1 6 6】



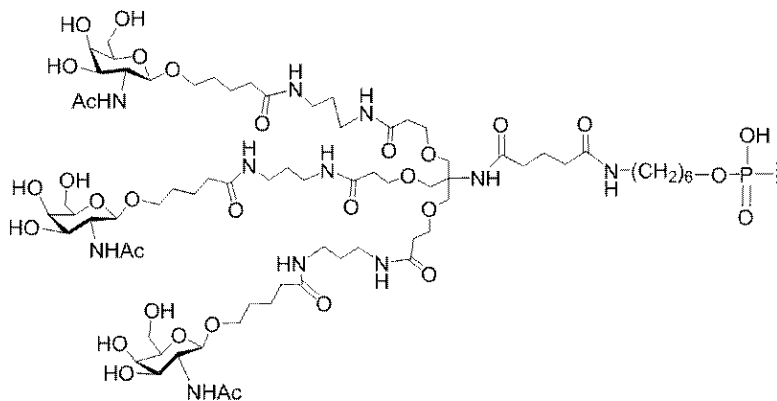
化合物 18 を実施例 4 に例証される手順どおりに調製した。化合物 83a 及び 83b は、市販のものである。ホスホジエステル連結ヘキシルアミンを含むオリゴマー化合物 83e を標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて調製した。保護されたオリゴマー化合物をアンモニア水で処理することにより、5'-GalNAc₃-3' 共役オリゴマー化合物 (83h) を提供した。

【0801】

GalNAc₃-3 が、以下の構造を有する：

【0802】

【化 1 6 7】



【0803】

共役基 GalNAc₃-3 (GalNAc₃-3a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-3a は、以下の式を有する：

【0804】

10

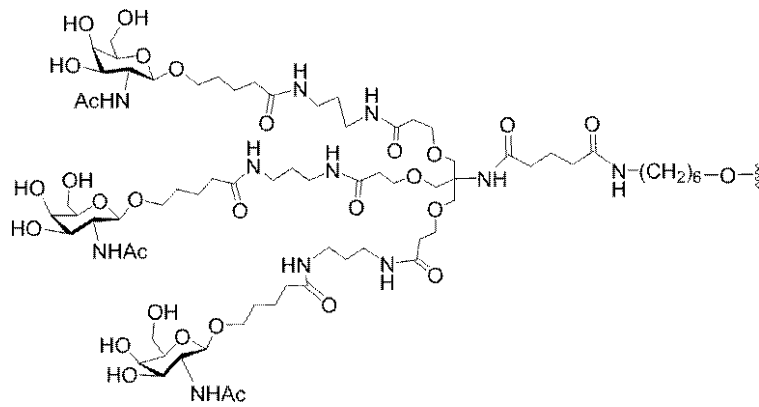
20

30

40

50

【化 1 6 8】



10

【 0 8 0 5】

実施例 40：固体支持体による 3' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc-4 共役体を含むオリゴマー化合物 89 の調製のための一般的方法

【 0 8 0 6】

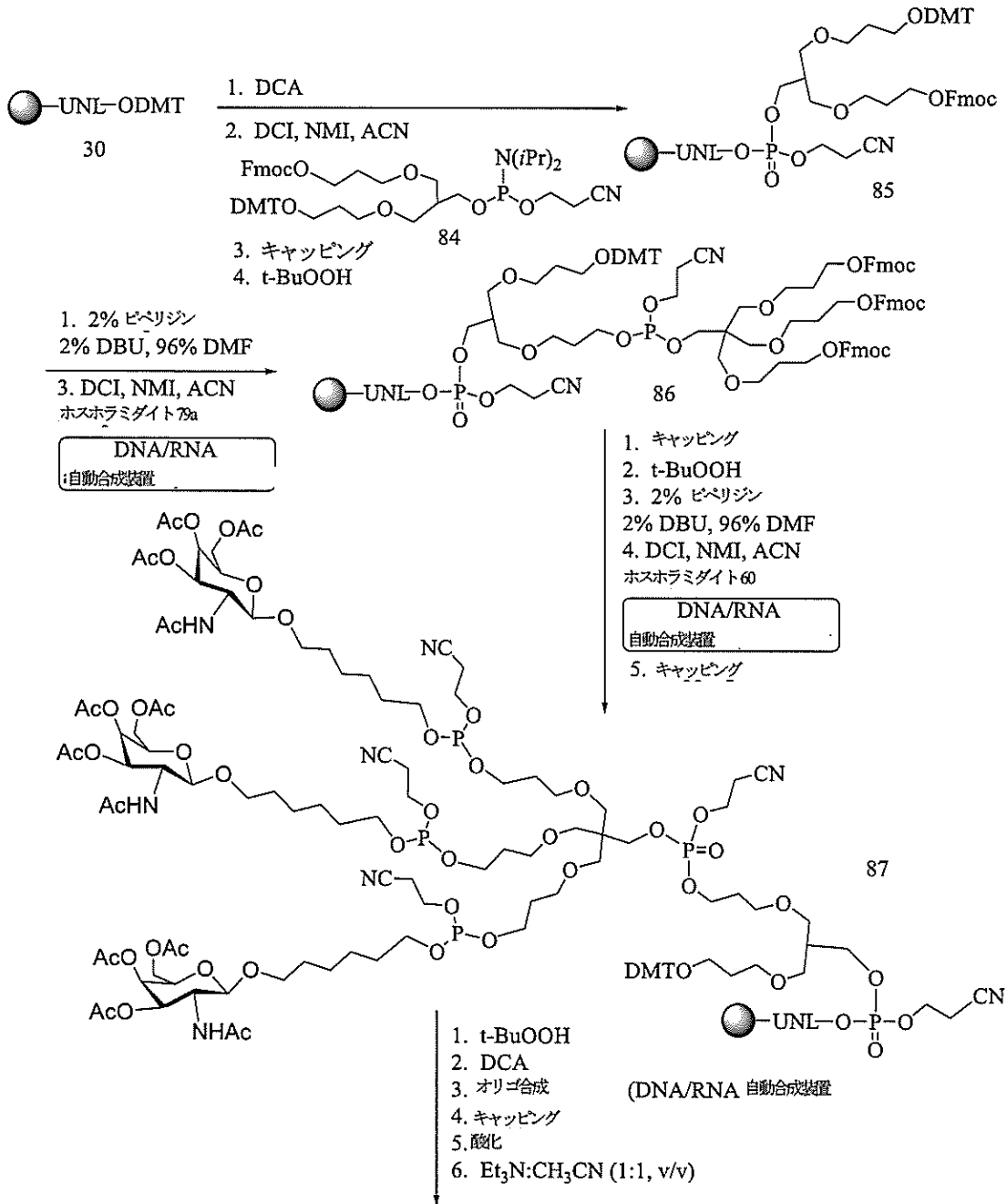
20

30

40

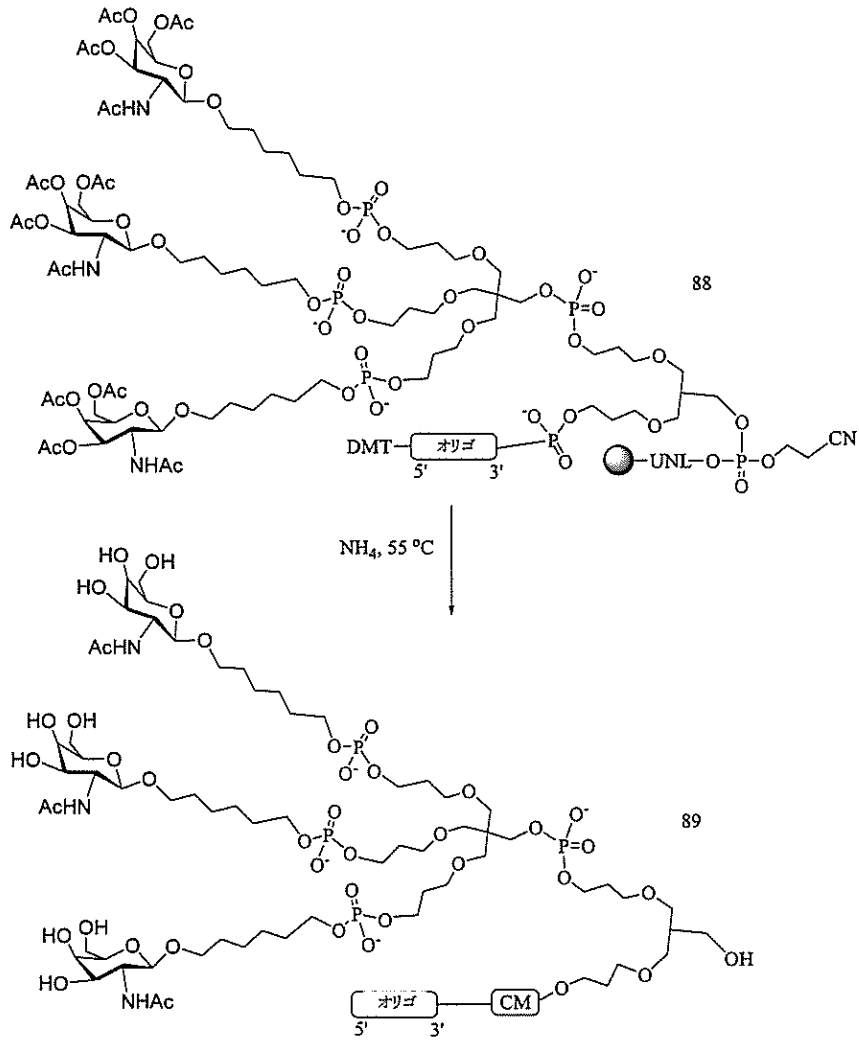
50

【化 1 6 9】



【0 8 0 7】

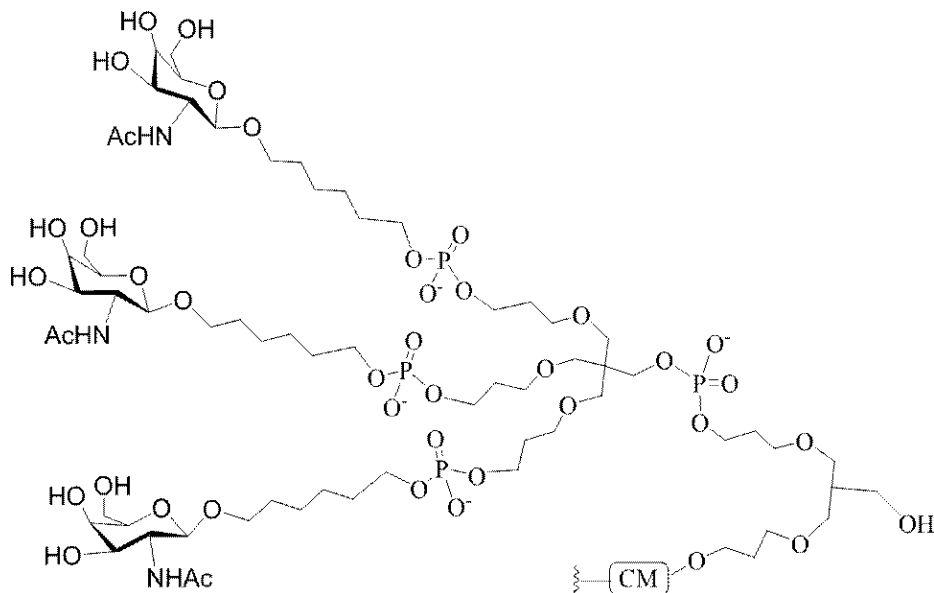
【化 1 7 0】



GalNAc₃-4が、以下の構造を有する：

【0 8 0 8】

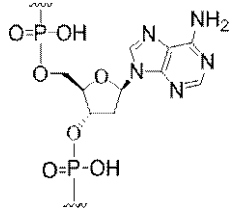
【化 1 7 1】



式中、CMは、切断可能部分である。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、以下のものである：

【0809】

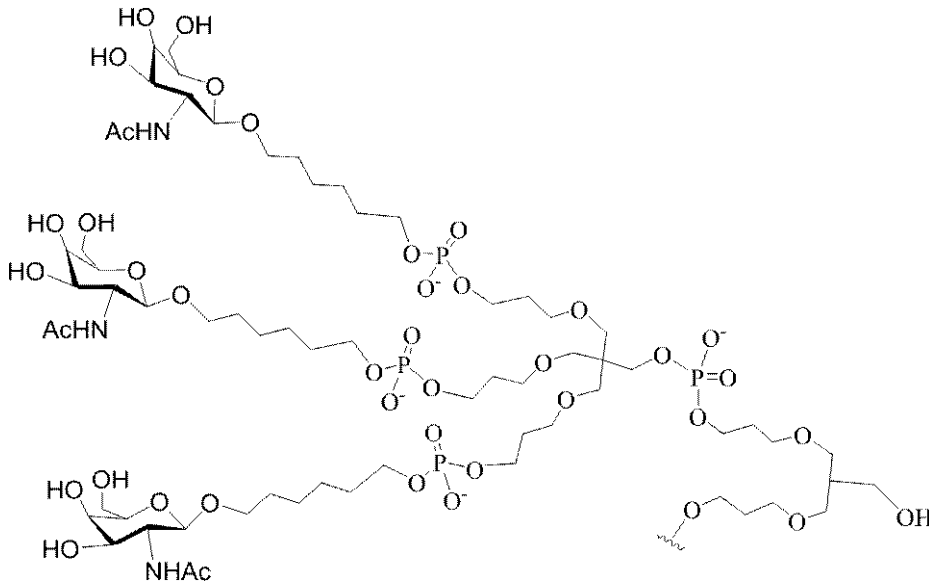
【化172】



共役基 GalNAc_3-4 (GalNAc_3-4a) の GalNAc_3 クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。 GalNAc_3-4a は、以下の式を有する：

【0810】

【化173】



【0811】

保護された *Uny linker* 機能化固体支持体化合物 30 は、市販のものである。化合物 84 を、文献に報告される手順と同様の手順を用いて調製する (Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22), 4447-4454、Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1999, 27, 3035-3041、及び Horne et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 4842-4849 を参照のこと)。

【0812】

ホスホラミダイト構築ブロック (化合物 60 及び 79a) を実施例 28 及び 36 に例証される手順どおりに調製する。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて、既定の配列及び組成を有する 3' 末端にホスホジエステル連結共役体を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、任意の既定の配列及び組成を有する本明細書に記載するオリゴマー化合物を調製することができる。

【0813】

実施例 41：固相技法による 5' 位にホスホジエステル連結 GalNAc_3-2 (Bx がアデニンである実施例 37 を参照のこと) 共役体を含む *ASO* の調製のための一般的方法 (ISIS 661134 の調製)

別段の明示がある場合を除き、オリゴマー化合物の合成に用いるすべての試薬及び溶液

を商業的供給源から購入する。標準のホスホラミダイト構築ブロック及び固体支持体を、例えば、T、A、G、及びmC残基を含む、ヌクレオシド残基の組み込みのために用いる。ホスホラミダイト化合物56及び60を用いて、5'末端のホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体を合成した。無水アセトニトリル中のホスホラミダイトの0.1M溶液をβ-D-2'-デオキシリボヌクレオシド及び2'-MOEに用いた。

【0814】

カラムに充填されたVIMAD固体支持体(110 μmol/g、Guzaev et al., 2003)でのホスホラミダイトカップリング法により、ASO合成を、ABI 394合成装置(1~2 μmolの規模)またはGE Healthcare Bioscience AKTAオリゴパイロット合成装置(40~200 μmolの規模)で実行した。このカップリングステップについて、固体支持体の初期負荷量に対して4倍過剰のホスホラミダイトを送達し、ホスホラミダイトカップリングを10分間行った。すべての他のステップは、製造業者から提供された標準のプロトコルに従った。トルエン中の6%ジクロロ酢酸溶液を用いて、ヌクレオチドの5'-ヒドロキシル基からジメトキシトリチル(DMT)基を除去した。カップリングステップ中、無水CH₃CN中の4,5-ジシアノイミダゾール(0.7M)を活性化剤として用いた。ホスホロチオエート連結部を、3分間の接触時間で、1:1のピリジン/CH₃CN中のキサンタンヒドリドの0.1M溶液による硫化によって導入した。6%の水を含有するCH₃CN中の20%のtert-ブチルヒドロペルオキシドの溶液を酸化剤として用いて、12分間の接触時間で、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部を提供した。

【0815】

所望の配列が構築された後、シアノエチルホスフェート保護基を、45分間の接触時間で、トルエン中の20%ジエチルアミン(v/v)を用いて脱保護した。固体支持体に結合されたASOをアンモニア水(28~30重量%)中に懸濁し、55℃で6時間加熱した。その後、非結合型ASOを濾過し、アンモニアを沸去した。残渣を強アニオン交換カラムでの高圧液体クロマトグラフィーによって精製した(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q、30 μm、2.54×8 cm、A=30% CH₃CN水溶液中100 mM酢酸アンモニウム、B=A中1.5M NaBr、60分後0~40%のB、流量14 mL/分、λ=260 nm)。残渣を逆相カラムでのHPLCにより脱塩して、固体支持体への初期負荷量に基づいて15~30%の単離収率で所望のASOを得た。ASOを、Agilent 1100 MSDシステムを用いたイオン対HPLC/MS分析によって特徴付けた。

【0816】

【表19】

表34

SRB-1を標的とする5'位にホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体を含むASO

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	Calcd 質量	質量の 測定値	配列番 号
661 134	GalNAc ₃ -2 _{a-o} ·A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _d _s ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482.2	6481.6	2254

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₂二環式ヌクレオシド(例えば、cet)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。GalNAc₃-2_aの構造が実施例37に示される。

【0817】

実施例 42：固相技法による 5' 位に GalNAc-3 共役体を含む ASO の調製のための一般的方法 (ISIS 661166 の調製)

ISIS 661166 の合成を、実施例 39 及び 41 に例証される手順と同様の手順を用いて実行した。

【0818】

ISIS 661166 は、5' 位が GalNAc-3 共役体を含む 5'-10'-5 MOE ギャップマーである。ASO を、Agilent 1100 MSD システムを用いたイオン対 HPLC/MS 分析によって特徴付けた。

【0819】

【表 20】

表 34a

Malat-1 を標的とする、ヘキシルアミノホスホジエステル連結部を介して 5' 位に GalNAc-3 共役体を含む ASO

ISIS S 番号	配列 (5' ~ 3')	共役体	質量 の計 算値	質量の 測定値	配列番 号
661 166	5'-GalNAc ₃ -3 _{a-o} - ^m C _{es} G _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalN Ac ₃ -3	89 9 2 16	899 0.51	225 5

下付き文字「e」は、2'-MOE 修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (PS) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (PO) を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「5'-GalNAc-3a」の構造が実施例 39 に示される。

【0820】

実施例 43：生体内における SRB-1 を標的とする 5' 末端でのホスホジエステル連結 GalNAc-2 の用量依存的試験 (Bx がアデニンである実施例 37 及び 41 を参照のこと)

5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc-2 共役体を含む ISIS 661134 (実施例 41 を参照のこと) を、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 ISIS 440762 及び 651900 (3' 末端に GalNAc-1 共役体、実施例 9 を参照のこと) を比較のために試験に含め、先の表 17 に記載する。

【0821】

処理

6 週齢の雄 Balb/c マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、ISIS 440762、651900、661134、または PBS 処理対照を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 72 時間後にマウスを殺して、リアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓における SRB-1 mRNA レベルを標準プロトコルに従って決定した。PBS 処理対照に対して正規化する前に (Ribogreen を用いて) SRB-1 mRNA レベルを全 RNA との比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS 処理対照に対して正規化された各処理群の SRB-1 mRNA レベルの平均パーセントとして提示され、「%PBS」で表示される。当該方法と同様の方法を用いて ED50 を測定し、以下に提示する。

【0822】

表 3 5 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で SRB-1 mRNA レベルを低下させた。実際には、5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体 (ISIS 661134) または 3' 末端に連結された GalNAc₃-1 共役体 (ISIS 651900) を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 440762) と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体を含む ISIS 661134 は、3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含む ISIS 651900 と比較して、等効力であった。

【0823】

【表 21】

表 3 5

SRB-1 を標的とする、GalNAc₃-1 または GalNAc₃-2 を含有する ASO

ISIS 番号	用量 (mg / kg)	SRB-1 mRNA レベル (% PBS)	ED ₅₀ (mg / kg)	共役体	配列番号
PBS	0	100	--	--	
440762	0.2	116	2.58	共役体なし	2250
	0.7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0.07	95	0.26	3' GalNAc ₃ -1	2251
	0.2	77			
	0.7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0.07	107	0.25	5' GalNAc ₃ -2	2254
	0.2	86			
	0.7	28			
	2	10			
	7	6			

3' GalNAc₃-1 及び 5' GalNAc₃-2 の構造は、先の実施例 9 及び 37 に記載されている。

【0824】

薬物動態分析 (PK)

高用量群 (7 mg / kg) での ASO の PK を調べ、実施例 20 に例証される方法と同一の方法で評価した。肝臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出した。661134 (5' GalNAc₃-2) 及び ISIS 651900 (3' GalNAc₃-1) の全長代謝物を特定し、これらの質量を高分解能質量分析によって確認した。結果は、5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体を含む ASO (ISIS 661134) に対して検出された主な代謝物が、ISIS 440762 であったことを示した (データ示されず)。検出可能なレベルでさらなる代謝物は観察されなかった。その対応物とは異なり、先の表 23a に報告された代謝物と同様のさらなる代謝物が、3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を有する ASO (ISIS 651900) で観察された。これらの結果は、ホスホジエステル連結 GalNAc₃-1 または GalNAc₃-2 共役体を有することで、それらの力価を損なうことなく ASO の PK プロファイルを改善することを示唆する。

【0825】

実施例44：SRB-1を標的とする3'末端にGalNAc₃-1共役体（実施例9を参照のこと）を含むASOのアンチセンス阻害へのPO/PS連結部の影響

それぞれSRB-1を標的とする、3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むISIS 655861及び655862を、単回投与試験においてマウスにおけるSRB-1を阻害するそれらの能力について試験した。親非共役化合物ISIS 353382を比較のために試験に含めた。

【0826】

ASOは5-10-5MOEギャップマーであり、ギャップ領域は、10個の2'-デオキシリボヌクレオシドを含み、各ウイング領域は、5個の2'-MOE修飾ヌクレオシドを含む。ASOを先の実施例19に例証される方法と同様の方法を用いて調製し、以下の表36に示す。

【0827】

【表22】

表36

SRB-1を標的とする3'末端にGalNAc₃-1共役体を含む修飾ASO

ISIS 番号	配列 (5' ~ 3')	化学	配列 番号
3533 82 (親)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	共役体なしの完全 PS	22 56
6558 61	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '- GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ - 1 共役体を有す る完全PS	22 57
6558 62	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _d _s T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-G alNAc ₃ -1 _a	alNAc ₃ -1 共役体を有する混 合PS/PO	22 57

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「GalNAc₃-1」の構造が実施例9に示される。

処理

【0828】

6週齢の雄Balb/cマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 353382、655861、655862、またはPBS処理対照を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。治療前及び最終服用後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。PBS処理対照に対して正規化する前に（Ribogreenを用いて）SRB-1 mRNAレベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS処理対照に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示され、「%PBS」で表示される。当該方法と同様の方法を用いてED50を測定し、以下に報告

する。

【0829】

表37に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、PBS処理対照と比較して、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。実際には、3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 655861及び655862）は、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 353382）と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、混成PS/PO連結部を有するISIS 655862は、完全PS（ISIS 655861）と比較して、力価の改善を示した。

【0830】

【表23】

表37

SRB-1を標的とする3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むASOのアンチセンス阻害へのPO/PS連結部の影響

ISIS S番号	用 量 (mg / k g)	SRB-1 mRNA レ ベル (%) PBS)	ED ₅₀ (mg/ kg)	化学	配列番号
PBS	0	100	—	—	
353 382 (親)	3 10 30	76.65 52.40 24.95	10.4	共役体なしの完全PS	2256
655 861	0.5 1.5 5 15	81.22 63.51 24.61 14.80	2.2	GalNAc ₃ -1 共役体を有する完全P S	2257
655 862	0.5 1.5 5 15	69.57 45.78 19.70 12.90	1.3	GalNAc ₃ -1共 役体を有する混合PS /PO	2257

【0831】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。臓器重量も評価した。結果は、PBS対照と比較して、ASOで処理したマウスにおいて、トランスアミナーゼレベル（表38）の増加も臓器重量（データ示されず）の増加も観察されなかったことを示した。さらに、混成PS/PO連結部を有するASO（ISIS 655862）は、完全PS（ISIS 655861）と比較して、同様のトランスアミナーゼレベルを示した。

【0832】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 3 8

SRB-1 を標的とする 3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含む ASO のトランスアミナーゼレベルへの PO/PS 連結部の影響

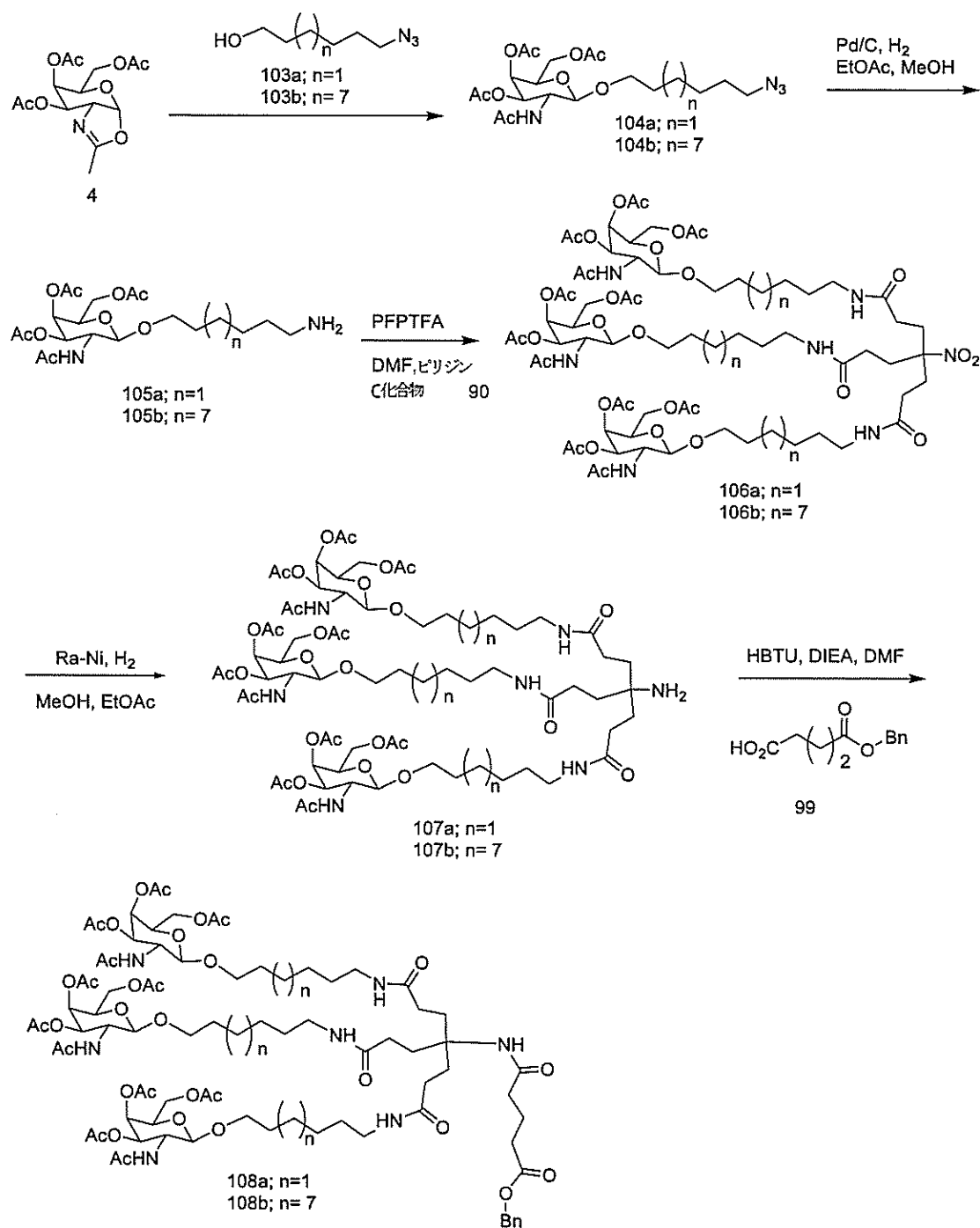
ISI S 番号	用 量 (mg / k g)	ALT (U / L)	AST (U / L)	化学	配列番号
PBS	0	28.5	65	—	
353 382 (parent)	3	50.2 5	89	共役体なしの完全 PS	2256
	10	27.5	79.3		
	30	27.3	97		
655 861	0.5	28	55.7	GalNAc ₃ - 1 共役体を有する 完全 PS	2257
	1.5	30	78		
	5	29	63.5		
	15	28.8	67.8		
655 862	0.5	50	75.5	GalNAc ₃ - 1 共役体を有する 混合 PS/PO	2257
	1.5	21.7	58.5		
	5	29.3	69		
	15	22	61		

【0833】

実施例 45：PFPE ステル（化合物 110a）の調製

【0834】

【化 1 7 4】



【 0 8 3 5】

10

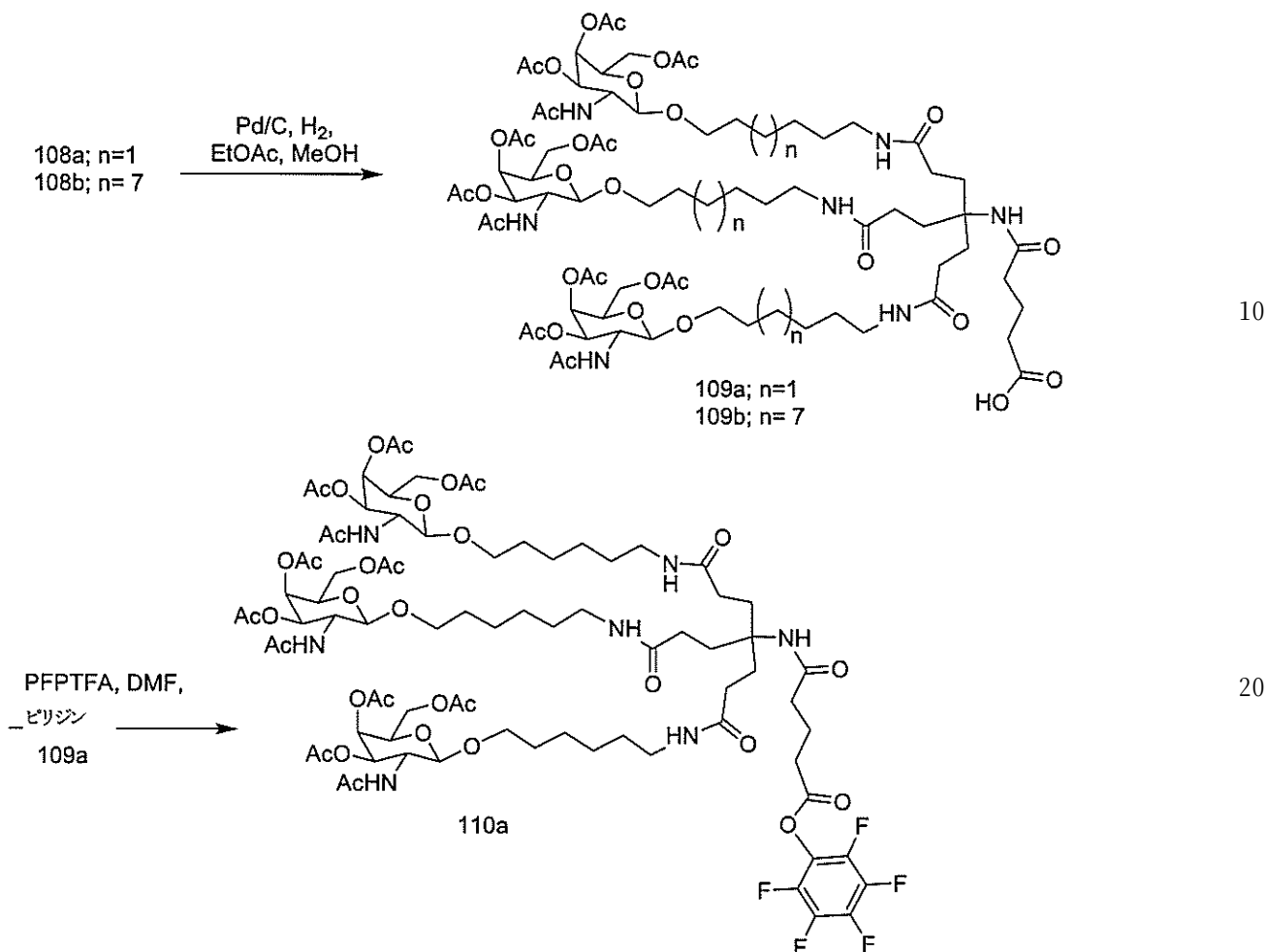
20

30

40

50

【化 1 7 5】



化合物 4 (9.5 g、28.8 mmole) を化合物 103a または 103b (38 mmole) で個別に処理し、ジクロロメタン (200 mL) 中の TMSOTf (0.5 当量) 及びモレキュラーシーブで処理し、室温で 16 時間攪拌した。この時点で、セライトを通して有機層を濾過し、その後、重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で還元した。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー (2% → 10% メタノール / ジクロロメタン) によって精製して、80% 超の収率で化合物 104a 及び 104b を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0836】

化合物 104a 及び 104b を化合物 100a ~ d (実施例 47) と同一の条件で処理して、90% 超の収率で化合物 105a 及び 105b を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0837】

化合物 105a 及び 105b を、化合物 901a ~ d と同一の条件下、化合物 90 で個別に処理して、化合物 106a (80%) 及び 106b (20%) を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0838】

化合物 106a 及び 106b を化合物 96a ~ d (実施例 47) と同一の条件で処理して、107a (60%) 及び 107b (20%) を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0839】

化合物 107a 及び 107b を化合物 97a ~ d (実施例 47) と同一の条件で処理し

て、40～60%の収率で化合物108a及び108bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

【0840】

化合物108a(60%)及び108b(40%)を化合物100a～d(実施例47)と同一の条件で処理して、80%超の収率で化合物109a及び109bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

【0841】

化合物109aを化合物101a～d(実施例47)と同一の条件で処理して、30～60%の収率で化合物110aを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。あるいは、化合物110bを化合物109bから開始して同様の方法で調製することができる。

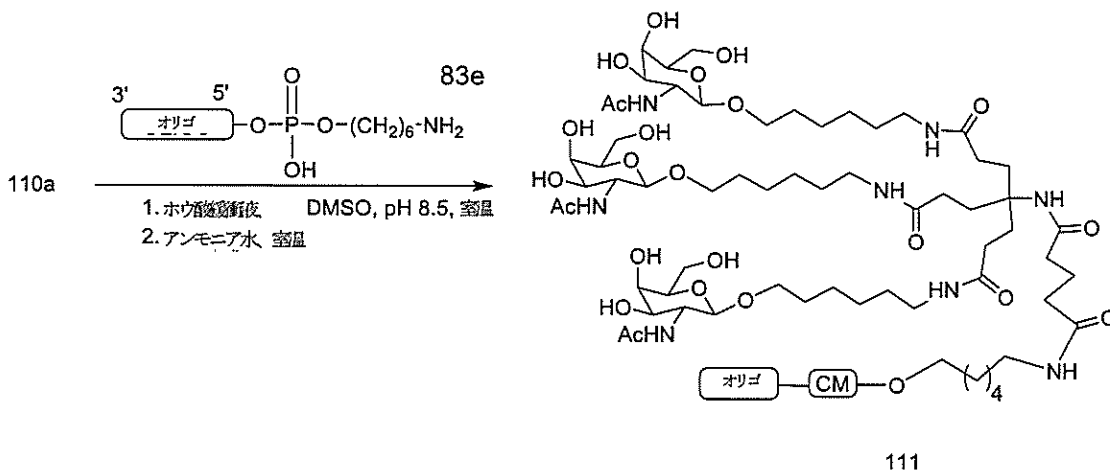
【0842】

実施例46：PFPエステル(オリゴヌクレオチド111)との共役のための一般的手順；ISIS 666881(GalNAc3-10)の調製

標準の固相オリゴヌクレオチド手順を用いて5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチドを合成し、精製した。5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチドを0.1M四ホウ酸ナトリウム(pH8.5、200μL)中に溶解し、DMSO(50μL)中に溶解した3当量の選択されたPFPエステル化GalNAc3クラスターを添加した。ASO溶液への添加時にPFPエステルが沈殿した場合、すべてのPFPエステルが溶解した状態になるまでDMSOを添加した。室温で約16時間混合した後、反応が完了した。結果として生じた溶液を水で希釈して12mLにし、その後、質量カットオフが3000Daのスピンフィルター中、3000rpmで沈降させた。このプロセスを2回繰り返して、小分子不純物を除去した。その後、この溶液を凍結乾燥乾固させ、濃縮アンモニア水中に再溶解し、室温で2.5時間混合し、その後、真空内で濃縮して、アンモニアの大部分を除去した。共役オリゴヌクレオチドを精製し、RP-HPLCによって脱塩し、凍結乾燥させて、GalNAc3共役オリゴヌクレオチドを得た。

【0843】

【化176】

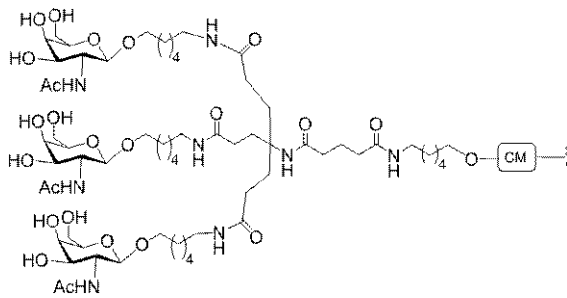


【0844】

オリゴヌクレオチド111をGalNAc3-10と共役する。共役基GalNAc3-10(GalNAc3-10a)のGalNAc3クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、以下のGalNAc3-10で合成されたオリゴヌクレオチド(ISIS 666881)に示される $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{Ad}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$ である。GalNAc3-10(GalNAc3-10a-CM-)の構造は、以下に示される：

【0845】

【化177】



10

【0846】

この一般的手順に従って、ISIS 666881を調製した。標準の固相オリゴヌクレオチド手順を用いて5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチド (ISIS 660254) を合成し、精製した。ISIS 660254 (40mg、5.2 μmol) を0.1M四ホウ酸ナトリウム (pH 8.5、200 μL) 中に溶解し、DMSO (50 μL) 中に溶解した3当量のPFPエステル (化合物110a) を添加した。ASO溶液への添加時にPFPエステルが沈殿した場合、PFPエステルを完全に溶解するためにさらなるDMSO (600 μL) が必要であった。室温で約16時間混合した後、反応が完了した。この溶液を水で希釈して全体積12mLにし、質量カットオフが3000Daのスピニフィルター中、3000rpmで沈降させた。このプロセスを2回繰り返して、小分子不純物を除去した。この溶液を凍結乾燥乾固させ、濃縮アンモニア水中に再溶解し、室温で2.5時間混合し、その後、真空内で濃縮して、アンモニアの大部分を除去した。共役オリゴヌクレオチドを精製し、RP-HPLCによって脱塩し、凍結乾燥させて、90重量%の収率でISIS 666881 (42mg、4.7 μmol) を得た。

20

【0847】

【表25】

GalNAc₃-10共役オリゴヌクレオチド

ASO	配列 (5' ~ 3')	5' 基	配列番号
ISIS 660254	NH ₂ (CH ₂) ₆ - o - A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d s G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _e	ヘキシルアミン	2258
ISIS 666881	GalNAc ₃ -10 _a - o - A _{do} G _{es} ^m C _e s T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -10	2258

30

40

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (PS) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (PO) を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

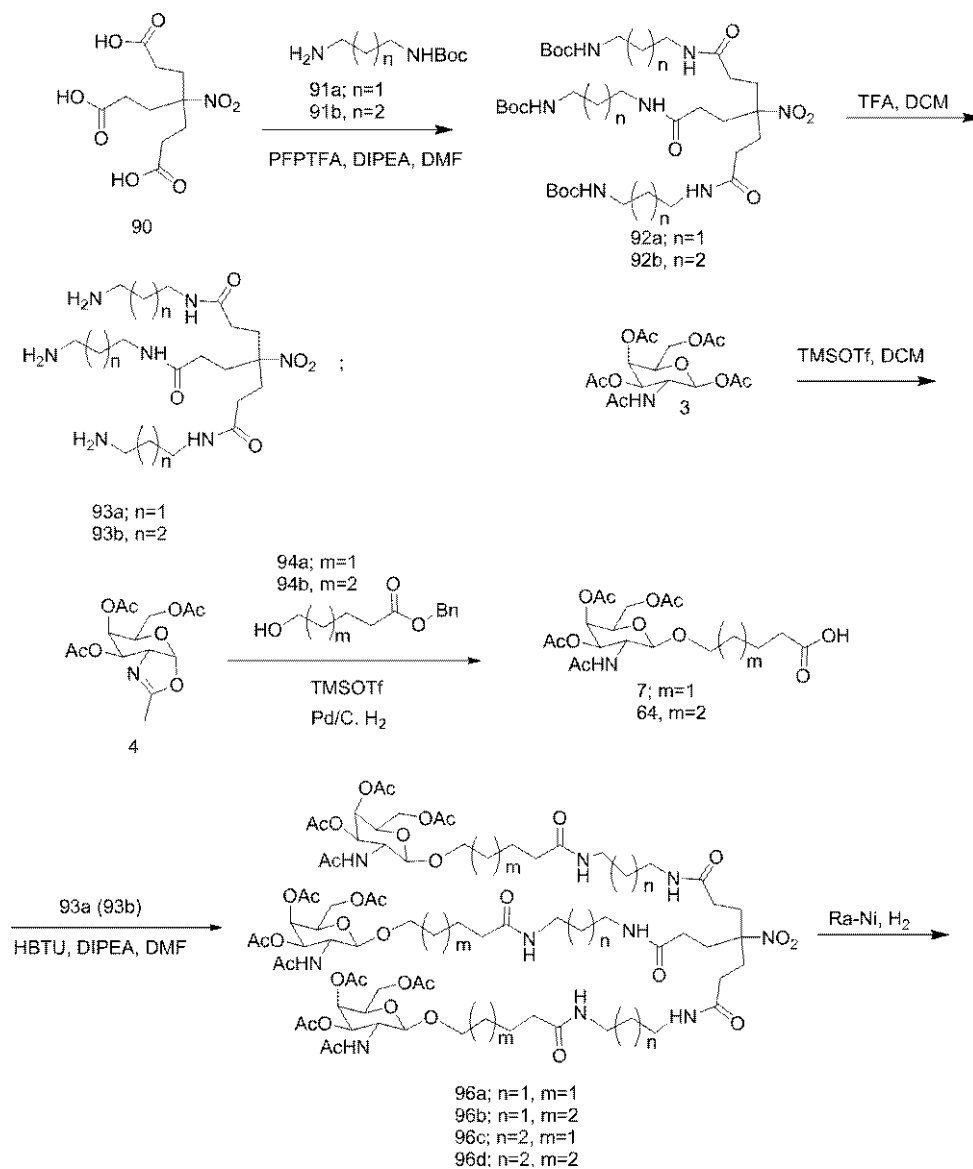
【0848】

実施例47: GalNAc₃-8を含むオリゴヌクレオチド102の調製

【0849】

50

【化 1 7 8】



【 0 8 5 0】

10

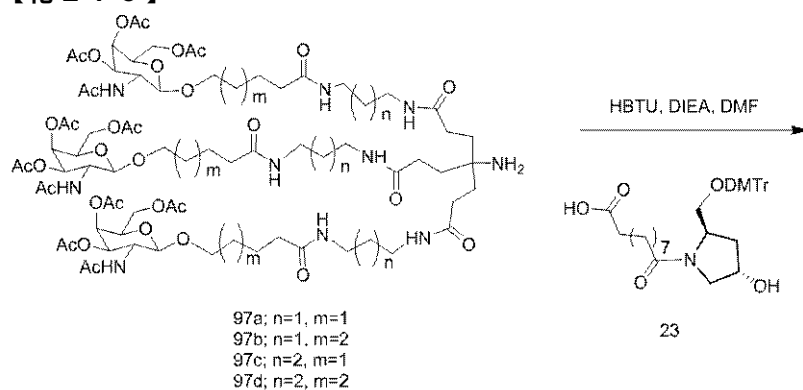
20

30

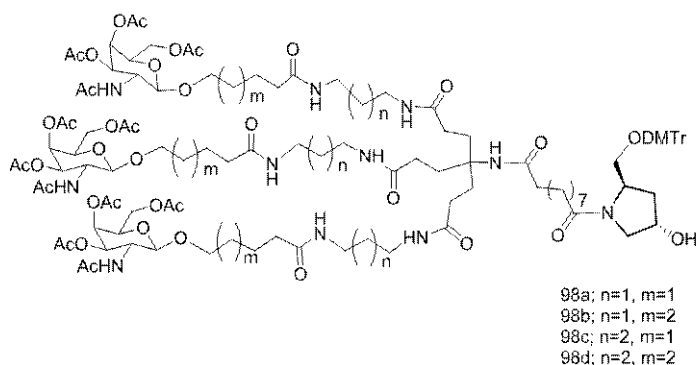
40

50

【化 1 7 9】



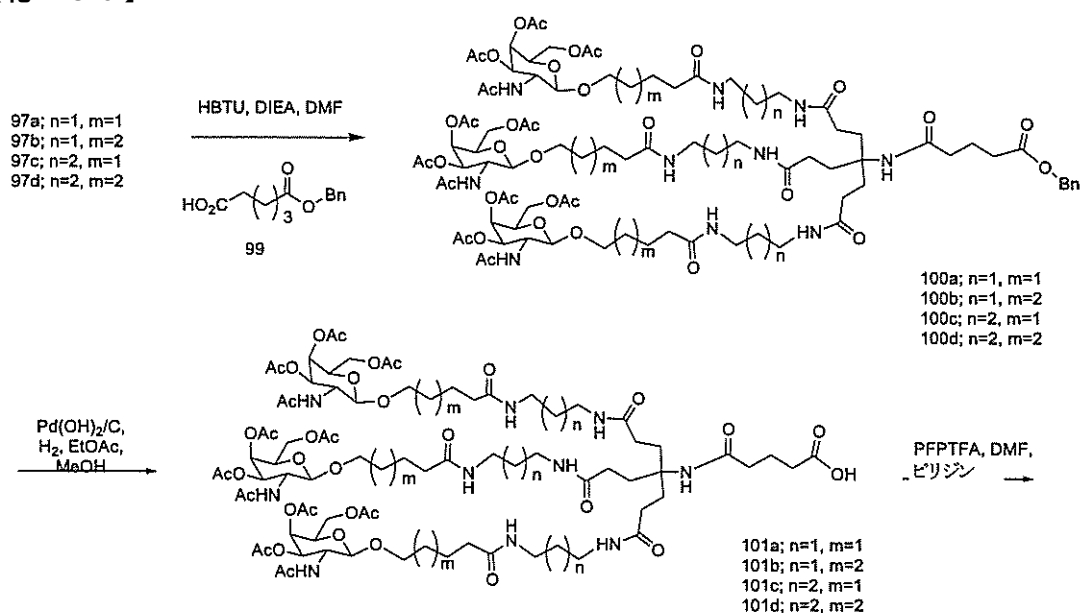
10



20

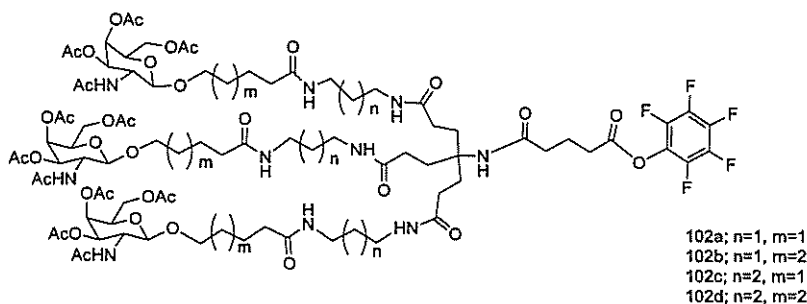
【 0 8 5 1】

【化 1 8 0】



30

40



三酸 90 (4 g、14.43 mmol) を DMF (120 mL) 及び N, N-ジイソブ

50

ロピルエチルアミン（12.35 mL、72 mmol）中に溶解した。トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル（8.9 mL、52 mmol）をアルゴン下で滴加し、反応物を室温で30分間攪拌させた。Boc-ジアミン91aまたは91b（68.87 mmol）をN,N-ジイソプロピルエチルアミン（12.35 mL、72 mmol）とともに添加し、反応物を室温で16時間攪拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（2%→10%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、約80%の収率で化合物92a及び92bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

10

【0852】

化合物92aまたは92b（6.7 mmol）を20 mLのジクロロメタン及び20 mLのトリフルオロ酢酸で、室温で16時間処理した。結果として生じた溶液を蒸発させ、その後、メタノール中に溶解し、DOWEX-OH樹脂で30分間処理した。結果として生じた溶液を濾過し、減圧下で減量して油状物とすることで、85～90%の収率の化合物93a及び93bを得た。

【0853】

化合物7または64（9.6 mmol）をDMF（20 mL）中のHBTU（3.7 g、9.6 mmol）及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（5 mL）で15分間処理した。これに、化合物93aまたは93b（3 mmol）のいずれかを添加し、室温で16時間攪拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（5%→20%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、20～40%の収率で化合物96a～dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

20

【0854】

化合物96a～d（0.75 mmol）をラネーニッケル上で3時間、エタノール（75 mL）中で個別に水素化した。この時点で、セライトを通して触媒を濾去し、エタノールを減圧下で除去して、80～90%の収率で化合物97a～dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

30

【0855】

化合物23（0.32 g、0.53 mmol）をDMF（30 mL）中のHBTU（0.2 g、0.53 mmol）及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.19 mL、1.14 mmol）で15分間処理した。これに、化合物97a～d（0.38 mmol）を個別に添加し、室温で16時間攪拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（2%→20%メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、30～40%の収率で化合物98a～dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

40

【0856】

化合物99（0.17 g、0.76 mmol）をDMF（50 mL）中のHBTU（0.29 g、0.76 mmol）及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン（0.35 mL、2.0 mmol）で15分間処理した。これに、化合物97a～d（0.51 mmol）を個別に添加し、室温で16時間攪拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾

50

燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（５％→２０％メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、４０～６０％の収率で化合物１００ａ～ｄを得た。ＬＣＭＳ及びプロトンＮＭＲは、その構造と一致した。

【０８５７】

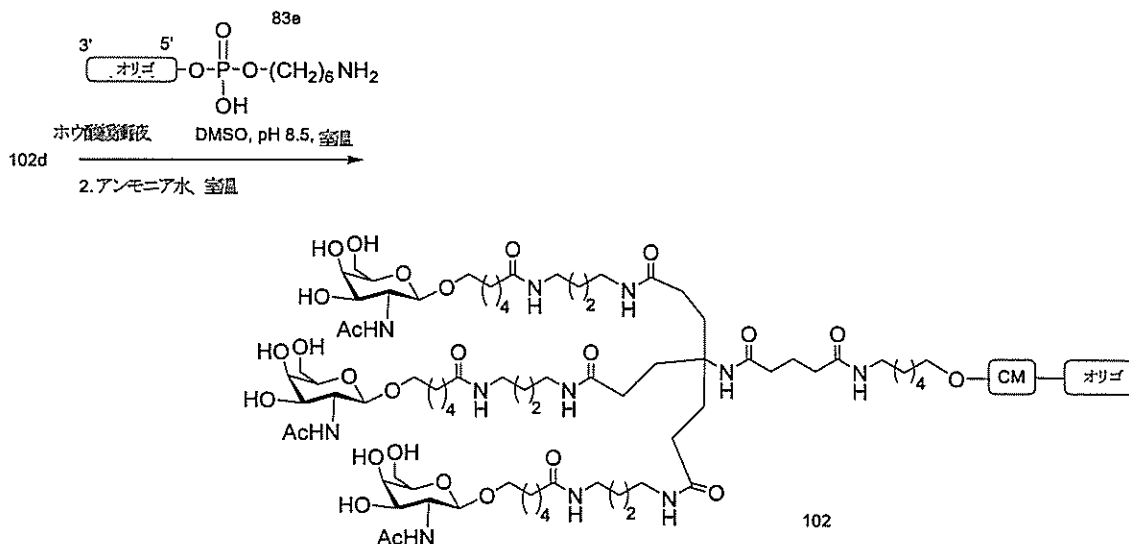
化合物１００ａ～ｄ（０．１６ｍｍｏｌ）を、１０％Ｐｄ（ＯＨ）_２／Ｃ上で３時間、メタノール／酢酸エチル（１：１、５０ｍＬ）中で個別に水素化した。この時点で、セライトを通して触媒を濾去し、有機物を減圧下で除去して、８０～９０％の収率で化合物１０１ａ～ｄを得た。ＬＣＭＳ及びプロトンＮＭＲは、その構造と一致した。

【０８５８】

化合物１０１ａ～ｄ（０．１５ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（１５ｍＬ）及びピリジン（０．０１６ｍＬ、０．２ｍｍｏｌ）中に個別に溶解した。トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル（０．０３４ｍＬ、０．２ｍｍｏｌ）をアルゴン下で滴加し、反応物を室温で３０分間撹拌させた。この時点で、ＤＭＦを減圧下で７５％超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（２％→５％メタノール／ジクロロメタン）によって精製して、約８０％の収率で化合物１０２ａ～ｄを得た。ＬＣＭＳ及びプロトンＮＭＲは、その構造と一致した。

【０８５９】

【化１８１】



【０８６０】

実施例４６に例証される一般的手順を用いて、ＧａｌＮＡｃ_３－８共役基を含むオリゴマー化合物１０２を調製した。共役基ＧａｌＮＡｃ_３－８（ＧａｌＮＡｃ_３－８_a）のＧａｌＮＡｃ_３クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。好ましい一実施形態において、切断可能部分は、－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）－Ａ_d－Ｐ（＝Ｏ）（ＯＨ）－である。

【０８６１】

ＧａｌＮＡｃ_３－８（ＧａｌＮＡｃ_３－８_a－ＣＭ－）の構造は、以下に示される：

【０８６２】

10

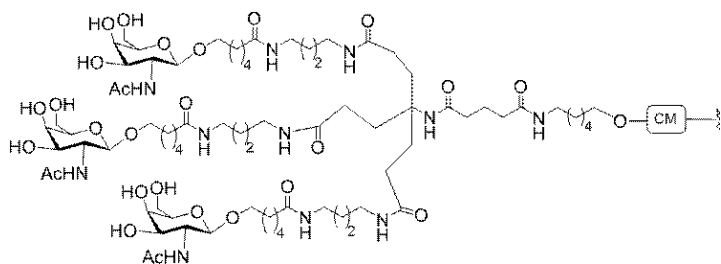
20

30

40

50

【化 182】



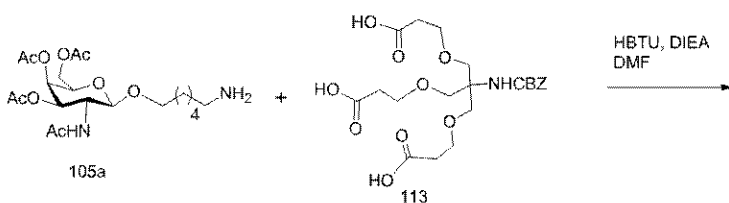
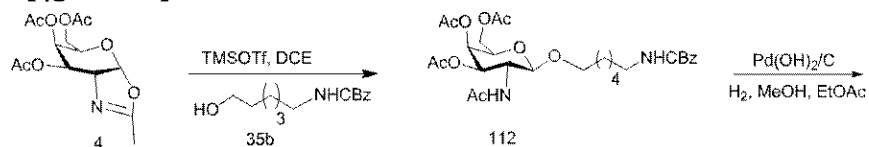
【0863】

10

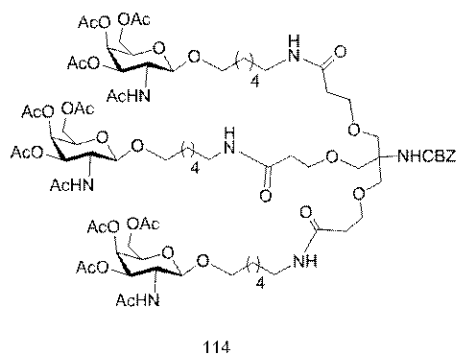
実施例 48 : GalNAc3-7 を含むオリゴヌクレオチド 119 の調製

【0864】

【化 183】



20



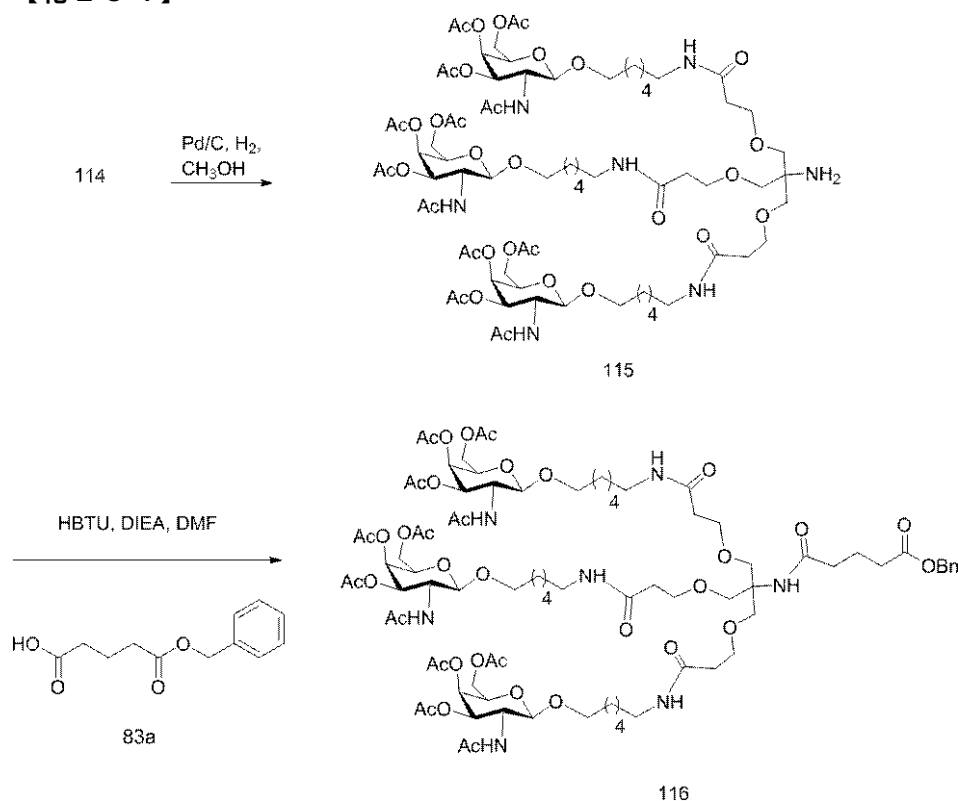
30

【0865】

40

50

【化 1 8 4】



10

20

文献 (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808) に記載される手順に従って化合物 112 を合成した。

【0866】

化合物 112 (5 g、8.6 mmol) を 1 : 1 メタノール／酢酸エチル (22 mL / 22 mL) 中に溶解した。炭素 (0.5 g) 上水酸化パラジウムを添加した。反応混合物を室温で 12 時間、水素下で撹拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、そのパッドを 1 : 1 メタノール／酢酸エチルで洗浄した。濾液と洗浄物を合わせ、濃縮乾固させて、化合物 105a (定量的) を得た。この構造を、LCMS によって確認した。

30

【0867】

化合物 113 (1.25 g、2.7 mmol)、HBTU (3.2 g、8.4 mmol)、及び DIEA (2.8 mL、16.2 mmol) を無水 DMF (17 mL) 中に溶解し、反応混合物を室温で 5 分間撹拌した。これに、無水 DMF (20 mL) 中の化合物 105a (3.77 g、8.4 mmol) の溶液を添加した。反応物を室温で 6 時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去して、油状物を得た。残渣を CH_2Cl_2 (100 mL) 中に溶解し、飽和 NaHCO_3 水溶液 (100 mL) 及びブライン (100 mL) で洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、蒸発させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 10~20% MeOH で溶出して、化合物 114 (1.45 g、30%) を得た。この構造を、LCMS 及び ^1H NMR 分析によって確認した。

40

【0868】

化合物 114 (1.43 g、0.8 mmol) を 1 : 1 メタノール／酢酸エチル (4 mL / 4 mL) 中に溶解した。パラジウム炭素 (湿性、0.14 g) を添加した。反応混合物を水素でフラッシュし、室温で 12 時間、水素下で撹拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過した。このセライトパッドをメタノール／酢酸エチル (1 : 1) で洗浄した。濾液と洗浄物を一つに合わせ、減圧下で蒸発させて、化合物 115 (定量的) を得た。この構造を、LCMS 及び ^1H NMR 分析によって確認した。

【0869】

化合物 83a (0.17 g、0.75 mmol)、HBTU (0.31 g、0.83 mmol)

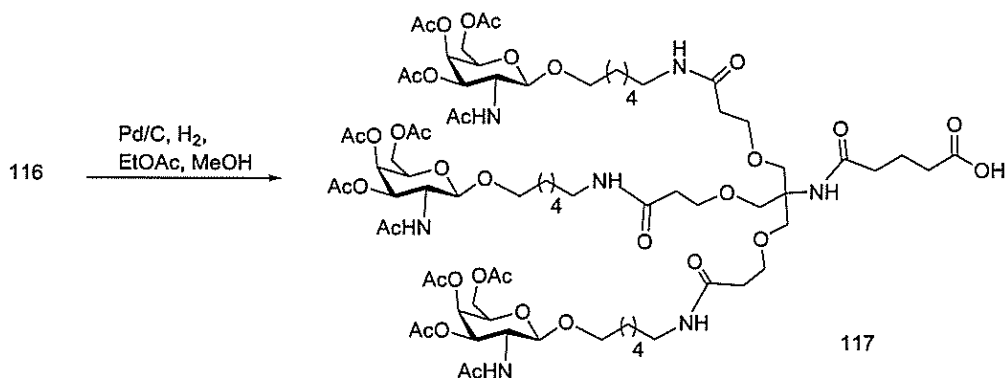
50

mol)、及びDIEA(0.26mL、1.5mmol)を無水DMF(5mL)中に溶解し、反応混合物を室温で5分間攪拌した。これに、無水DMF中の化合物115(1.22g、0.75mmol)の溶液を添加し、反応物を室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をCH₂Cl₂中に溶解した。有機層を飽和NaHCO₃水溶液及びブラインで洗浄し、無水Na₂SO₄上で乾燥させ、濾過した。有機層を濃縮乾固させ、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の3~15%MeOHで溶出して、化合物116(0.84g、61%)を得た。この構造を、LCMS及び¹H NMR分析によって確認した。

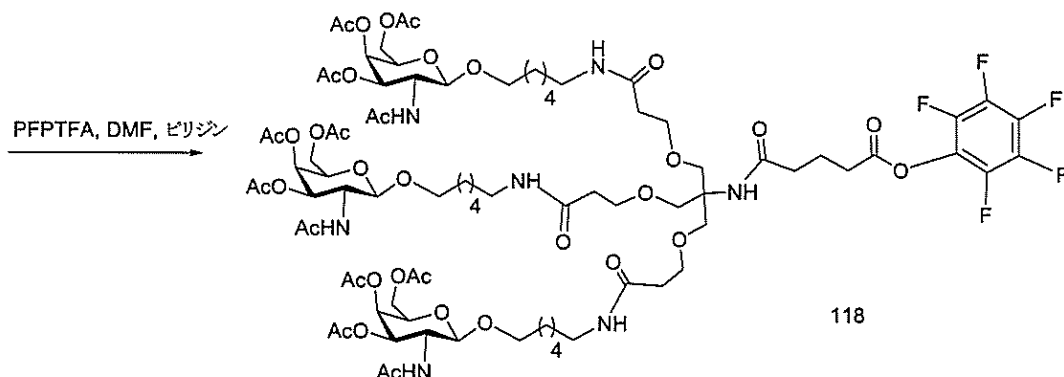
【0870】

【化185】

10



20



30

【0871】

化合物116(0.74g、0.4mmol)を1:1メタノール／酢酸エチル(5mL／5mL)中に溶解した。パラジウム炭素(湿性、0.074g)を添加した。反応混合物を水素でフラッシュし、室温で12時間、水素下で攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過した。このセライトパッドをメタノール／酢酸エチル(1:1)で洗浄した。濾液と洗浄物を一つに合わせ、減圧下で蒸発させて、化合物117(0.73g、98%)を得た。この構造を、LCMS及び¹H NMR分析によって確認した。

【0872】

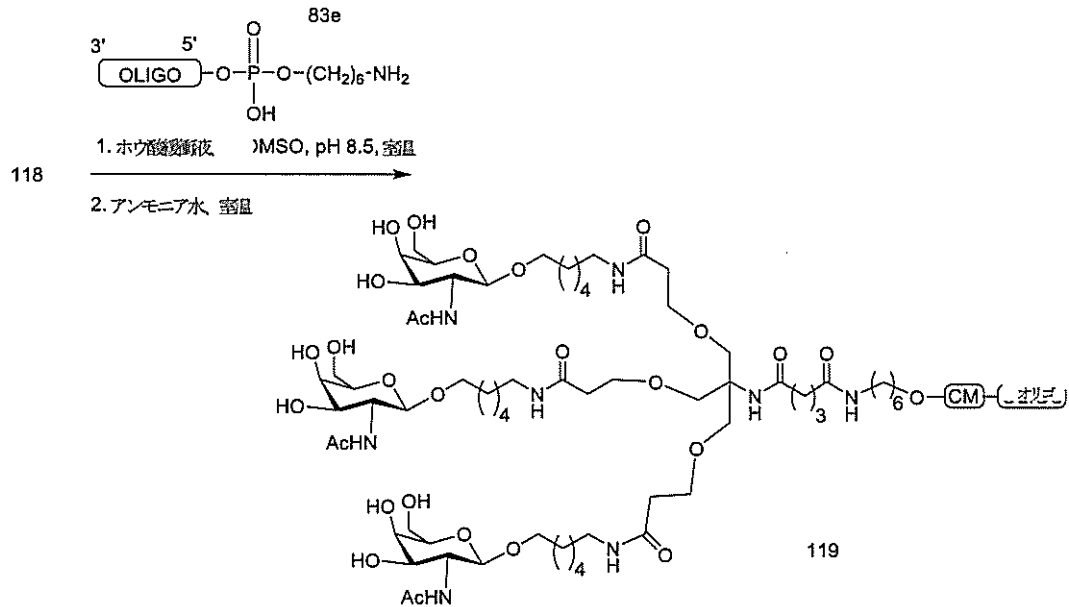
40

化合物117(0.63g、0.36mmol)を無水DMF(3mL)中に溶解した。この溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(70μL、0.4mmol)及びトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル(72μL、0.42mmol)を添加した。反応混合物を室温で12時間攪拌し、飽和NaHCO₃水溶液に注いだ。この混合物をジクロロメタンで抽出し、ブラインで洗浄し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。このジクロロメタン溶液を濃縮乾固させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、ジクロロメタン中の5~10%MeOHで溶出して、化合物118(0.51g、79%)を得た。この構造を、LCMSと、¹Hならびに¹⁹F NMRによって確認した。

【0873】

50

【化 1 8 6】



10

【 0 8 7 4】

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-7 共役基を含むオリゴマー化合物 119 を調製した。共役基 GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

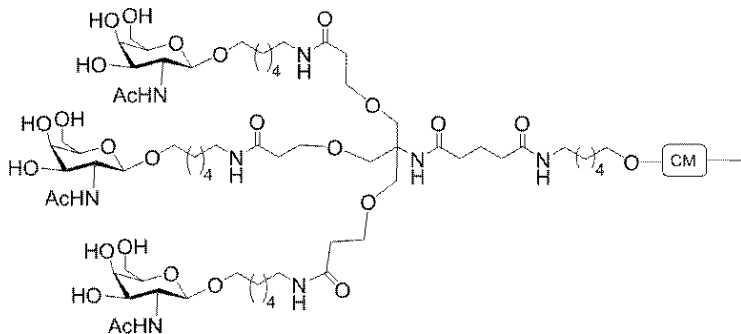
20

【 0 8 7 5】

GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 0 8 7 6】

【化 1 8 7】



30

【 0 8 7 7】

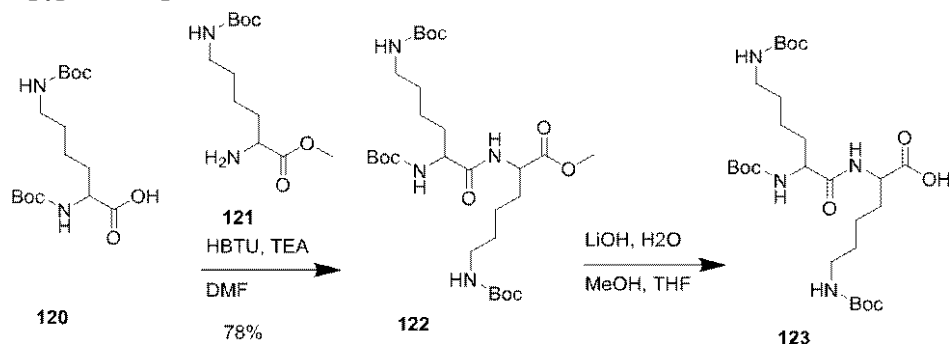
実施例 49：GalNAc₃-5 を含むオリゴヌクレオチド 132 の調製

40

【 0 8 7 8】

50

【化 188】



10

化合物 120 (14.01 g、40 mmol) 及び HBTU (14.06 g、37 mmol) を無水 DMF (80 mL) 中に溶解した。トリエチルアミン (11.2 mL、80.35 mmol) を添加し、5 分間攪拌した。反応混合物を氷浴中で冷却し、無水 DMF (20 mL) 中の化合物 121 (10 g、mmol) の溶液を添加した。さらなるトリエチルアミン (4.5 mL、32.28 mmol) を添加し、反応混合物をアルゴン雰囲気下で 18 時間攪拌した。TLC (1:1 の酢酸エチル:ヘキサン; $R_f = 0.47$) によって反応を監視した。溶媒を減圧下で除去した。残渣を EtOAc (300 mL) 中に取り込み、1 M NaHSO₄ (3×150 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3×150 mL)、及びブライン (2×100 mL) で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥させた。乾燥剤を濾去し、有機層を回転蒸発によって濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の 35~50% EtOAc を用いて溶出して、化合物 122 (15.50 g、78.13%) を得た。この構造を、LCMS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。質量 (m/z) 589.3 [M+H]⁺。

20

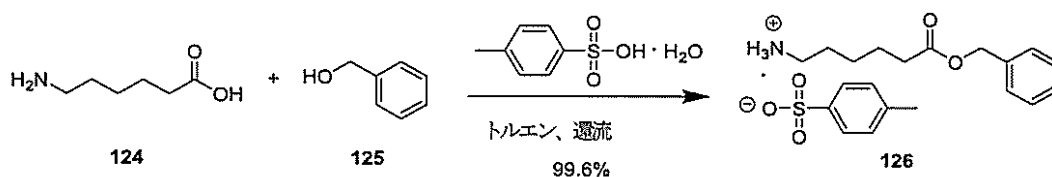
【0879】

水 (20 mL) 及び THF (10 mL) 中の LiOH (92.15 mmol) の溶液を、メタノール (15 mL) 中に溶解した化合物 122 の冷溶液 (7.75 g、13.16 mmol) に添加した。反応混合物を室温で 45 分間攪拌し、TLC (1:1 の EtOAc:ヘキサン) によって監視した。反応混合物を減圧下で濃縮して、半分の体積にした。残りの溶液を氷浴中で冷却して、濃縮 HCl を添加して中和した。反応混合物を希釈し、EtOAc (120 mL) で抽出し、ブライン (100 mL) で洗浄した。エマルジョンが生じたが、一晩静置すると濁りがなくなった。有機層を分離し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、蒸発させて、化合物 123 (8.42 g) を得た。質量が大きすぎる原因はおそらく残留塩である。LCMS は、この構造と一致した。この生成物をさらに精製することなく使用した。M.W. 計算値: 574.36、M.W. 実測値: 575.3 [M+H]⁺。

30

【0880】

【化 189】



40

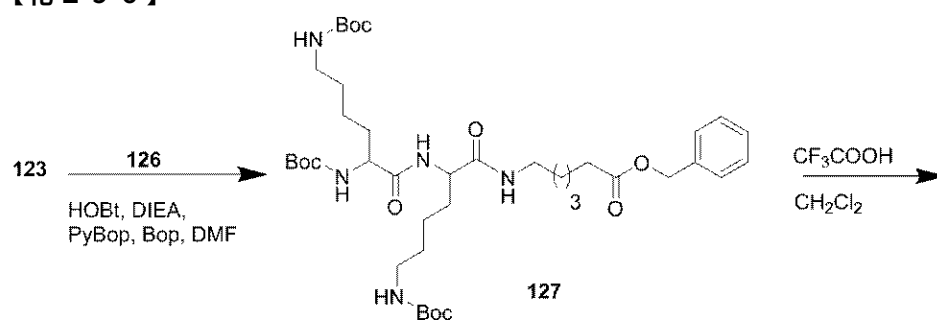
【0881】

文献 (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 958-963) に記載される手順に従って化合物 126 を合成した。

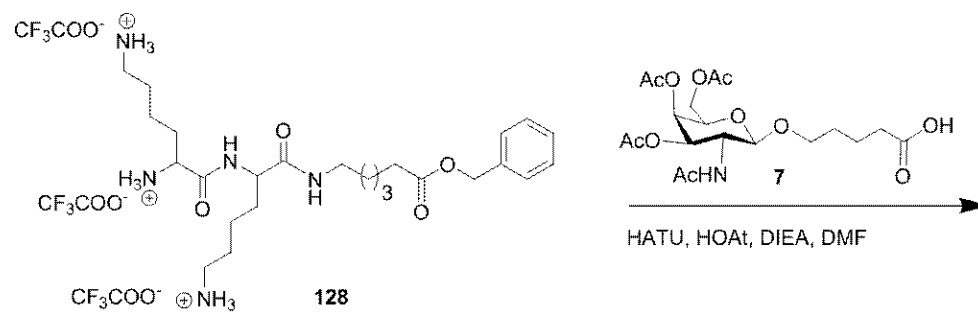
【0882】

50

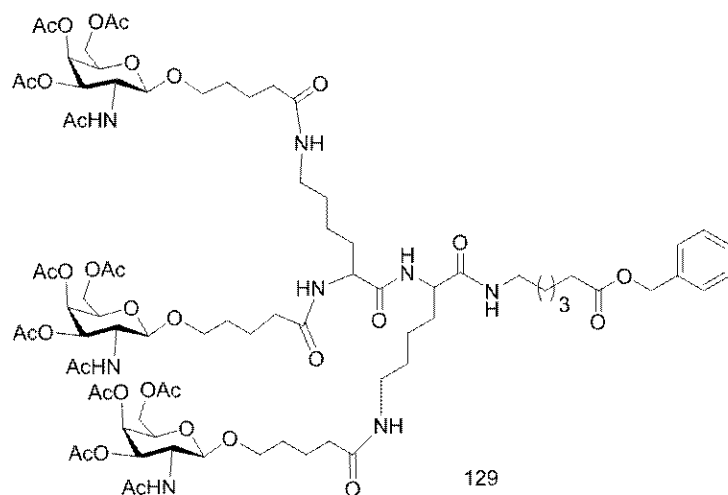
【化 1 9 0】



10



20



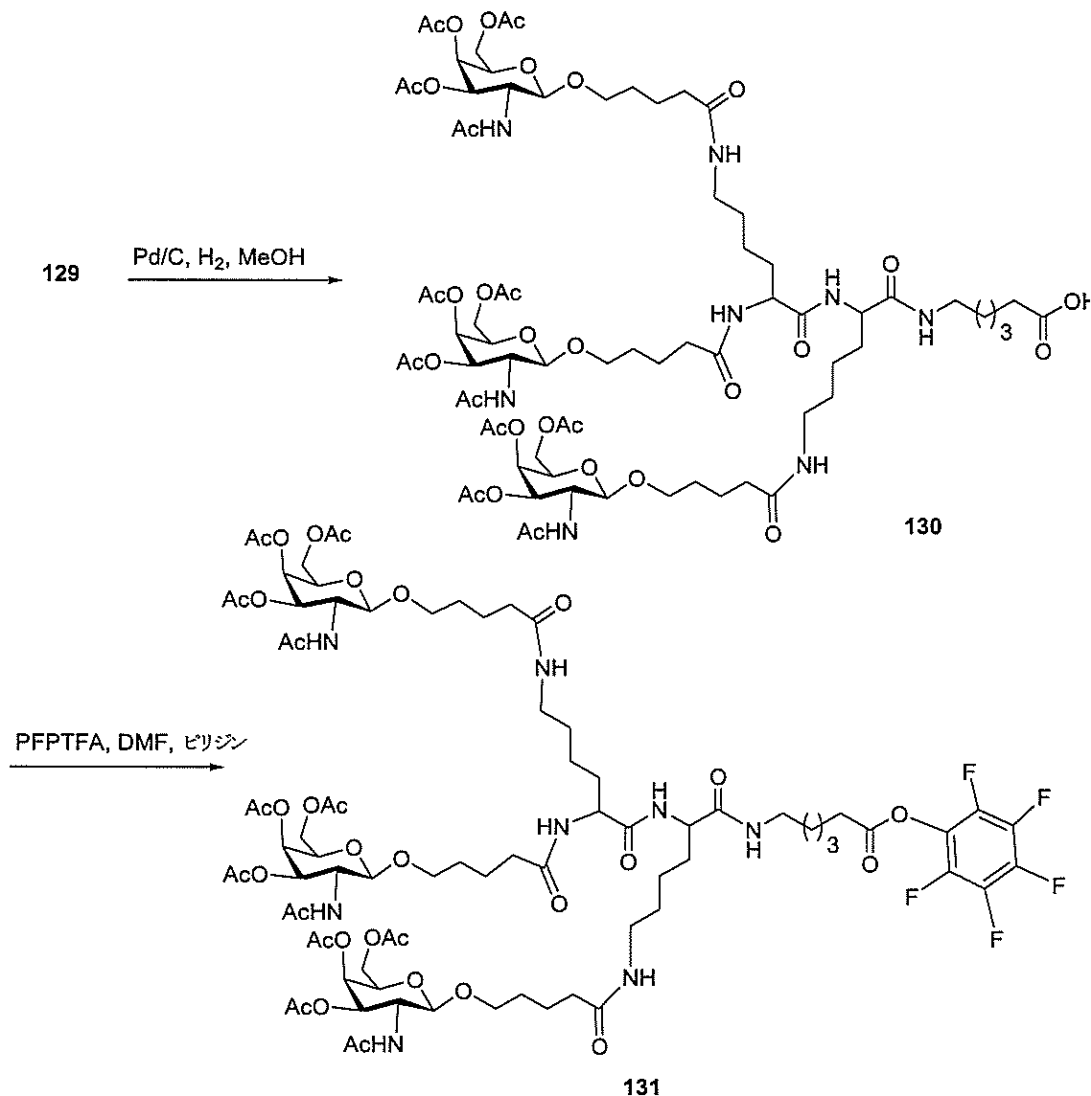
30

【 0 8 8 3】

40

50

【化 1 9 1】



【0 8 8 4】

化合物 1 2 3 (7.419 g、12.91 mmol)、HOBt (3.49 g、25.82 mmol)、及び化合物 1 2 6 (6.33 g、16.14 mmol) を DMF (40 mL) 中に溶解し、結果として生じた反応混合物を氷浴中で冷却した。これに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (4.42 mL、25.82 mmol)、PyBop (8.7 g、16.7 mmol)、続いて、Bopカップリング試薬 (1.17 g、2.66 mmol) をアルゴン雰囲気下で添加した。氷浴を除去し、溶液を室温まで温めた。1 時間後に反応が完了したことを、TLC (89:10:1 の DCM:MeOH:AA) によって決定した。反応混合物を減圧下で濃縮した。残渣を EtOAc (200 mL) 中に溶解し、1 M NaHSO₄ (3×100 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3×100 mL)、及びブライン (2×100 mL) で洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、濃縮した。残渣を 50% ヘキサン/EtOAc:100% EtOAc の勾配でのシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、白色の泡状物として化合物 1 2 7 (9.4 g) を得た。LCMS 及び ¹H NMR は、その構造と一致した。質量 (m/z) 778.4 [M+H]⁺。

【0 8 8 5】

トリフルオロ酢酸 (12 mL) をジクロロメタン (12 mL) 中の化合物 1 2 7 (1.57 g、2.02 mmol) の溶液に添加し、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧下でトルエン (30 mL) と共蒸発乾固させた。得られた残渣をアセトニトリル (30 mL)

L) 及びトルエン (40 mL) と2回共蒸発させて、トリフルオロ酢酸塩として化合物 128 (1.67 g) を得て、さらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS 及び ^1H NMR は、その構造と一致した。質量 (m/z) 478.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

【0886】

丸底フラスコ内で、化合物 7 (0.43 g、0.963 mmol)、HATU (0.35 g、0.91 mmol)、及び HOAt (0.035 g、0.26 mmol) を一つに合わせ、減圧下、 P_2O_5 上で4時間乾燥させ、その後、無水 DMF (1 mL) 中に溶解し、5分間攪拌した。これに無水 DMF (0.2 mL) 及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.2 mL) 中の化合物 128 (0.20 g、0.26 mmol) の溶液を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下、室温で攪拌した。30分間後に反応が完了したことを、LCMS 及び TLC (7% MeOH/DCM) によって決定した。反応混合物を減圧下で濃縮した。残渣を DCM (30 mL) 中に溶解し、1M NaHSO_4 (3×20 mL)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (3×20 mL)、及びブライン (3×20 mL) で洗浄した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をジクロロメタン中の 5~15% MeOH を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、化合物 129 (96.6 mg) を得た。LCMS 及び ^1H NMR は、この構造と一致する。質量 (m/z) 883.4 $[\text{M}+2\text{H}]^+$ 。

【0887】

20 mL のシンチレーションバイアル内で化合物 129 (0.09 g、0.051 mmol) をメタノール (5 mL) 中に溶解した。これに、少量の 10% Pd/C (0.015 mg) を添加し、反応容器を H_2 ガスでフラッシュした。反応混合物を室温で18時間、 H_2 雰囲気下で攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、このセライトパッドをメタノールで洗浄した。濾液洗浄物を一つにプールし、減圧下で濃縮して、化合物 130 (0.08 g) を得た。LCMS 及び ^1H NMR は、その構造と一致した。この生成物をさらに精製することなく使用した。質量 (m/z) 838.3 $[\text{M}+2\text{H}]^+$ 。

【0888】

10 mL の先の尖った丸底フラスコに、化合物 130 (75.8 mg、0.046 mmol)、0.37 M ピリジン/DMF (200 μL)、及び攪拌子を添加した。この溶液に、0.7 M トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル/DMF (100 μL) を攪拌しながら滴加した。1時間後に反応が完了したことを、LCMS によって決定した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を CHCl_3 (約10 mL) 中に溶解した。有機層を NaHSO_4 (1M、10 mL)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (10 mL)、及びブライン (10 mL) にそれぞれ3回分配した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、化合物 131 (77.7 mg) を得た。LCMS は、この構造と一致した。さらに精製することなく使用した。質量 (m/z) 921.3 $[\text{M}+2\text{H}]^+$ 。

【0889】

10

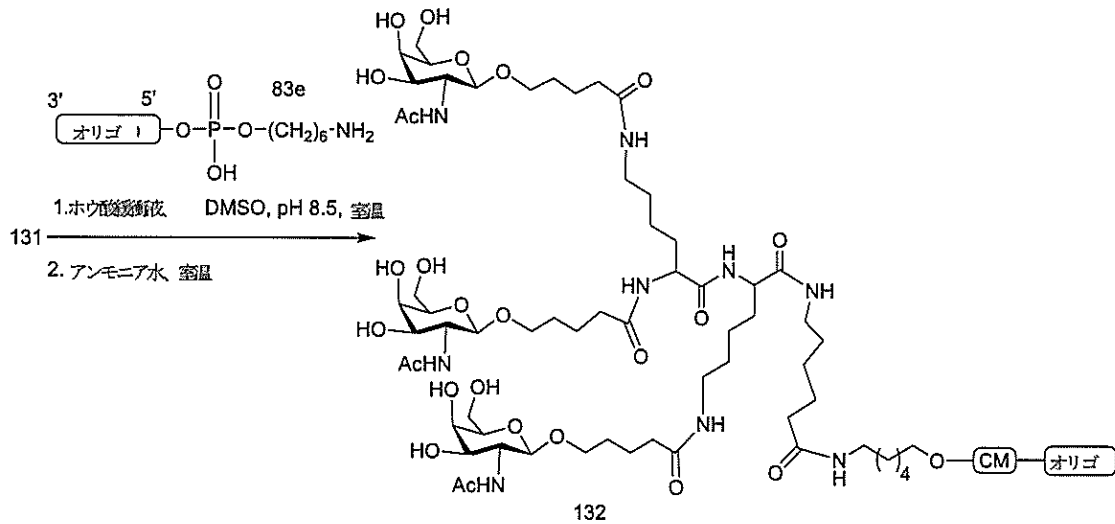
20

30

40

50

【化 1 9 2】



10

【0 8 9 0】

実施例 4 6 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-5 共役基を含むオリゴマー化合物 1 3 2 を調製した。共役基 GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

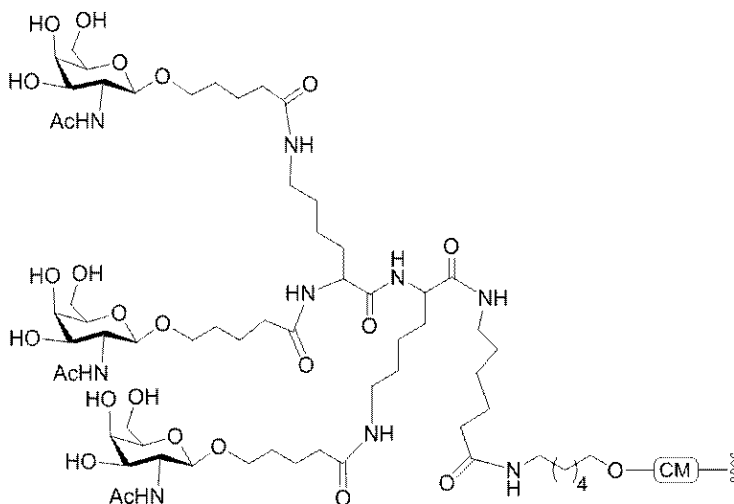
20

【0 8 9 1】

GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a-CM-) の構造は、以下に示される：

【0 8 9 2】

【化 1 9 3】



30

【0 8 9 3】

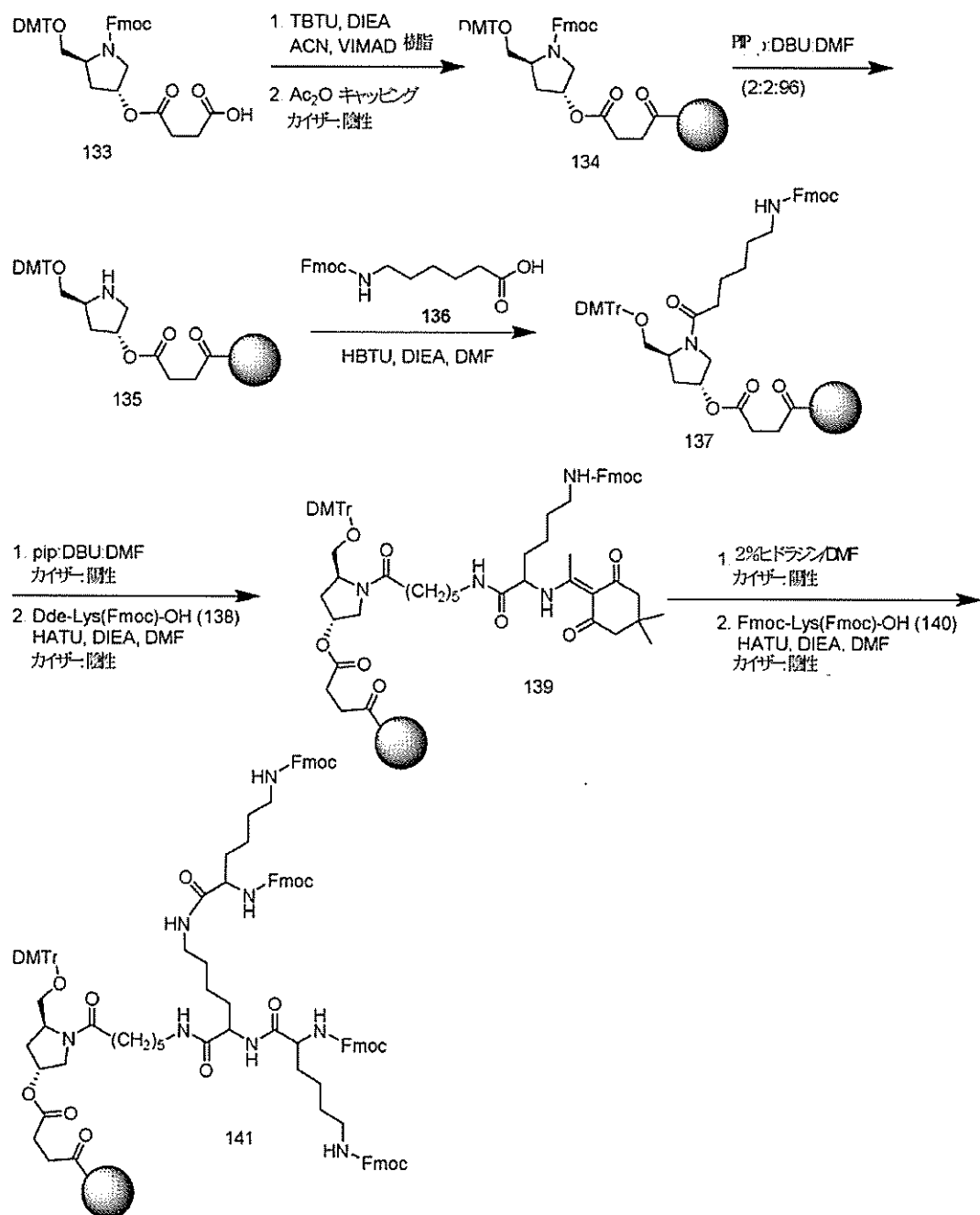
実施例 5 0 : GalNAc₄-1 1 を含むオリゴヌクレオチド 1 4 4 の調製

【0 8 9 4】

40

50

【化194】



【0895】

10

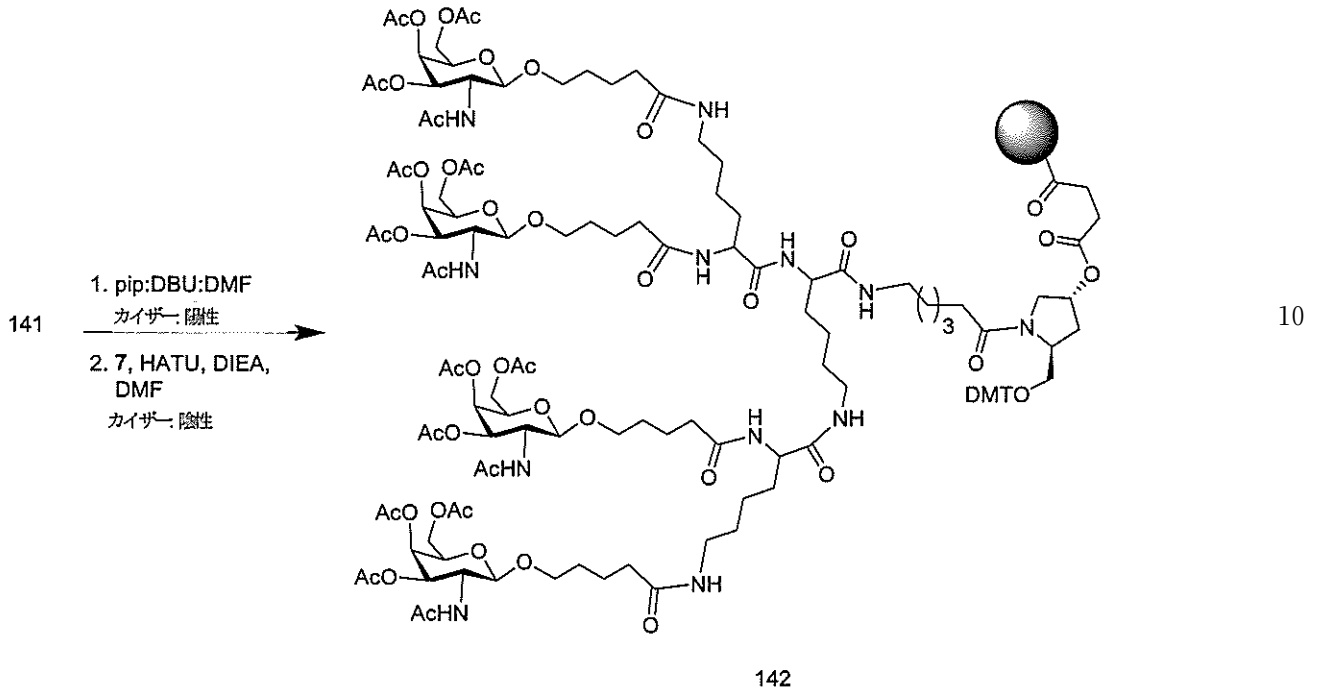
20

30

40

50

【化 1 9 5】



化合物 134 の合成。Merri field フラスコに、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、及びアセトニトリルで洗浄したアミノメチル VIMAD 樹脂 (2.5 g、450 $\mu\text{mol/g}$) を添加した。この樹脂は、アセトニトリル (4 mL) 中で膨潤した。20 (1.0 mmol、0.747 g)、TBTU (1.0 mmol、0.321 g)、アセトニトリル (5 mL)、及び DIEA (3.0 mmol、0.5 mL) を添加して、化合物 133 を 100 mL の丸底フラスコ内で事前に活性化した。この溶液を 5 分間攪拌させ、その後、振盪しながら Merri field フラスコに添加した。懸濁液を 3 時間振盪させた。反応混合物を排出し、樹脂をアセトニトリル、DMF、及び DCM で洗浄した。DCM 中 500 nm (消光係数 = 76000) で DMT カチオンの吸光度を測定することにより新たな樹脂負荷量を定量化し、238 $\mu\text{mol/g}$ であると決定した。無水酢酸溶液中で 10 分間 3 回懸濁することにより、この樹脂をキャップした。

【0896】

反復 Fmoc ベース固相ペプチド合成法を用いて、固体支持体に結合された化合物 141 を合成した。少量の固体支持体を回収し、アンモニア水 (28 ~ 30 重量%) 中に 6 時間懸濁した。切断された化合物を LC-MS によって分析した。観察された質量は、その構造と一致した。質量 (m/z) 1063.8 $[M+2H]^+$ 。

【0897】

固相ペプチド合成法を用いて、固体支持体に結合された化合物 142 を合成した。

【0898】

10

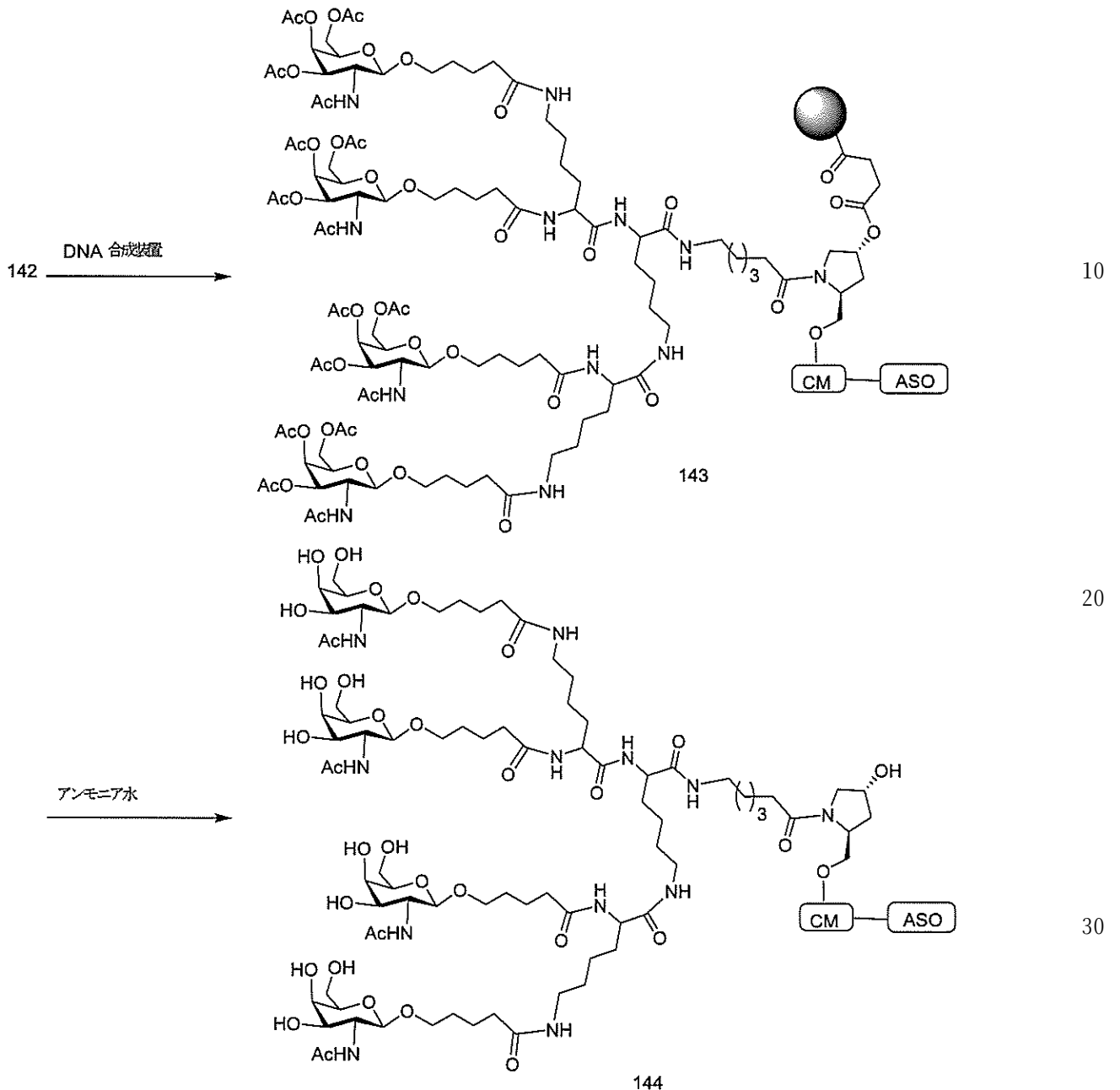
20

30

40

50

【化 1 9 6】



【 0 8 9 9 】

DNA 合成装置において標準の固相合成を用いて、固体支持体に結合された化合物 1 4 3 を合成した。

【 0 9 0 0 】

固体支持体に結合された化合物 1 4 3 をアンモニア水（28－30 重量％）中に懸濁し、55℃で16時間加熱した。溶液を冷却し、固体支持体を濾過した。濾液を濃縮し、残渣を水中に溶解し、強アニオン交換カラム上でHPLCによって精製した。全長化合物 1 4 4 を含有する画分を一つにプールし、脱塩した。結果として生じたGalNAc₄-1 1 共役オリゴマー化合物をLC-MSによって分析し、観察された質量は、その構造と一致した。

【 0 9 0 1 】

共役基GalNAc₄-1 1（GalNAc₄-1 1 a）のGalNAc₄クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P（=O）（OH）-Ad-P（=O）（

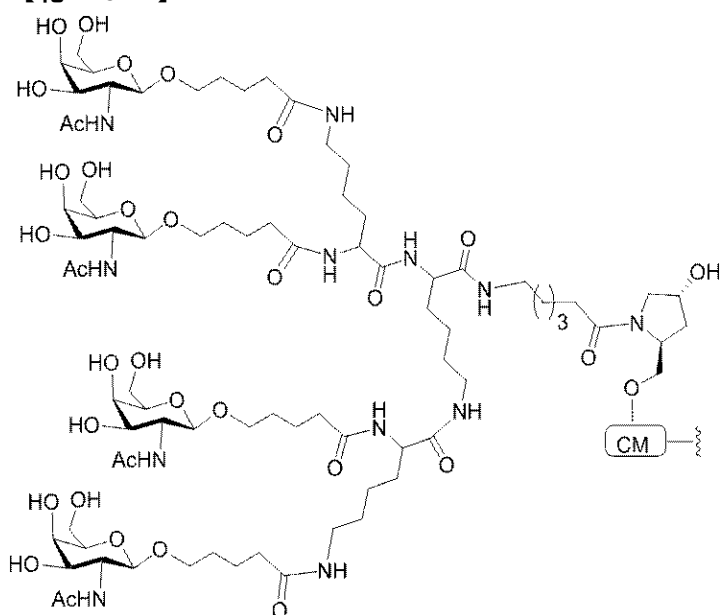
OH) -である。

【0902】

GalNAc4-11 (GalNAc4-11a-CM) の構造は、以下に示される：

【0903】

【化197】



10

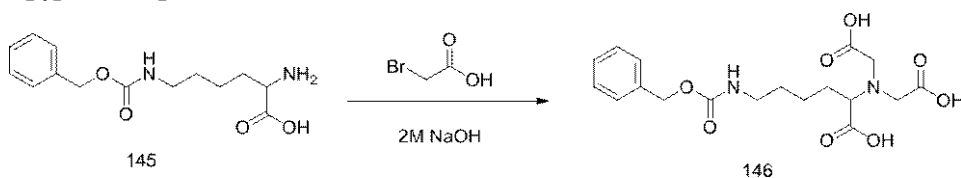
20

【0904】

実施例51：GalNAc3-6を含むオリゴヌクレオチド155の調製

【0905】

【化198】



30

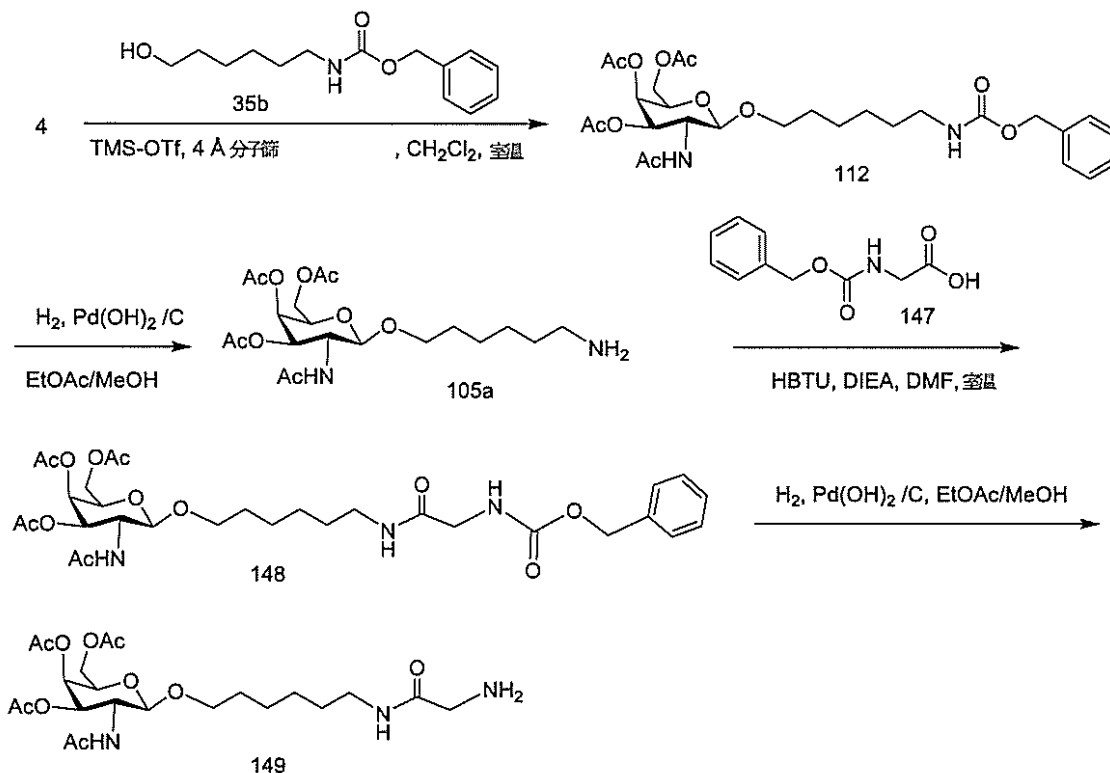
文献 (Analytical Biochemistry 1995, 229, 54-60) に記載されるように、化合物146を合成した。

【0906】

40

50

【化 1 9 9】



10

20

【0 9 0 7】

化合物 4 (15 g、45.55 mmol) 及び化合物 35b (14.3 g、57 mmol) を CH_2Cl_2 (200 mL) 中に溶解した。活性化モレキュラーシーブ (4 Å、2 g、粉末) を添加し、反応物を窒素雰囲気下で 30 分間撹拌させた。TMS-OTf を添加し (4.1 mL、22.77 mmol)、反応物を室温で一晩撹拌させた。完了した時点で、飽和 NaHCO_3 水溶液 (500 mL) 及び粉碎した氷 (約 150 g) を注いで反応物を反応停止処理した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、 MgSO_4 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮してオレンジ色の油状物を得た。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、 CH_2Cl_2 中の 2~10% MeOH で溶出して、化合物 112 (16.53 g、63%) を得た。LCMS 及び ^1H NMR は、予想した化合物と一致した。

30

【0 9 0 8】

化合物 112 (4.27 g、7.35 mmol) を 1:1 の MeOH/EtOAc (40 mL) 中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を 15 分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒 (炭素上の水酸化パラジウム、400 mg) を添加し、この溶液を通して水素ガスを 30 分間バブリングした。完了した時点で (TLC (CH_2Cl_2 中の 10% MeOH) 及び LCMS)、セライトパッドを通して触媒を濾去した。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物 105a (3.28 g) を得た。LCMS 及び ^1H NMR は、所望の生成物と一致した。

40

【0 9 0 9】

化合物 147 (2.31 g、11 mmol) を無水 DMF (100 mL) 中に溶解した。N, N-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA、3.9 mL、22 mmol)、続いて、HBTU (4 g、10.5 mmol) を添加した。反応混合物を窒素下で約 15 分間撹拌させた。これに、乾燥 DMF 中の化合物 105a (3.3 g、7.4 mmol) の溶液を添加し、窒素雰囲気下で 2 時間撹拌した。反応物を EtOAc で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液及びブラインで洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (MgSO_4)、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。粗物質をカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 中の 2~5% MeOH) によって精製して、化合物 148 (3.44 g、73

50

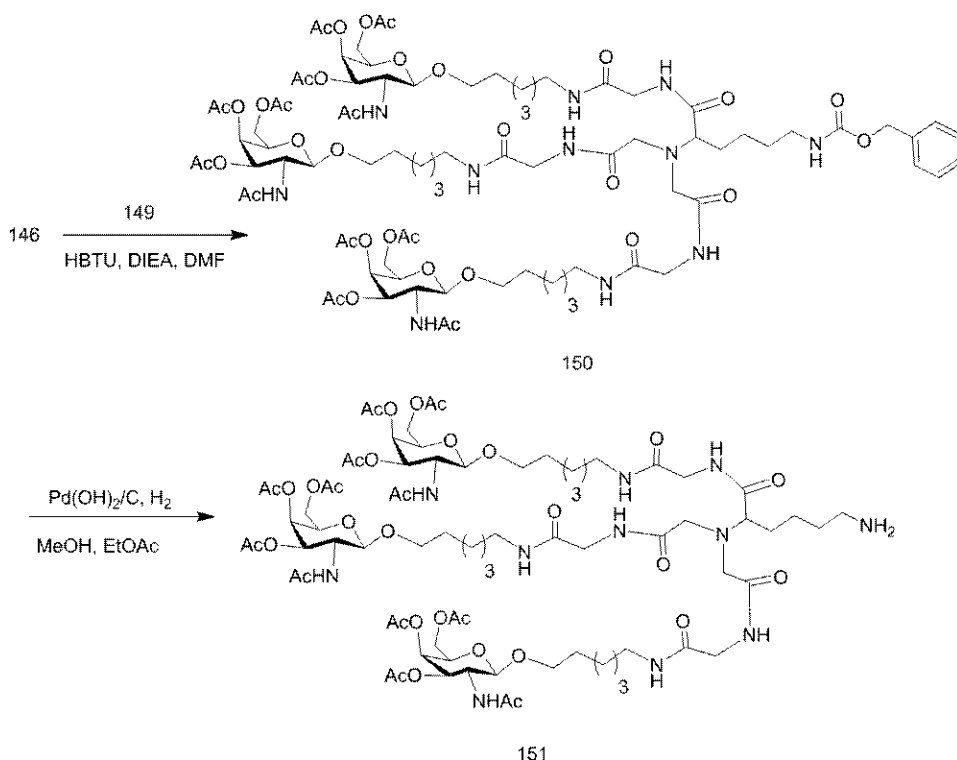
%)を得た。LCMS及び¹H NMRは、予想した生成物と一致した。

【0910】

化合物148 (3.3 g、5.2 mmol)を1:1のMeOH/EtOAc (75 mL)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒 (炭素上の水酸化パラジウム)を添加した (350 mg)。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で (TLC (DCM中の10% MeOH) 及びLCMS)、セライトパッドを通して触媒を濾去した。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物149 (2.6 g)を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。残渣を乾燥DMF (10 mL)中に溶解し、次のステップで即座に使用した。

【0911】

【化200】



【0912】

化合物146 (0.68 g、1.73 mmol)を乾燥DMF (20 mL)中に溶解した。これに、DIEA (450 μL、2.6 mmol、1.5当量)及びHBTU (1.96 g、0.52 mmol)を添加した。反応混合物を室温で15分間、窒素下で撹拌させた。無水DMF (10 mL)中の化合物149 (2.6 g)の溶液を添加した。DIEAを添加することにより (必要に応じて)、反応物のpHをpH=9~10に調整した。反応物を室温で2時間、窒素下で撹拌させた。完了した時点で、反応物をEtOAc (100 mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄し、続いて、ブラインで洗浄した。有機相を分離し、MgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、CH₂Cl₂中の2~10% MeOHで溶出して、化合物150 (0.62 g、20%)を得た。LCMS及び¹H NMRは、所望の生成物と一致した。

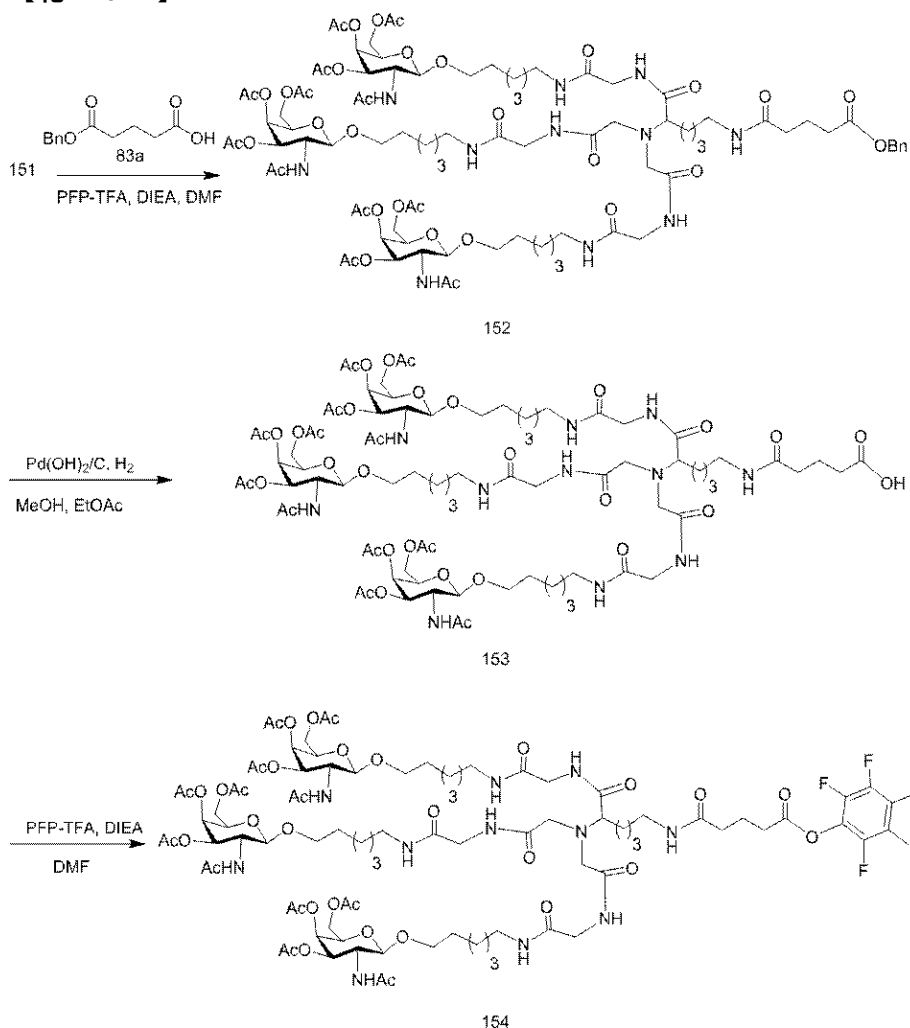
【0913】

化合物150 (0.62 g)を1:1のMeOH/EtOAc (5 L)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒 (炭素上の水酸化パラジウム)を添加した (60 mg)。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で (TLC (DCM中の10% MeOH) 及びLCMS)、触媒を濾去した (シリンジチップTeflonフィルター、0.45 μ

m)。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物151 (0.57 g)を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。この生成物を4 mLの乾燥DMF中に溶解し、次のステップで即座に使用した。

【0914】

【化201】



10

20

30

【0915】

化合物83a (0.11 g、0.33 mmol)を無水DMF (5 mL)中に溶解し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (75 μL 、1 mmol)及びPFP-TFA (90 μL 、0.76 mmol)を添加した。接触時に反応混合物は赤紫色になり、その後30分間かけて徐々にオレンジ色になった。TLC及びLCMSによって反応の進行を監視した。完了した時点で (PFPエステルの形成)、化合物151 (0.57 g、0.33 mmol)のDMF溶液を添加した。N, N-ジイソプロピルエチルアミンを添加することにより (必要に応じて)、反応物のpHをpH=9~10に調整した。反応混合物を窒素下で約30分間攪拌した。完了した時点で、溶媒の大部分を減圧下で除去した。残渣を CH_2Cl_2 で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液で洗浄し、続いて、ブラインで洗浄した。有機相を分離し、 MgSO_4 上で乾燥させ、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 中の2~10% MeOH)によって精製して、化合物152 (0.35 g、55%)を得た。LCMS及び ^1H NMRは、所望の生成物と一致した。

【0916】

化合物152 (0.35 g、0.182 mmol)を1:1のMeOH/EtOAc (10 mL)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒 (炭素上の水酸化パラジウム)を添加した (35 mg

40

50

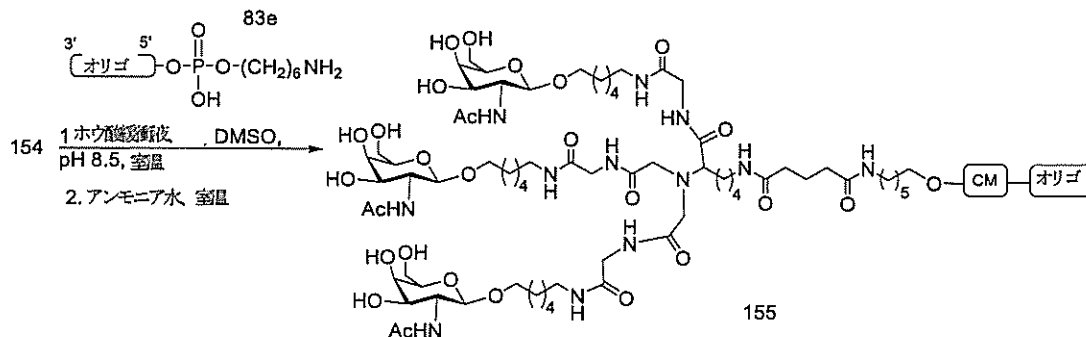
）。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で（TLC（DCM中の10% MeOH）及びLCMS）、触媒を濾去した（シリンジチップTeflonフィルター、0.45 μm）。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物153（0.33 g、定量的）を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。

【0917】

化合物153（0.33 g、0.18 mmol）を窒素下で攪拌しながら無水DMF（5 mL）中に溶解した。これに、N，N-ジイソプロピルエチルアミン（65 μL、0.37 mmol）及びPFPA-TFA（35 μL、0.28 mmol）を添加した。反応混合物を窒素下で約30分間攪拌した。接触時に反応混合物は赤紫色になり、徐々にオレンジ色になった。さらにN，N-ジイソプロピルエチルアミンを添加することにより、反応混合物のpHをpH=9~10で維持した。TLC及びLCMSによって反応の進行を監視した。完了した時点で、溶媒の大部分を減圧下で除去した。残渣をCH₂Cl₂（50 mL）で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄し、その後、ブラインで洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーによって精製し、CH₂Cl₂中の2~10% MeOHで溶出して、化合物154（0.29 g、79%）を得た。LCMS及び¹H NMRは、所望の生成物と一致した。

【0918】

【化202】



【0919】

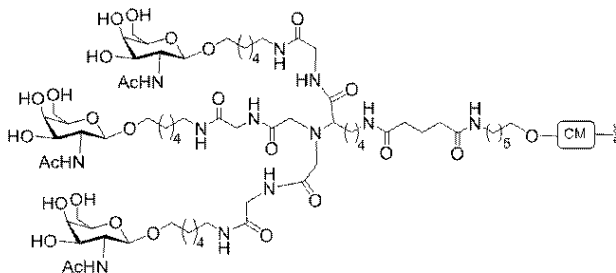
実施例46に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-6共役基を含むオリゴマー化合物155を調製した。共役基GalNAc₃-6（GalNAc₃-6a）のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

【0920】

GalNAc₃-6（GalNAc₃-6a-CM-）の構造は、以下に示される：

【0921】

【化203】

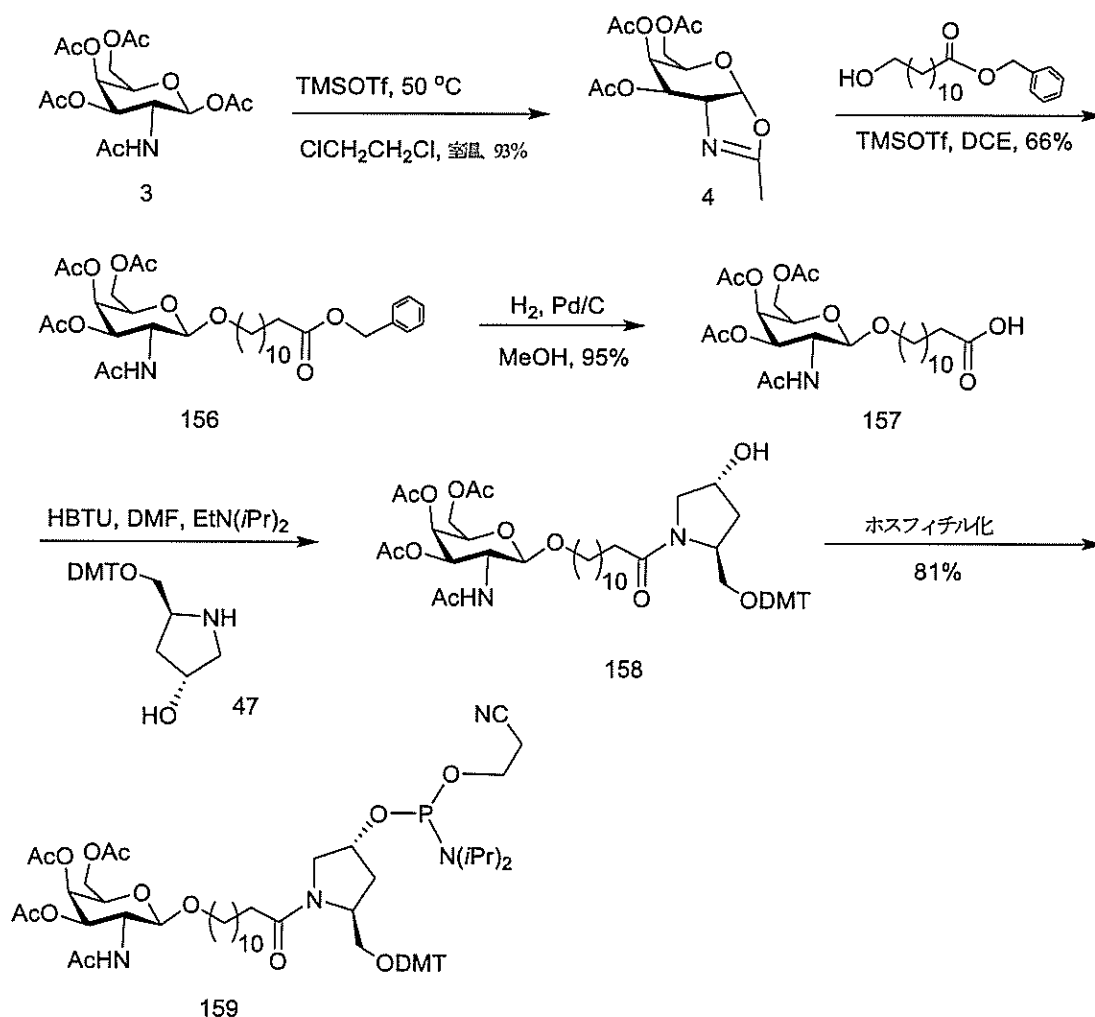


【0922】

実施例52：GalNAc₃-9を含むオリゴヌクレオチド160の調製

【 0 9 2 3 】

【 化 2 0 4 】



文献 (J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808) に記載される手順に従って化合物 156 を合成した。

【 0 9 2 4 】

化合物 156 (18.60 g、29.28 mmol) をメタノール (200 mL) 中に溶解した。パラジウム炭素 (6.15 g、10 重量%、負荷量 (乾燥ベース)、マトリックス炭素粉末、湿式) を添加した。反応混合物を室温で 18 時間、水素下で攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、このセライトパッドをメタノールで完全に洗浄した。合わせた濾液を洗浄し、濃縮乾固させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 5~10% メタノールで溶出して、化合物 157 (14.26 g、89%) を得た。質量 (m/z) 544.1 [M-H]⁻。

【 0 9 2 5 】

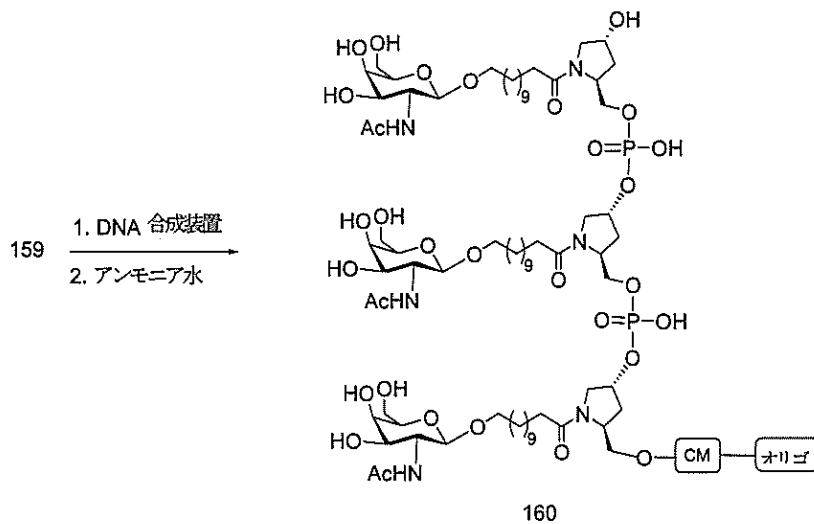
化合物 157 (5 g、9.17 mmol) を無水 DMF (30 mL) 中に溶解した。HBTU (3.65 g、9.61 mmol) 及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (13.73 mL、78.81 mmol) を添加し、反応混合物を室温で 5 分間攪拌した。これに、化合物 47 (2.96 g、7.04 mmol) の溶液を添加した。反応物を室温で 8 時間攪拌した。反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液に注いだ。この混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、蒸発させた。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の 50% 酢酸エチルで溶出して、化合物 158 (8.25 g、73.3%) を得た。この構造を、MS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。

【0926】

化合物158 (7.2 g、7.61 mmol) を減圧下で P_2O_5 上で乾燥させた。乾燥させた化合物を無水DMF (50 mL) 中に溶解した。これに、1H-テトラゾール (0.43 g、6.09 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.3 mL、3.81 mmol) 及び2-シアノエチル-N, N, N', N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (3.65 mL、11.50 mmol) を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下で4時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (200 mL) で希釈した。反応混合物を飽和 $NaHCO_3$ 及びブラインで洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、蒸発させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の50~90%酢酸エチルで溶出して、化合物159 (7.82 g、80.5%) を得た。この構造を、LCMS及び ^{31}P NMR分析によって確認した。

【0927】

【化205】



【0928】

標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて、GalNAc₃-9共役基を含むオリゴマー化合物160を調製した。3単位の化合物159を固体支持体に、続いてヌクレオチドホスホラミダイトにカップリングした。保護されたオリゴマー化合物をアンモニア水で処理して、化合物160を得た。共役基GalNAc₃-9 (GalNAc₃-9a) のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-9 (GalNAc₃-9a-CM) の構造は、以下に示される：

【0929】

10

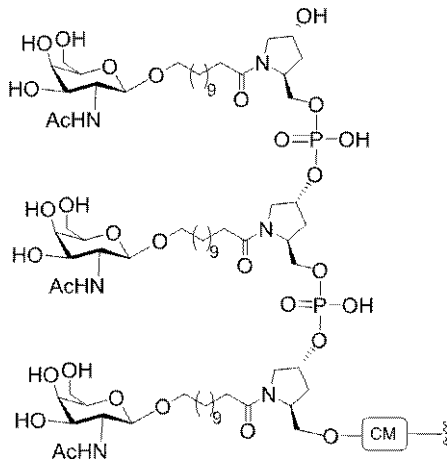
20

30

40

50

【化 2 0 6】



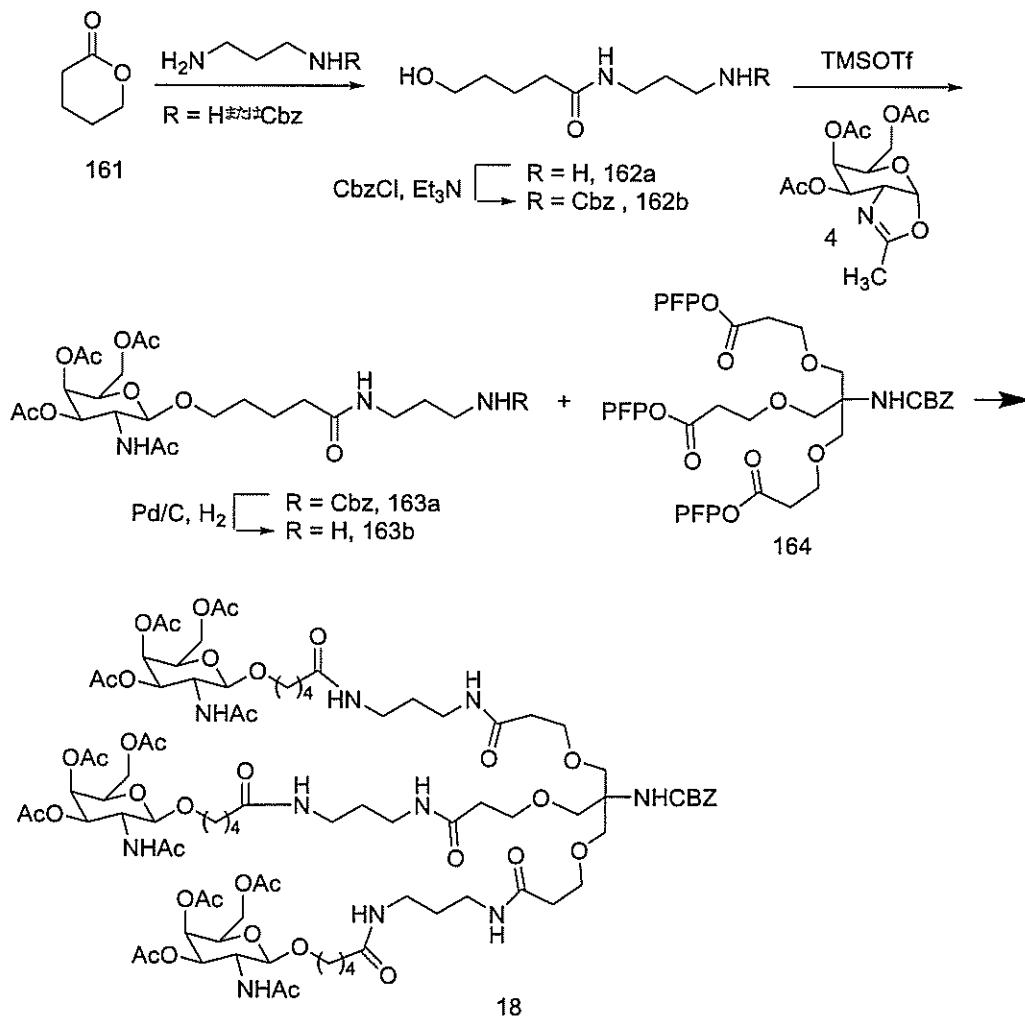
10

【 0 9 3 0】

実施例 53：化合物 18 (GalNAc3-1a 及び GalNAc3-3a) の調製のための代替手順

【 0 9 3 1】

【化 2 0 7】



20

30

40

ラクトン 161 をジアミノプロパン (3~5 当量) またはモノ Boc 保護ジアミノプロパン (1 当量) と反応させて、アルコール 162a または 162b を得た。非保護プロパンジアミンを上述の反応で用いた場合、過剰なジアミンを高真空下で蒸発させて除去し、

50

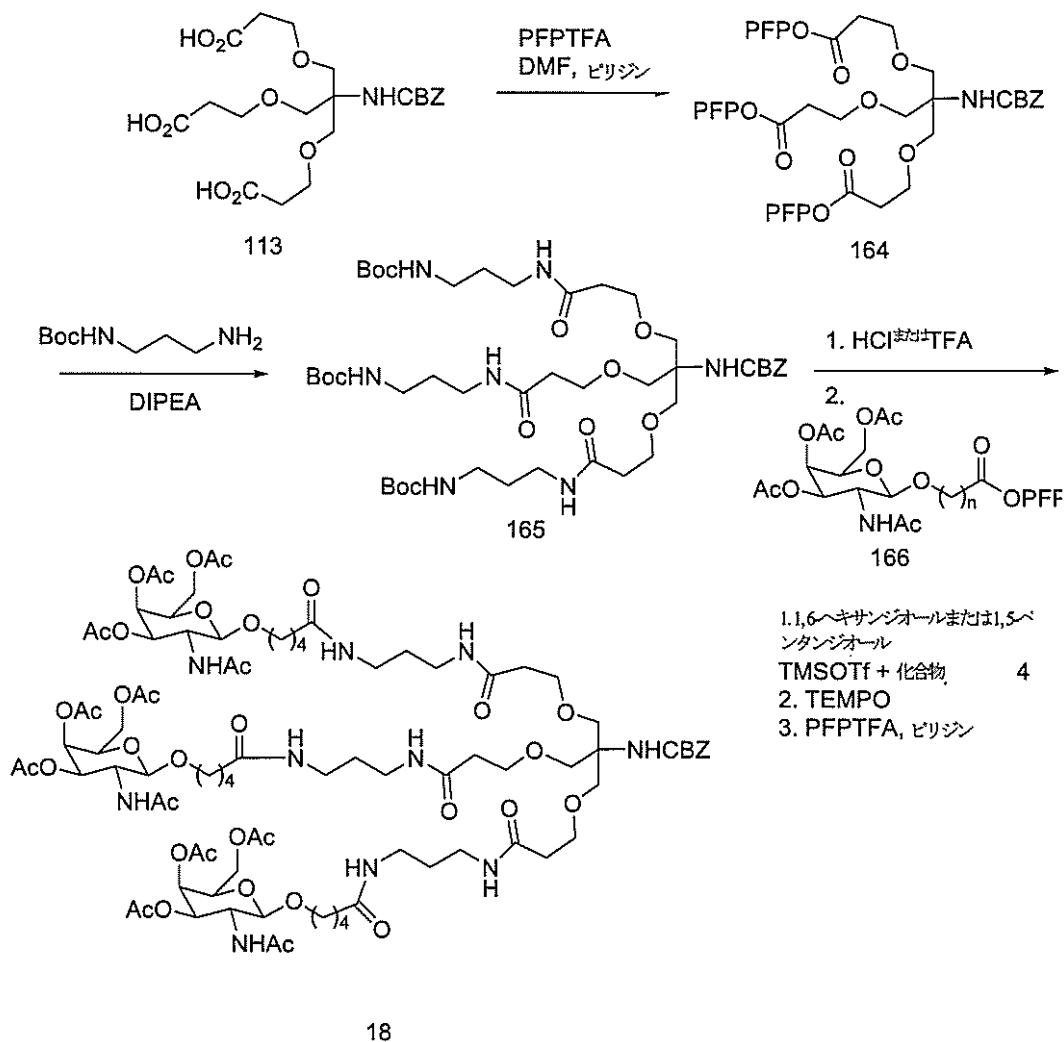
CbzClを用いて162a中の遊離アミノ基を保護して、カラムクロマトグラフィーによって精製した後に、白色の固体として162bを得た。アルコール162bをTMSOTfの存在下で化合物4とさらに反応させ163aを得て、触媒水素化を用いてCbz基を除去することにより、これを163bに変換した。ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル164を、三酸113(実施例48を参照のこと)をDMF(0.1~0.5M)中のPFPTFA(3.5当量)及びピリジン(3.5当量)と接触させることによって調製した。トリエステル164をアミン163b(3~4当量)及びDIPEA(3~4当量)と直接反応させて、化合物18を得た。上述の方法は、中間体精製を大幅に促進し、実施例4に記載される手順を用いて形成される副生成物の形成を最小限に抑える。

【0932】

実施例54：化合物18(GalNAc3-1a及びGalNAc3-3a)の調製のための代替手順

【0933】

【化208】



先の実施例53に概説される手順を用いて酸113からトリPFPエステル164を調製し、モノBoc保護ジアミンと反応させて、本質的に定量的な収率で165を得た。Boc基を塩酸またはトリフルオロ酢酸で除去して、トリアミンを得て、これをDIPEAなどの好適な塩基の存在下でPFP活性化酸166と反応させて、化合物18を得た。

【0934】

DMF中のPFPTFA(1~1.2当量)及びピリジン(1~1.2当量)で処理することにより、PFP保護Gal-NAc酸166を対応する酸から調製した。次いで、アセトニトリル及び水中のTEMPO(0.2当量)及びBAIBを用いて酸化すること

により、前駆酸を対応するアルコールから調製した。先の実施例 47 に記載される条件を用いて 1, 6-ヘキサンジオール（または 1, 5-ペンタンジオールもしくは他の n 値の他のジオール）（2～4 当量）及び TMSOTf と反応させることにより、前駆アルコールを糖中間体 4 から調製した。

【0935】

実施例 55：生体内における SRB-1 を標的とする 3'-共役基または 5'-共役基のいずれかを含むオリゴヌクレオチド（GalNAc₃-1、3、8、及び 9 の比較）の用量依存的試験

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 ISIS 353382 を標準物として含めた。さまざまな GalNAc₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結 2'-デオキシアデノシンヌクレオシド（切断可能部分）によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの 3' 末端または 5' 末端のいずれかで結合された。

【0936】

【表 26】

表 39

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	モチーフ	共役体	配列番号
ISIS 353382 (parent)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _e ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5 / 10 / 5	なし	2 2 5 6
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _e ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	5 / 10 / 5	GalNAc ₃ -1	2 2 5 7
ISIS 664078	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _e ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -9 _a	5 / 10 / 5	GalNAc ₃ -9	2 2 5 7
ISIS 661161	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _e _s T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _d _s T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5 / 10 / 5	GalNAc ₃ -3	2 2 5 8
ISIS 665001	GalNAc ₃ -8 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _e _s T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _d _s T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5 / 10 / 5	GalNAc ₃ -8	2 2 5 8

大文字は、各ヌクレオチドの核酸塩基を示し、mC は、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE 修飾ヌクレオチドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオチドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオチド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0937】

GalNAc₃-1_a の構造は、先の実施例 9 に示される。GalNAc₃-9 の構造は、先の実施例 52 に示される。GalNAc₃-3 の構造は、先の実施例 39 に示され

る。GalNAc₃-8の構造は、先の実施例47に示される。

処理

【0938】

6週齢の雄Balb/cマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、ISIS 353382、655861、664078、661161、665001、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを標準プロトコルに従って決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

10

【0939】

表40に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。実際には、3'末端にホスホジエステル連結GalNAc₃-1及びGalNAc₃-9共役体(ISIS 655861及びISIS 664078)ならびに5'末端に連結されたGalNAc₃-3及びGalNAc₃-8共役体(ISIS 661161及びISIS 665001)を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 353382)と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、3'末端にGalNAc₃-9共役体を含むISIS 664078は、3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むISIS 655861と比較して、本質的に等効力であった。それぞれ、GalNAc₃-3またはGalNAc₃-9を含む5'共役アンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 661161及びISIS 665001は、3'共役アンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 655861及びISIS 664078)と比較して、力価を増加させた。

20

【0940】

30

40

50

【表 27】

表 40

SRB-1 を標的とする GalNAc₃-1、3、8 または 9 を含有する ASO

ISIS 番号	用量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (% 生理食 塩水)	共役体
生理食塩水	該当なし	100	
353382	3	88	なし
	10	68	
	30	36	
655861	0.5	98	GalNAc ₃ -1 (3')
	1.5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0.5	88	GalNAc ₃ -9 (3')
	1.5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0.5	92	GalNAc ₃ -3 (5')
	1.5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0.5	100	GalNAc ₃ -8 (5')
	1.5	73	
	5	29	
	15	13	

【0941】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表に示される。

【0942】

10

20

30

40

50

【表 28】

表 4 1

ISIS 番号	用量 mg / kg	ALT	AST	総ビリルビン	BUN	共役体
生理食塩水		24	59	0.1	37.5 2	
353382	3	21	66	0.2	34.6 5	なし
	10	22	54	0.2	34.2	
	30	22	49	0.2	33.7 2	
655861	0.5	25	62	0.2	30.6 5	GalNac ₃ -1 (3')
	1.5	23	48	0.2	30.9 7	
	5	28	49	0.1	32.9 2	
	15	40	97	0.1	31.6 2	
664078	0.5	40	74	0.1	35.3	GalNac ₃ -9 (3')
	1.5	47	104	0.1	32.7 5	
	5	20	43	0.1	30.6 2	
	15	38	92	0.1	26.2	
661161	0.5	101	162	0.1	34.1 7	GalNac ₃ -3 (5')
	1.5 g	42	100	0.1	33.3 7	
	5 g	23	99	0.1	34.9 7	
	15	53	83	0.1	34.8	
665001	0.5	28	54	0.1	31.3 2	GalNac ₃ -8 (5')
	1.5	42	75	0.1	32.3 2	
	5	24	42	0.1	31.8 5	
	15	32	67	0.1	31.	

【0943】

実施例 56：生体内における SRB-1 を標的とする 3'-共役基または 5'-共役基のいずれかを含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験 (GalNac₃-1、2、3、5、6、7、及び 10 の比較)

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 ISIS 353382 を標準物として含めた。3' 末端に GalNac₃ 共役基を結合させた ISIS 655861 を除いて、さまざまな GalNac₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結 2'-デオキシアデノシンヌクレオシド (切断可能部分) によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5'

末端に取り付けられた。

【0944】

【表29】

表42

SRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列番号 (5' ~ 3')	モチーフ	共役体	配列番号
I S I S 3 5 3 3 8 2 (親)	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_d$ $s T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	共役体 なし	2 2 5 6
I S I S 6 5 5 8 6 1	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_d$ $s T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_d$ o'-GalNAc ₃ -1 _a	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-1	2 2 5 7
I S I S 6 6 4 5 0 7	GalNAc ₃ -2 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-2	2 2 5 8
I S I S 6 6 1 1 6 1	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_d$ $s T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-3	2 2 5 8
I S I S 6 6 6 2 2 4	GalNAc ₃ -5 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-5	2 2 5 8
I S I S 6 6 6 9 6 1	GalNAc ₃ -6 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-6	2 2 5 8
I S I S 6 6 6 9 8 1	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-7	2 2 5 8
I S I S 6 6 6 8 8 1	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m $^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5 / 1 0 / 5	Gal NAc 3-1 0	2 2 5 8

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0945】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAc₃-2_aの構造は、先の実施例37に示される。GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示

される。GalNAc3-5aの構造は、先の実施例49に示される。GalNAc3-6aの構造は、先の実施例51に示される。GalNAc3-7aの構造は、先の実施例48に示される。GalNAc3-10aの構造は、先の実施例46に示される。

処理

【0946】

6週齢の雄Balb/cマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 353382、655861、664507、661161、666224、666961、666981、666881、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水（対照）に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

10

【0947】

表43に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。実際には、共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 353382）と比較して、力価の大幅な改善を示した。5'共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、3'共役アンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、力価のわずかな増加を示した。

20

【0948】

30

40

50

【表 30】

表 4 3

ISIS 番号	用量 (mg / kg)	SRB-1 mRNA (% 生理食 塩水)	共役体
生理食塩水	該当なし	100.0	
353382	3	96.0	なし
	10	73.1	
	30	36.1	
655861	0.5	99.4	GalNAc ₃ -1 (3')
	1.5	81.2	
	5	33.9	
	15	15.2	
664507	0.5	102.0	GalNAc ₃ -2 (5')
	1.5	73.2	
	5	31.3	
	15	10.8	
661161	0.5	90.7	GalNAc ₃ -3 (5')
	1.5	67.6	
	5	24.3	
	15	11.5	
666224	0.5	96.1	GalNAc ₃ -5 (5')
	1.5	61.6	
	5	25.6	
	15	11.7	
666961	0.5	85.5	GalNAc ₃ -6 (5')
	1.5	56.3	
	5	34.2	
	15	13.1	
666981	0.5	84.7	GalNAc ₃ -7 (5')
	1.5	59.9	
	5	24.9	
	15	8.5	
666881	0.5	100.0	GalNAc ₃ -1 0 (5')
	1.5	65.8	
	5	26.0	
	15	13.0	

【0949】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表 4 4 に示される。

【0950】

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 4 4

ISIS 番号	用量 mg/kg	ALT	AST	総ビリ ルビン	BUN	共役体
生理食塩水		26	57	0.2	27	
353382	3	25	92	0.2	27	なし
	10	23	40	0.2	25	
	30	29	54	0.1	28	
655861	0.5	25	71	0.2	34	GalNac ₃ -1 (3')
	1.5	28	60	0.2	26	
	5	26	63	0.2	28	
	15	25	61	0.2	28	
664507	0.5	25	62	0.2	25	GalNac ₃ -2 (5')
	1.5	24	49	0.2	26	
	5	21	50	0.2	26	

661161	15	59	84	0.1	22	GalNac ₃ -3 (5')
	0.5	20	42	0.2	29	
	1.5 g	37	74	0.2	25	
	5 g	28	61	0.2	29	
	15	21	41	0.2	25	
666224	0.5	34	48	0.2	21	GalNac ₃ -5 (5')
	1.5	23	46	0.2	26	
	5	24	47	0.2	23	
	15	32	49	0.1	26	
666961	0.5	17	63	0.2	26	GalNac ₃ -6 (5')
	1.5	23	68	0.2	26	
	5	25	66	0.2	26	
	15	29	107	0.2	28	
666981	0.5	24	48	0.2	26	GalNac ₃ -7 (5')
	1.5	30	55	0.2	24	
	5	46	74	0.1	24	
	15	29	58	0.1	26	
666881	0.5	20	65	0.2	27	GalNac ₃ -10 (5')
	1.5	23	59	0.2	24	
	5	45	70	0.2	26	
	15	21	57	0.2	24	

【0951】

実施例 57：生体内における ApoC III を標的とする 3' - 共役基を含むオリゴヌクレオチドの作用持続時間試験

マウスに以下に示される用量を 1 回注入し、ApoC-III 及び血漿トリグリセリド（血漿 TG）レベルを 42 日間にわたって監視した。各群におけるヒト APOC-III を発現する 3 匹のトランスジェニックマウスを用いて、この試験を実行した。

【0952】

10

20

30

50

【表 3 2】

表 4 5

ApoC III を標的とする修飾ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	結合	配列番号
ISI S 3 0 4 8 0 1	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}T_{ds}$ $^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{e}$ $sA_{es}T_e$	PS	2 2 4 8
ISI S 6 4 7 5 3 5	$A_{es}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{es}T_{es}T_{es}A_{es}T_{eo}A_{do}'-GalNAc_3-1_a$	PS	2 2 4 9
ISI S 6 4 7 5 3 6	$A_{es}G_{eo}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{ds}T_{ds}T_{ds}$ $G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}$ $A_{ds}G_{ds}^mC_{ds}T_{eo}T_{eo}T_{es}A_{es}T_{eo}$ $A_{do}'-GalNAc_3-1_a$	PO / PS	2 2 4 9

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0 9 5 3】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例 9 に示される。

【0 9 5 4】

【表 3 3】

表 4 6

ApoC III mRNA (1日目の生理食塩水に対する%) 及び血漿TGレベル (1日目の生理食塩水に対する%)

ASO	用量	標的	3日目	7日目	14日目	35日目	42日目
生理食塩水	0 mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30 mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10 mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10 mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
Saline	0 mg/kg	Plasma TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30 mg/kg	Plasma TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10 mg/kg	Plasma TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10 mg/kg	Plasma TG	21	19	15	32	35

【0955】

上の表に見られるように、作用持続時間は、非共役オリゴヌクレオチドと比較して、3'-共役基の付加によって増加した。共役完全PSオリゴヌクレオチド647535と比較して、共役混成PO/PSオリゴヌクレオチド647536の作用持続時間がさらに増加した。

【0956】

実施例58：生体内におけるSRB-1を標的とする3'-共役基を含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験 (GalNAc3-1及びGalNAc4-11の比較)

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。非共役ISIS 440762を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオチド (切断可能部分) によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端に取り付けられた。

【0957】

GalNAc3-1aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAc3-11aの構造は、先の実施例50に示される。

【0958】

処理

6週齢の雄Balb/cマウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、ISIS 440762、651900、663748、または生

理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBO GREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水（対照）に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【0959】

表47に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。3'末端にホスホジエステル連結GalNAc₃-1及びGalNAc₄-11共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 651900及びISIS 663748）は、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 440762）と比較して、力価の大幅な増加を示した。2つの共役オリゴヌクレオチド、すなわちGalNAc₃-1とGalNAc₄-11は、等効力であった。

【0960】

【表34】

表47

SRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	用量mg /kg	% 生理食塩 水 対照	配列番号
Saline			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _d sA _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	0.6 2 6	73.45 59.66 23.50	2250
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _d sA _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '- GalNAc ₃ -1 _a	0.2 0.6 2 6	62.75 29.14 8.61 5.62	2251
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _d sA _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '- GalNAc ₄ -11 _a	0.2 0.6 2 6	63.99 33.53 7.58 5.52	2251

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-C_{3'}二環式ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0961】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表48に示される。

【0962】

【表35】

表48

ISIS番号	用量 mg / kg	ALT	AST	総ビリル ビン	BUN	共役体
生理食塩水		30	76	0.2	40	
440762	0.60	32	70	0.1	35	なし
	2	26	57	0.1	35	
	6	31	48	0.1	39	
651900	0.2	32	115	0.2	39	GalNac ₃ -1 (3 ')
	0.6	33	61	0.1	35	
	2	30	50	0.1	37	
	6	34	52	0.1	36	
663748	0.2	28	56	0.2	36	GalNac ₄ -11 (3 ')
	0.6	34	60	0.1	35	
	2	44	62	0.1	36	
	6	38	71	0.1	33	

10

20

【0963】

実施例59：生体内におけるFXIを標的とするGalNAc₃-1共役ASOの影響

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、複数回投与試験においてマウスにおけるFXIのアンチセンス阻害について試験した。ISIS 404071を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオシドの切断可能部分によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端に取り付けられた。

【0964】

【表36】

表49

FXIを標的とする修飾ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	結合	配列番号
ISIS 404071	T _{cs} G _{cs} G _{cs} T _{cs} A _{cs} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _e sG _{cs} A _{cs} G _{cs} G _e	PS	2259
ISIS 56172	T _{cs} G _{cs} G _{cs} T _{cs} A _{cs} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _e sG _{cs} A _{cs} G _{cs} G _{eo} A _{do} ·-GalNAc ₃ -1 _a	PS	2260
ISIS 56173	T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _e oG _{eo} A _{cs} G _{cs} G _{eo} A _{do} ·-GalNAc ₃ -1 _a	PO / PS	2260

30

40

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオ

50

キシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、 $-O-P(=O)(OH)-$ を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0965】

Ga l N A c ₃ - 1_aの構造は、先の実施例9に示される。

【0966】

処理

6週齢の雄Balb/cマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 404071、656172、656173、またはPBS処理対照を、以下に示される投与量で週2回3週間、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるFXI mRNAレベルを決定した。ELISAを用いて血漿FXIタンパク質レベルも測定した。PBS処理対照に対して正規化する前に（RIBOGREEN（登録商標）を用いて）FXI mRNAレベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、各処理群のFXI mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。データをPBS処理対照に対して正規化し、「%PBS」で表示する。当該方法と同様の方法を用いてED50を測定し、以下に提示する。

【0967】

【表37】

表50

第XI因子mRNA（%生理食塩水）

ASO	用量 (mg / kg)	%対照	共役体	結合
生理食塩水		100	なし	
ISIS 404071	3	92	なし	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0.7	74	Ga l N A c ₃ - 1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0.7	49	Ga l N A c ₃ - 1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

【0968】

表50に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でFXI mRNAレベルを低下させた。3'-Ga l N A c ₃ - 1共役基を含むオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 404071）と比較して、力価の大幅な増加を示した。これら2つの共役オリゴヌクレオチドの間では、PS連結部のうちのいくつかをPO（ISIS 656173）と置き換えることによって、力価がさらに増加した。

【0969】

表50aに例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でFXIタンパク質レベルを低下させた。3'-Ga l N A c ₃ - 1共役基を含むオ

リゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 404071）と比較して、力価の大幅な増加を示した。これら2つの共役オリゴヌクレオチドの間では、PS連結部のうちのいくつかをPO（ISIS 656173）と置き換えることによって、力価がさらに増加した。

【0970】

【表38】

表50a

第XI因子タンパク質（%生理食塩水）

ASO	用量 (mg / kg)	タンパク質 (%対照)	共役体	結合
生理食塩水		100	なし	
ISIS 404071	3	127	なし	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0.7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0.7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

【0971】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン、総アルブミン、CRE、及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表に示される。

【0972】

【表39】

表51

ISIS番号	投与量 mg/kg	ALT	AST	総アルブミン	総ビリルビン	CRE	BUN	共役体
生理食塩水		71.8	84.0	3.1	0.2	0.2	22.9	
404071	3	152.8	176.0	3.1	0.3	0.2	23.0	なし
	10	73.3	121.5	3.0	0.2	0.2	21.4	
	30	82.5	92.3	3.0	0.2	0.2	23.0	
656172	0.7	62.5	111.5	3.1	0.2	0.2	23.8	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	33.0	51.8	2.9	0.2	0.2	22.0	
	6	65.0	71.5	3.2	0.2	0.2	23.9	
656173	0.7	54.8	90.5	3.0	0.2	0.2	24.9	GalNAc ₃ -1 (3')
	2	85.8	71.5	3.2	0.2	0.2	21.0	
	6	114.0	101.8	3.3	0.2	0.2	22.7	

【0973】

実施例60：生体外におけるSRB-1を標的とする共役ASOの影響

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、複数回投与試験において初代マウス肝細胞におけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。ISIS 353382を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオチドの切断可能部分によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端に取り付けられた。

【0974】

【表40】

表52

SRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列 (5' ~ 3')	モチーフ	共役体	配列番号
ISIS 353382	$G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	なし	2256
ISIS 655861	$G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3 - 1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	2257
ISIS 655862	$G_{cs}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{cs} T_{cs} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3 - 1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	2257
ISIS 661161	GalNAc₃-3_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -3	2258
ISIS 665001	GalNAc₃-8_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -8	2258
ISIS 664078	$G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{eo} A_{do} - GalNAc_3 - 9_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -9	2257
ISIS 666961	GalNAc₃-6_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -6	2258
ISIS 664507	GalNAc₃-2_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -2	2258
ISIS 666881	GalNAc₃-10_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -10	2258
ISIS 666224	GalNAc₃-5_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -5	2258
ISIS 666981	GalNAc₃-7_{a-o} $A_{do} G_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_{cs}^m C_{cs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{cs}^m C_{cs}^m C_{cs} T_{cs} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -7	2258

大文字は、各ヌクレオチドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオチドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオチドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオチド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0975】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示される。GalNAc₃-8_aの構造は、先の実施例47に示される。GalNAc₃-9_aの構造は、先の実施例52に示される。GalNAc₃-6_aの構造は、先の実施例51に示される。GalNAc₃-2_aの構造は、先の実施例37に示される。GalNAc₃-10_aの構造は、先の実施例46に示される。GalNAc₃-5_aの構造は、先の実施例49に示される。GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示される。

【0976】

処理

上に列記されるオリゴヌクレオチドを、25,000細胞/ウェルの密度でプレーティングし、かつ0.03、0.08、0.24、0.74、2.22、6.67、または2

0 nMの修飾オリゴヌクレオチドで処理した初代マウス肝細胞において生体外で試験した。約16時間の処理期間後、RNAを細胞から単離し、mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定し、RIBOGREEN（登録商標）によって測定された総RNA含有量に従ってSRB-1 mRNAレベルを調整した。

【0977】

標準的方法を用いてIC₅₀を計算し、結果を表53に提示する。結果は、オリゴヌクレオチドの細胞への進入を人工的に促進するために試薬も電気穿孔技法も用いない自由取り込み条件下で、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を含まない親オリゴヌクレオチド（ISIS 353382）よりも肝細胞において著しく強力であったことを示す。

【0978】

【表41】

表53

ASO	IC ₅₀ (nM)	ヌクレオシ ド間結合	共役体	配列番号
ISIS 3 53382	190 ^a	PS	なし	2256
ISIS 6 55861	11 ^a	PS	GalNAc ₃ -1	2257
ISIS 6 55862	3	PO/PS	GalNAc ₃ -1	2257
ISIS 6 61161	15 ^a	PS	GalNAc ₃ -3	2258
ISIS 6 65001	20	PS	GalNAc ₃ -8	2258
ISIS 6 64078	55	PS	GalNAc ₃ -9	2257
ISIS 6 66961	22 ^a	PS	GalNAc ₃ -6	2258
ISIS 6 64507	30	PS	GalNAc ₃ -2	2258
ISIS 6 66881	30	PS	GalNAc ₃ -1 0	2258
ISIS 6 66224	30 ^a	PS	GalNAc ₃ -5	2258
ISIS 6 66981	40	PS	GalNAc ₃ -7	2258

^a複数回の実行の平均。

【0979】

実施例61：GalNAc₃-12を含むオリゴマー化合物175の調製

【0980】

10

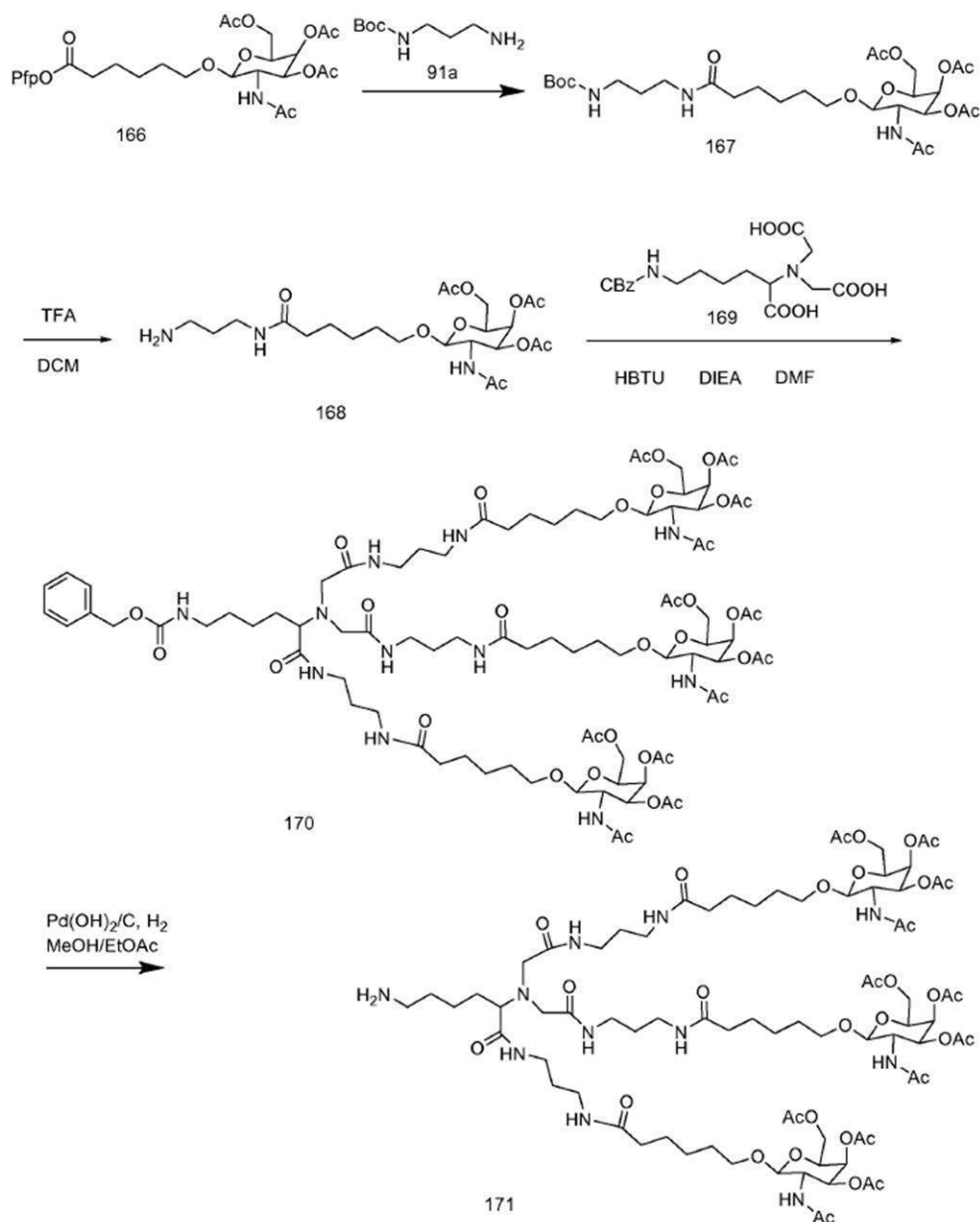
20

30

40

50

【化 2 0 9】



【 0 9 8 1】

10

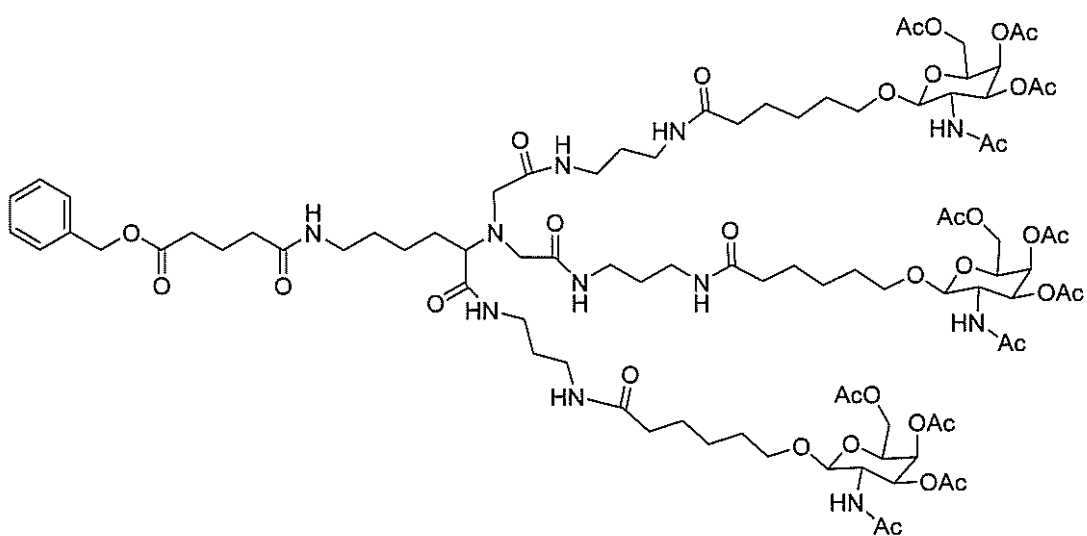
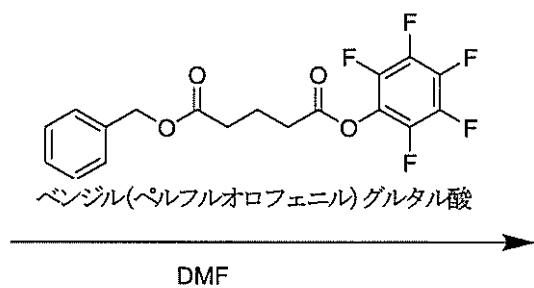
20

30

40

50

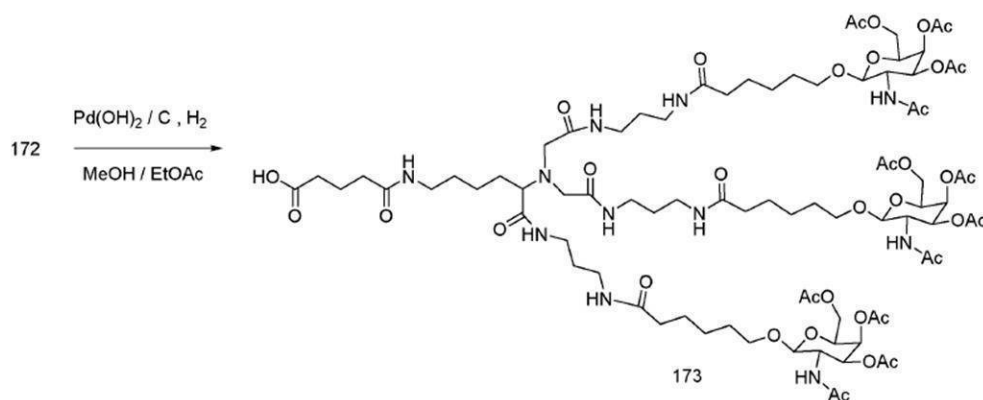
【化 2 1 0】



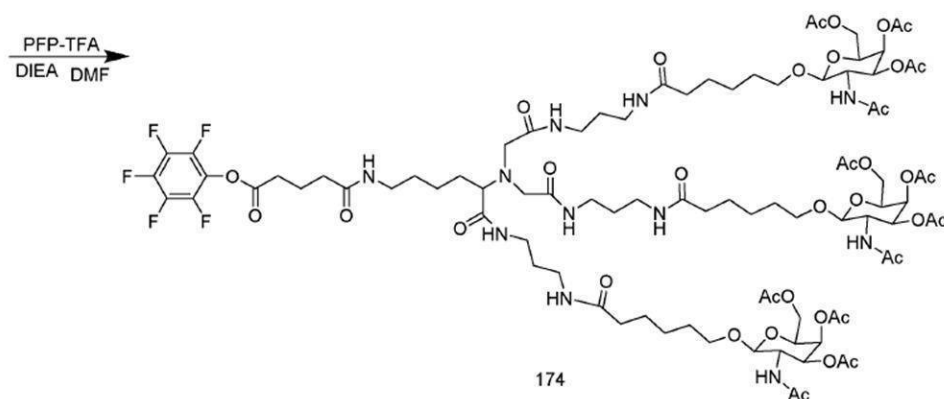
172

【 0 9 8 2】

【化 2 1 1】



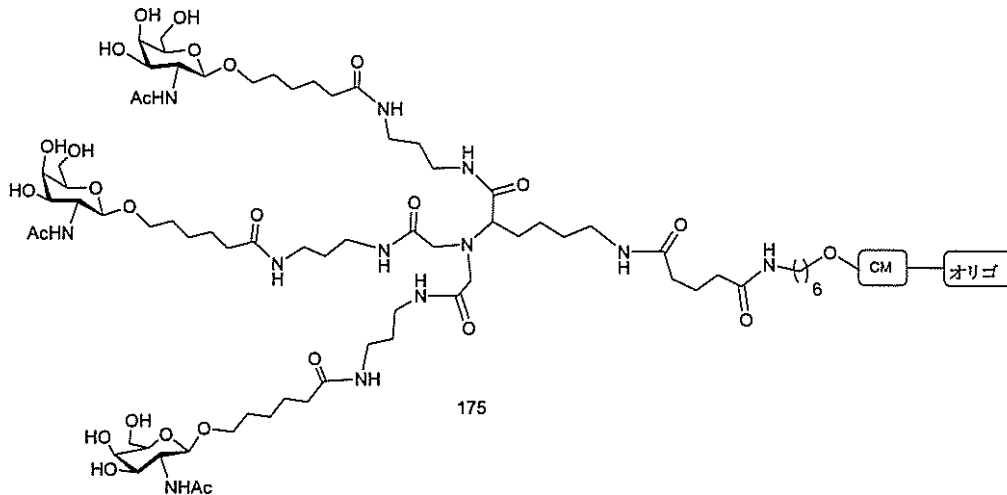
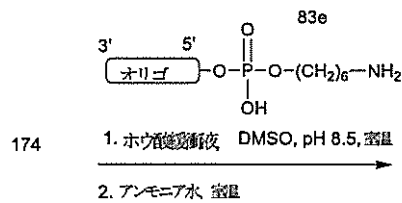
173



174

【 0 9 8 3 】

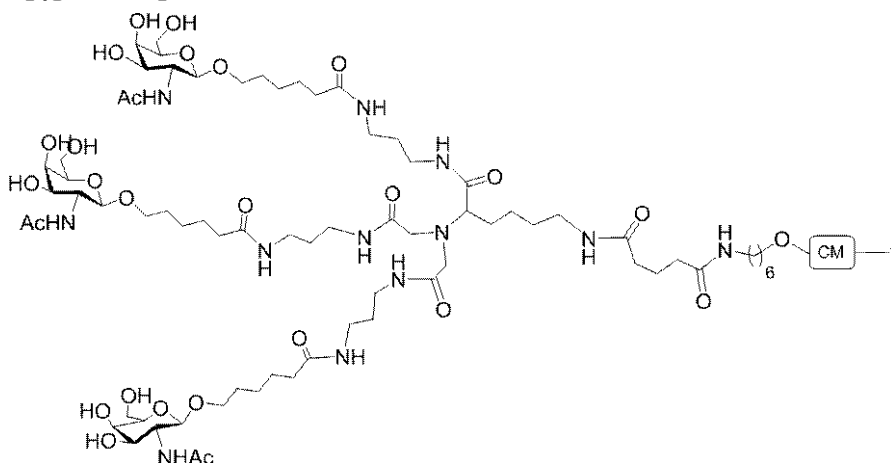
【 化 2 1 2 】



化合物 169 は、市販のものである。ベンジル（ペルフルオロフェニル）グルタレート
 を化合物 171 に添加することによって化合物 172 を調製した。PFP-TFA 及び D
 IEA を DMF 中の 5-（ベンジルオキシ）-5-オキソペンタン酸に添加することによ
 って、ベンジル（ペルフルオロフェニル）グルタレートを調製した。実施例 46 に例証さ
 れる一般的手順を用いて、GalNAc₃-12 共役基を含むオリゴマー化合物 175 を
 化合物 174 から調製した。共役基 GalNAc₃-12（GalNAc₃-12a）の
 GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基
 を提供することができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P（=O）
 （OH）-Ad-P（=O）（OH）-である。GalNAc₃-12（GalNAc₃-
 12a-CM-）の構造は、以下に示される：

【 0 9 8 4 】

【 化 2 1 3 】

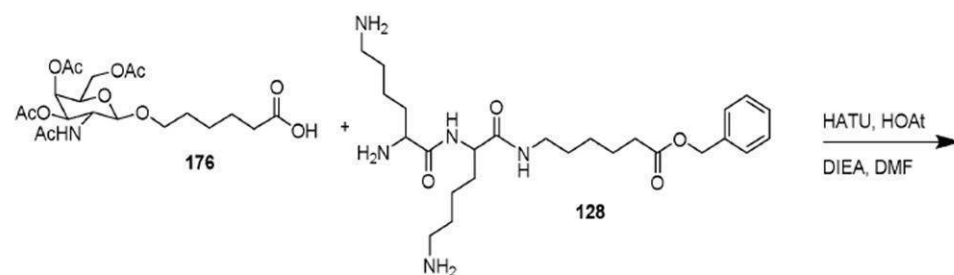


【 0 9 8 5 】

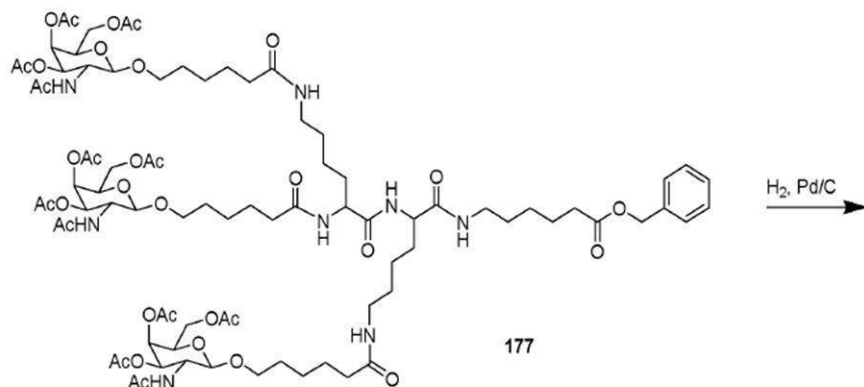
実施例 62 : GalNAc3-13を含むオリゴマー化合物 180 の調製

【 0 9 8 6 】

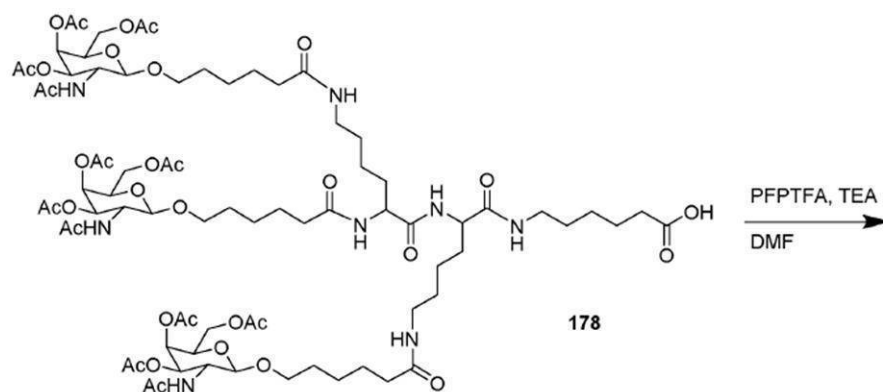
【 化 2 1 4 】



10



20



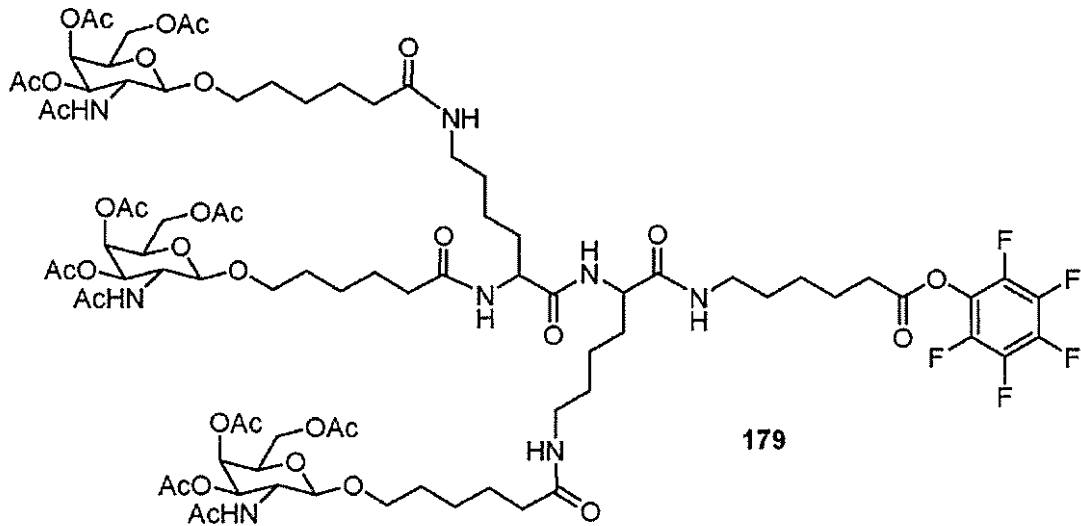
30

【 0 9 8 7 】

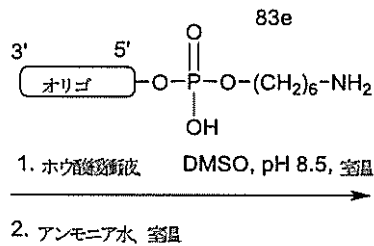
40

50

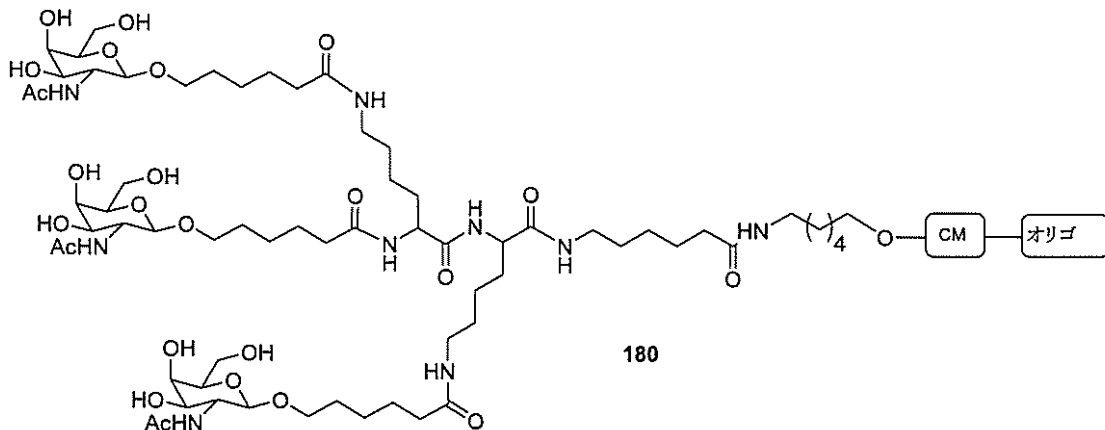
【化 2 1 5】



10



20



30

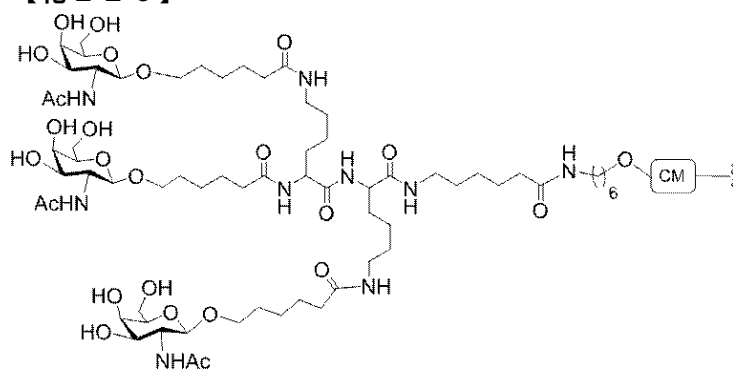
実施例 2 に示される一般的手順を用いて、化合物 176 を調製した。実施例 49 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-13 共役基を含むオリゴマー化合物 180 を化合物 177 から調製した。共役基 GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{Ad}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$ である。GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a-CM-) の構造は、以下に示される：

40

【0988】

50

【化 2 1 6】



10

【 0 9 8 9 】

実施例 63 : GaI NAc₃-14を含むオリゴマー化合物188の調製

【 0 9 9 0 】

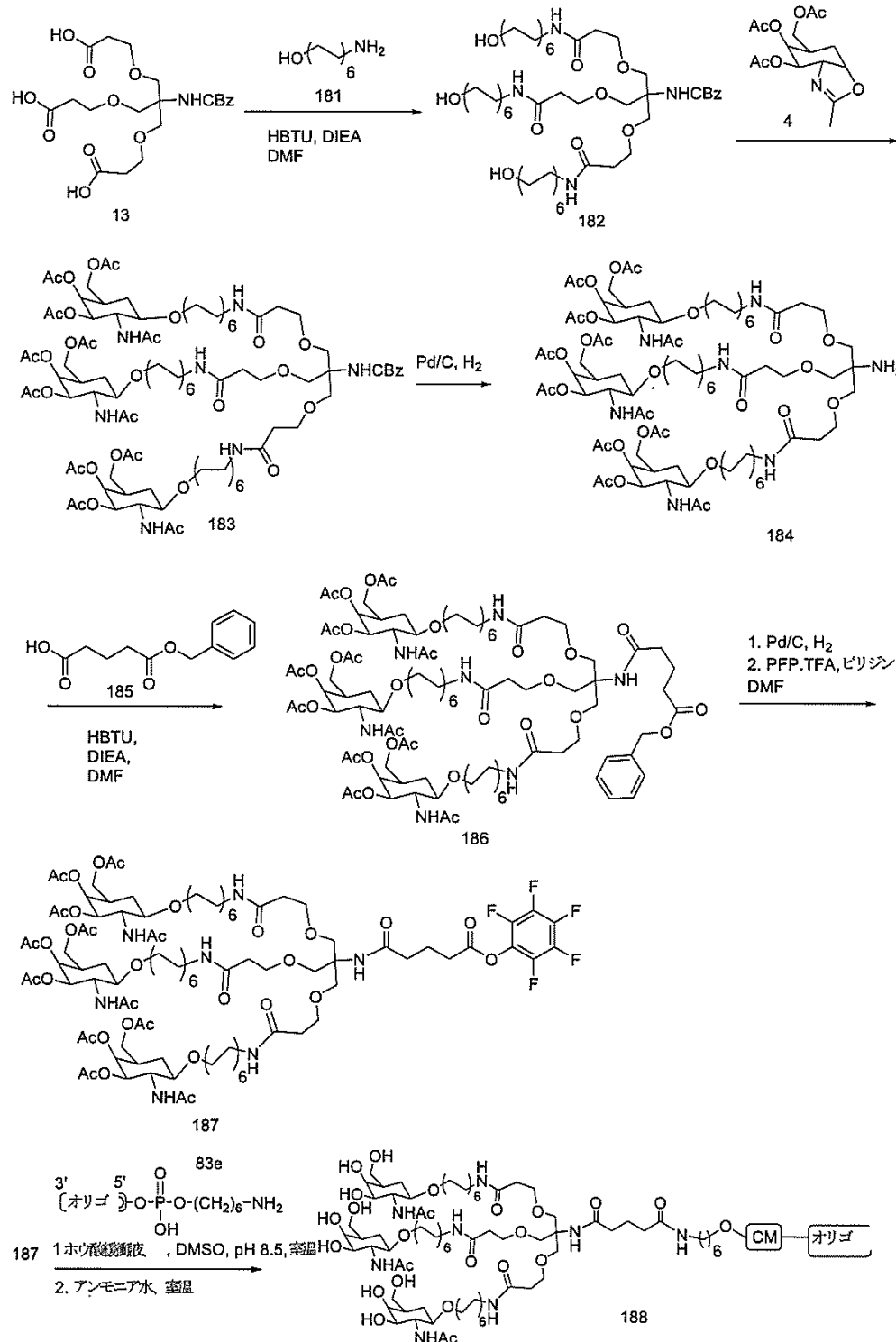
20

30

40

50

【化 2 1 7】



化合物 181 及び 185 は、市販のものである。実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-14 共役基を含むオリゴマー化合物 188 を化合物 187 から調製した。共役基 GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-AdP(=O)(OH)-である。GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a-CM-) の構造は、以下に示される：

【0991】

10

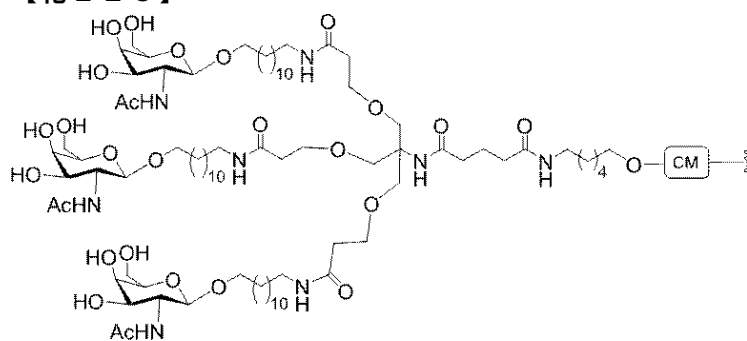
20

30

40

50

【化 2 1 8】



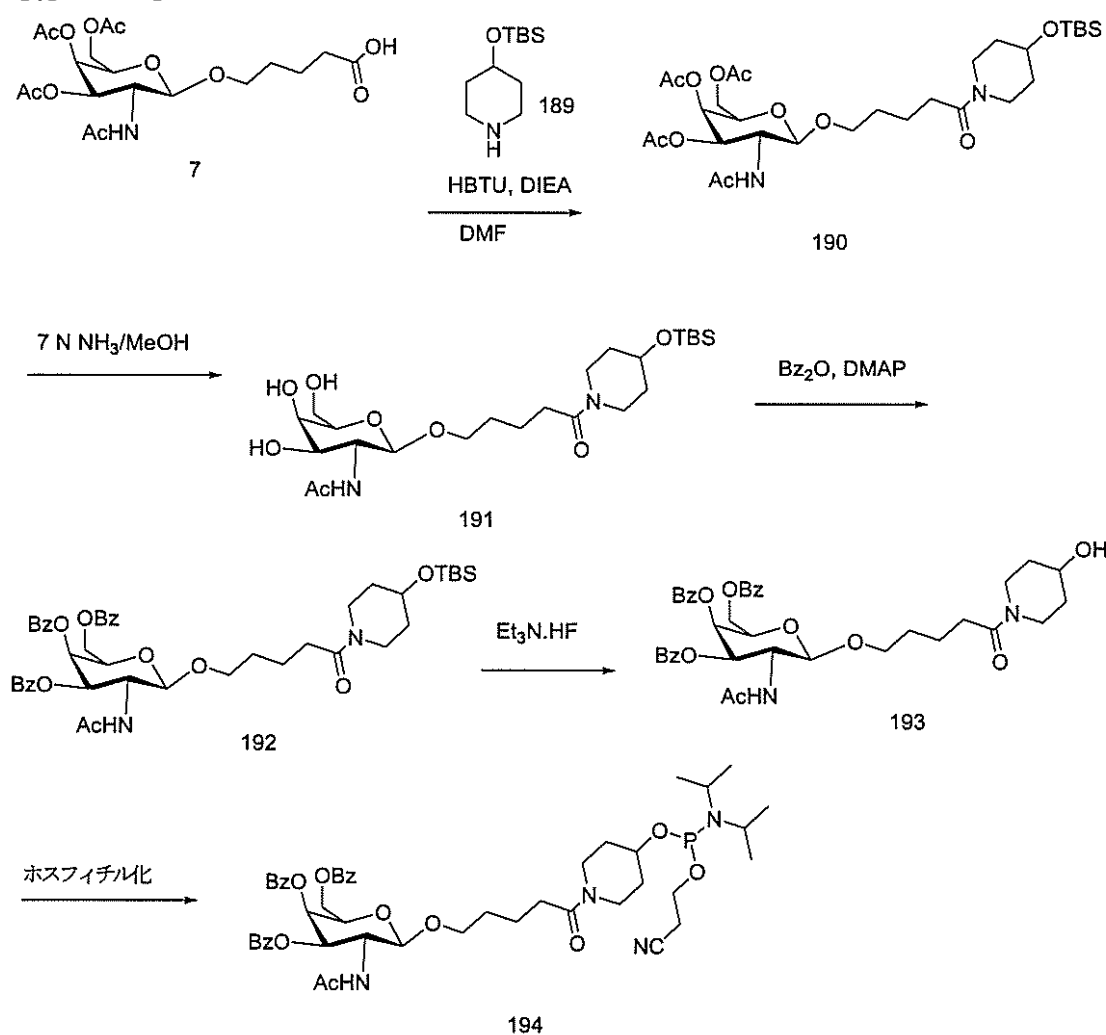
10

【 0 9 9 2】

実施例 6 4 : Ga l N A c 3 - 1 5 を含むオリゴマー化合物 1 9 7 の調製

【 0 9 9 3】

【化 2 1 9】



20

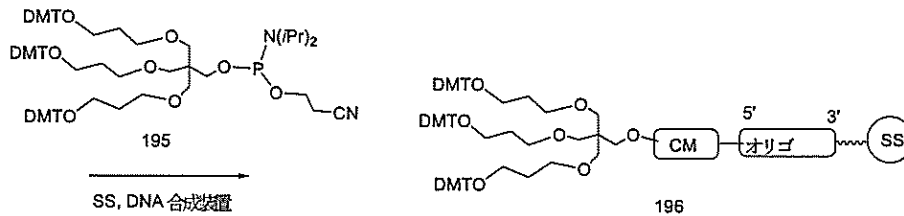
30

40

【 0 9 9 4】

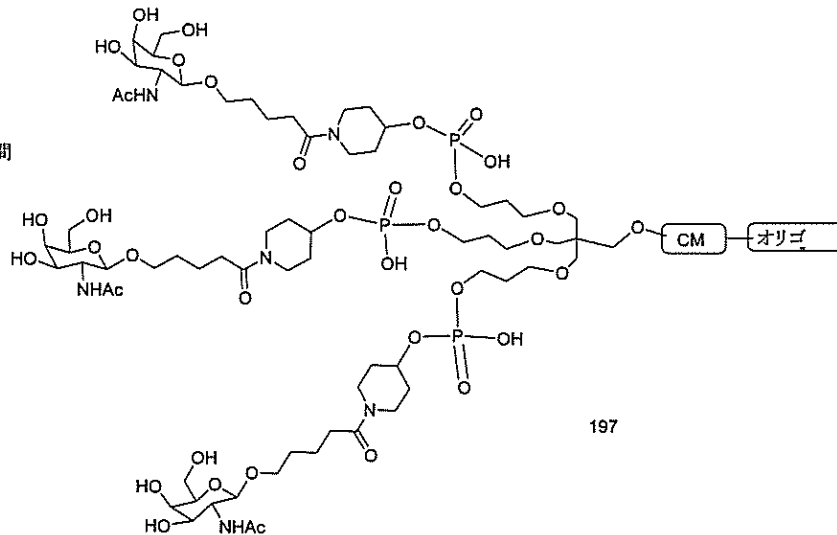
50

【化 2 2 0】



1. 194, DNA 合成装置

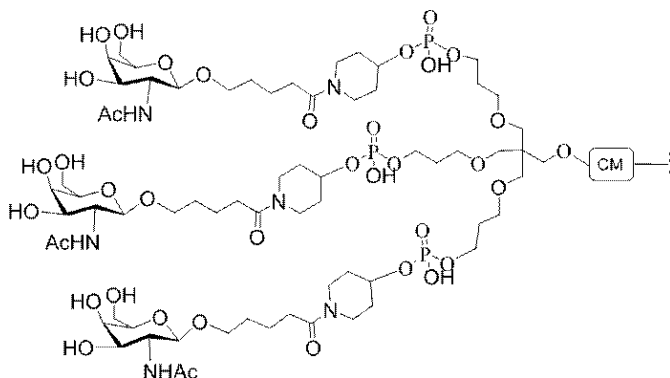
2. アンモニア水、55℃、18時間



化合物 189 は、市販のものである。実施例 31 に示される一般的手順を用いて、化合物 195 を調製した。標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて、GalNAc₃-15 共役基を含むオリゴマー化合物 197 を化合物 194 及び 195 から調製した。共役基 GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a-CM-) の構造は、以下に示される：

【0995】

【化 2 2 1】



【0996】

実施例 65：生体内における SRB-1 を標的とする 5'-共役基を含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験 (GalNAc₃-3、12、13、14、及び 15 の比較)

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 ISIS 353382 を標準物として含めた。GalNAc₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結 2'-デオキシ

アデノシンヌクレオシド（切断可能部分）によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端に取り付けられた。

【0997】

【表42】

表54

SRB-1を標的とする修飾ASO

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	共役体	配列番号
353 382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_d$ $s G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	なし	2256
661 161	$G a l N A c_3-3_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es}$ $A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	$G a l N$ $A c_3-$ 3	2258
671 144	$G a l N A c_3-12_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es}$ $A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	$G a l N$ $A c_3-$ 12	2258
670 061	$G a l N A c_3-13_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es}$ $A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	$G a l N$ $A c_3-$ 13	2258
671 261	$G a l N A c_3-14_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es}$ $A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	$G a l N$ $A c_3-$ 14	2258
671 262	$G a l N A c_3-15_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es}$ $A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds}$ $T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	$G a l N$ $A c_3-$ 15	2258

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0998】

$G a l N A c_3-3_a$ の構造は、先の実施例39に示される。 $G a l N A c_3-12_a$ の構造は、先の実施例61に示される。 $G a l N A c_3-13_a$ の構造は、先の実施例62に示される。 $G a l N A c_3-14_a$ の構造は、先の実施例63に示される。 $G a l N A c_3-15_a$ の構造は、先の実施例64に示される。

処理

【0999】

6~8週齢のC57bl6マウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 353382、661161、671144、670061、671261、671262、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回または2回、皮下注入した。2回投与されたマウスは、第1の投与の3日後に第2の投与を受けた。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓における

SRB-1 mRNAレベルを標準プロトコルに従って決定した。以下の結果は、生理食塩水（対照）に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【1000】

表55に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。単回用量を受けた動物と2回の用量を受けた動物との間で標的ノックダウンの著しい差は観察されなかった（ISIS 353382の投与量30及び2×15mg/kg、ならびにISIS 661161の投与量5及び2×2.5mg/kgを参照のこと）。ホスホジエステル連結GalNAc₃-3、12、13、14、及び15共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 335382）と比較して、力価の大幅な増加を示した。

【1001】

【表43】

表55

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	用量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%生理食塩水)	ED ₅₀ (mg/kg)	共役体
生理食塩水	n/a	100.0	n/a	n/a
353382	3	85.0	22.4	なし
	10	69.2		
	30	34.2		
	2 x 15	36.0		
661161	0.5	87.4	2.2	GalNAc ₃ -3
	1.5	59.0		
	5	25.6		
	2 x 2.5	27.5		
	15	17.4		
671144	0.5	101.2	3.4	GalNAc ₃ -12
	1.5	76.1		
	5	32.0		
	15	17.6		
670061	0.5	94.8	2.1	GalNAc ₃ -13
	1.5	57.8		
	5	20.7		
671261	15	13.3	4.1	GalNAc ₃ -14
	0.5	110.7		
	1.5	81.9		
	5	39.8		
	15	14.1		
671262	0.5	109.4	9.8	GalNAc ₃ -15
	1.5	99.5		
	5	69.2		
	15	36.1		

【1002】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な差は見られなかった（データ示されず）。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表56に示される。

【1003】

10

20

30

40

50

【表 4 4】

表 5 6

ISIS番号	用量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	総ビリル ビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	共役体
生理食塩水	n/a	28	60	0.1	39	n/a
353382	3	30	77	0.2	36	なし
	10	25	78	0.2	36	
	30	28	62	0.2	35	
	2 x 15	22	59	0.2	33	
661161	0.5	39	72	0.2	34	GalNAc ₃ -3
	1.5	26	50	0.2	33	
	5	41	80	0.2	32	
	2 x 2.5	24	72	0.2	28	
	15	32	69	0.2	36	
671144	0.5	25	39	0.2	34	GalNAc ₃ -12
	1.5	26	55	0.2	28	
	5	48	82	0.2	34	
	15	23	46	0.2	32	
670061	0.5	27	53	0.2	33	GalNAc ₃ -13
	1.5	24	45	0.2	35	
	5	23	58	0.1	34	
	15	24	72	0.1	31	
671261	0.5	69	99	0.1	33	GalNAc ₃ -14
	1.5	34	62	0.1	33	
	5	43	73	0.1	32	
	15	32	53	0.2	30	
671262	0.5	24	51	0.2	29	GalNAc ₃ -15
	1.5	32	62	0.1	31	
	5	30	76	0.2	32	
	15	31	64	0.1	32	

【1 0 0 4】

実施例 6 6 : 5' - G a l N A c₃ クラスターを含む S R B - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害へのさまざまな切断可能部分の影響

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける S R B - 1 のアンチセンス阻害について試験した。G a l N A c₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結ヌクレオシド（切断可能部分（C M））によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に取り付けられた。

【1 0 0 5】

10

20

30

40

50

【表 4 5】

表 5 7

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISIS S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラ スター	CM	配列 番号
661 161	GalNAc ₃ -3 _a -o·A _{do} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	22 58
670 699	GalNAc ₃ -3 _a -o·T _{do} G _{cs} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	T _d	22 61
670 700	GalNAc ₃ -3 _a -o·A _{eo} G _{cs} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _e	22 58
670 701	GalNAc ₃ -3 _a -o·T _{eo} G _{cs} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	T _e	22 61
671 165	GalNAc ₃ -13 _a -o·A _{do} G _{cs} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	22 58

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【1006】

GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示した。GalNAc₃-13_aの構造は、先の実施例62に示した。

【1007】

処理

6~8週齢のC57b16マウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 661161、670699、670700、670701、671165、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水（対照）に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【1008】

表58に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的

様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。さまざまな切断可能部分を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドはすべて、同様の力価を示した。

【1009】

【表46】

表58

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	用量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
661161	0.5	87.8	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	61.3		
	5	33.8		
	15	14.0		
670699	0.5	89.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	59.4		
	5	31.3		
	15	17.1		
670700	0.5	79.0	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1.5	63.3		
	5	32.8		
	15	17.9		
670701	0.5	79.1	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1.5	59.2		
	5	35.8		
	15	17.7		
671165	0.5	76.4	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	43.2		
	5	22.6		
	15	10.0		

【1010】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な差は見られなかった (データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表56に示される。

【1011】

10

20

30

40

50

【表 4 7】

表 5 9

ISIS番号	用量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	総ビリル ビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	n/a	24	64	0.2	31	n/a	n/a
661161	0.5	25	64	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	24	50	0.2	32		
	5	26	55	0.2	28		
	15	27	52	0.2	31		
670699	0.5	42	83	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	33	58	0.2	32		
	5	26	70	0.2	29		

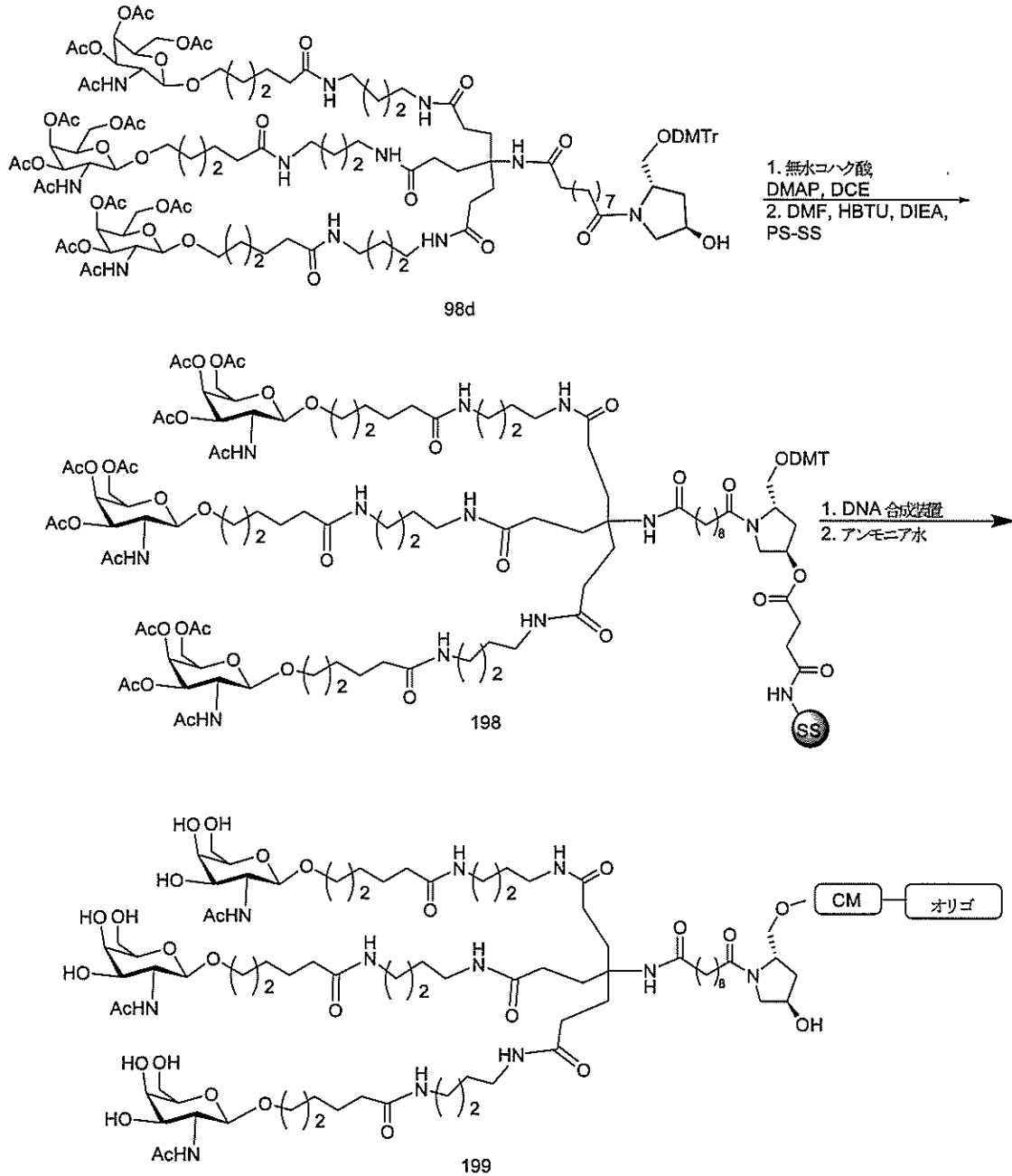
	15	25	67	0.2	29		
670700	0.5	40	74	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	A _c
	1.5	23	62	0.2	27		
	5	24	49	0.2	29		
	15	25	87	0.1	25		
670701	0.5	30	77	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	T _c
	1.5	22	55	0.2	30		
	5	81	101	0.2	25		
	15	31	82	0.2	24		
671165	0.5	44	84	0.2	26	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	47	71	0.1	24		
	5	33	91	0.2	26		
	15	33	56	0.2	29		

【1 0 1 2】

実施例 6 7 : G a l N A c ₃ - 1 6 を含むオリゴマー化合物 1 9 9 の調製

【1 0 1 3】

【化 2 2 2】



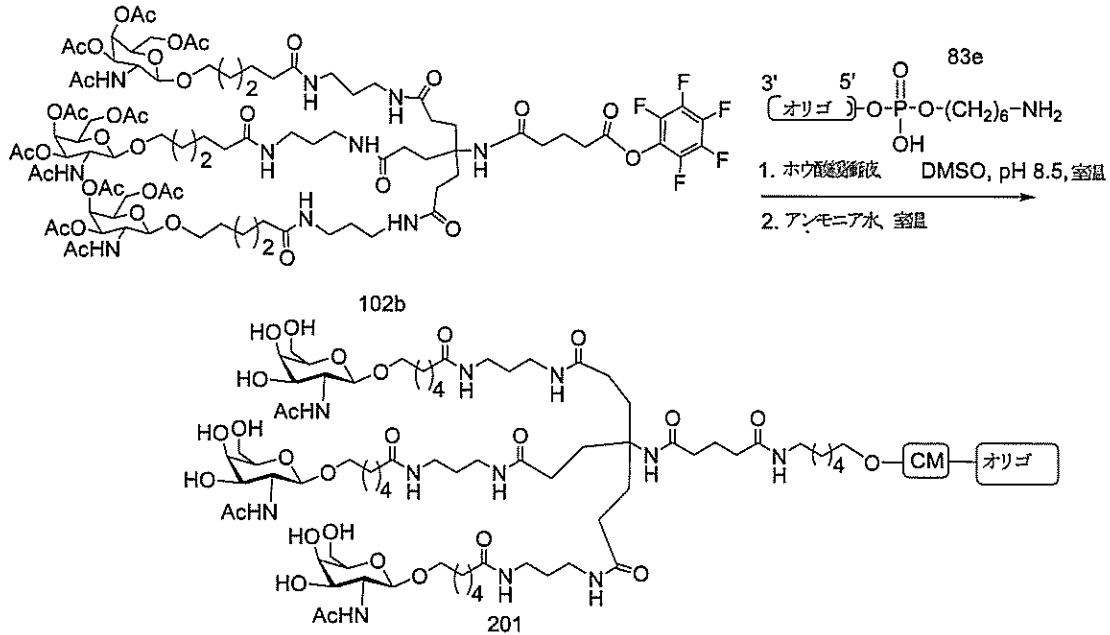
実施例 7 及び 9 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-16 共役基を含むオリゴマー化合物 199 を調製する。共役基 GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1014】

実施例 69 : GalNAc₃-18を含むオリゴマー化合物 201 の調製

【1019】

【化226】



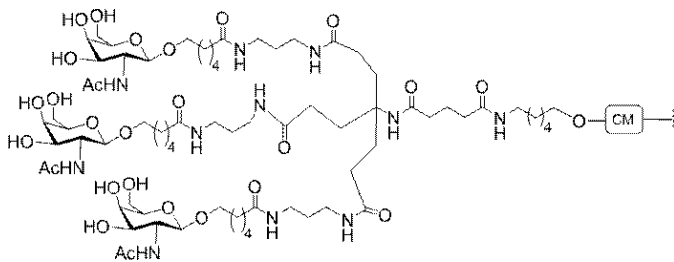
10

20

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-18 共役基を含むオリゴマー化合物 201 を調製した。共役基 GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1020】

【化227】



30

【1021】

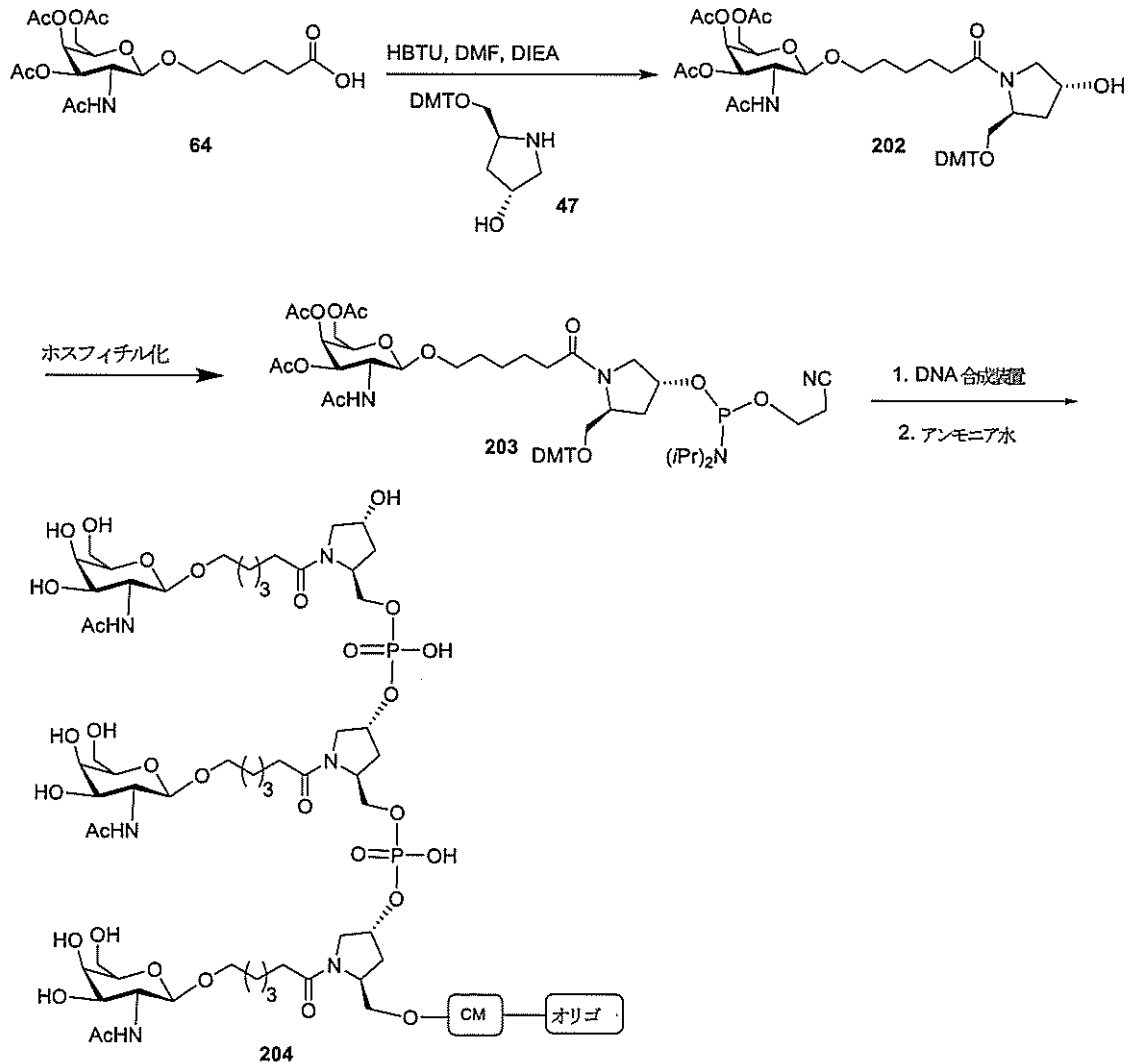
実施例 70 : GalNAc₃-19を含むオリゴマー化合物 204 の調製

【1022】

40

50

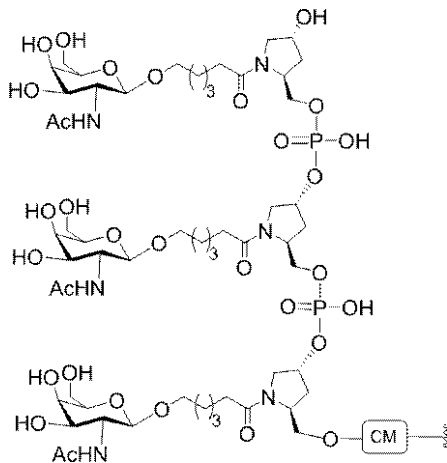
【化 2 2 8】



実施例 5 2 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-19 共役基を含むオリゴマー化合物 204 を化合物 64 から調製した。共役基 GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1023】

【化 2 2 9】

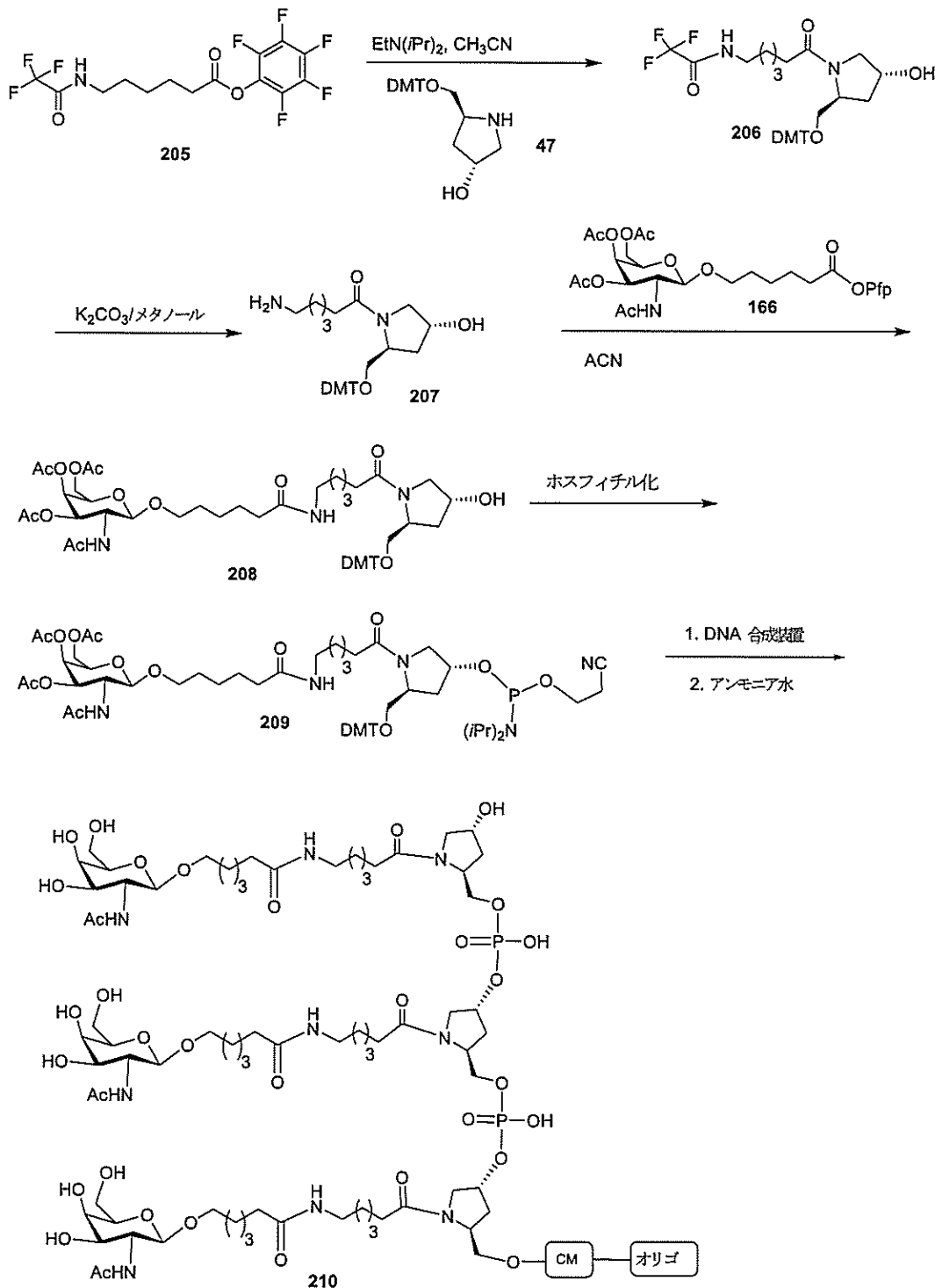


【1024】

実施例71: GalNAc₃-20を含むオリゴマー化合物210の調製

【1025】

【化230】

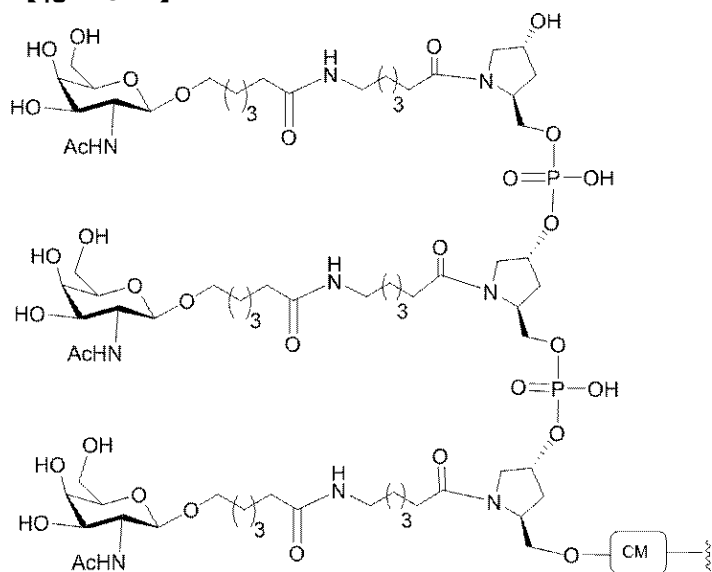


PFP-TFA及びDIEAを、トリフルिन酸無水物を6-アミノヘキサン酸に添加することによって調製したアセトニトリル中の6-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)ヘキサン酸に添加することによって、化合物205を調製した。反応混合物を80℃に加熱し、その後、室温まで下げた。実施例52に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-20共役基を含むオリゴマー化合物210を化合物208から調製した。共役基GalNAc₃-20 (GalNAc₃-20_a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定

の実施形態において、切断可能部分は、 $-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-$ である。 $GalNAc_3-20$ ($GalNAc_3-20a-CM-$) の構造は、以下に示される：

【1026】

【化231】



10

20

【1027】

実施例72： $GalNAc_3-21$ を含むオリゴマー化合物215の調製

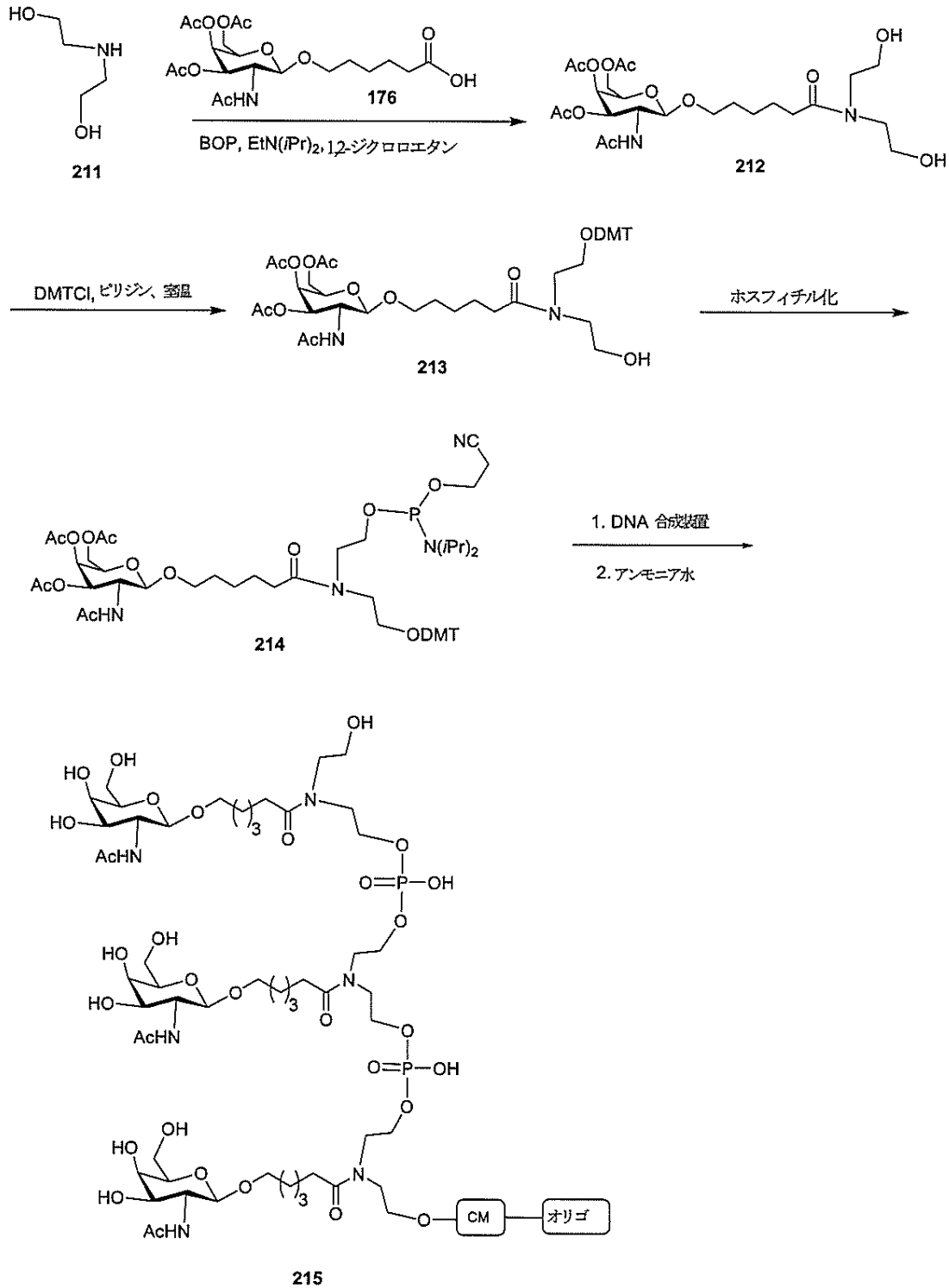
【1028】

30

40

50

【化 2 3 2】



化合物 211 は、市販のものである。実施例 52 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-21 共役基を含むオリゴマー化合物 215 を化合物 213 から調製した。共役基 GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1029】

10

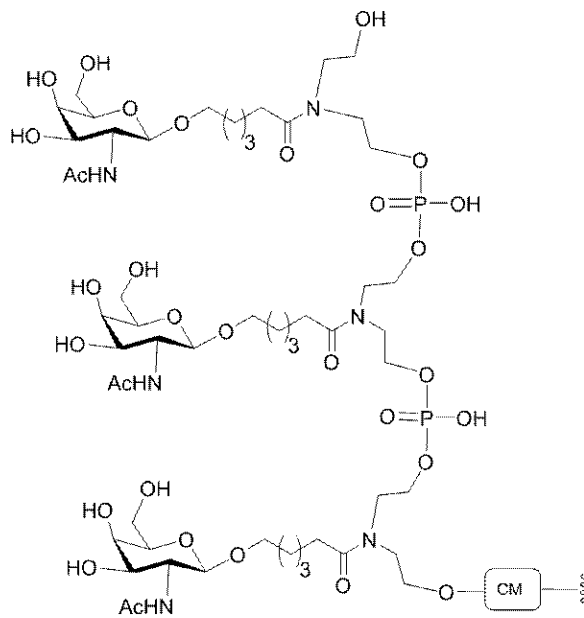
20

30

40

50

【化 2 3 3】



10

【1 0 3 0】

実施例 7 3 : G a l N A c 3 - 2 2 を含むオリゴマー化合物 2 2 1 の調製

20

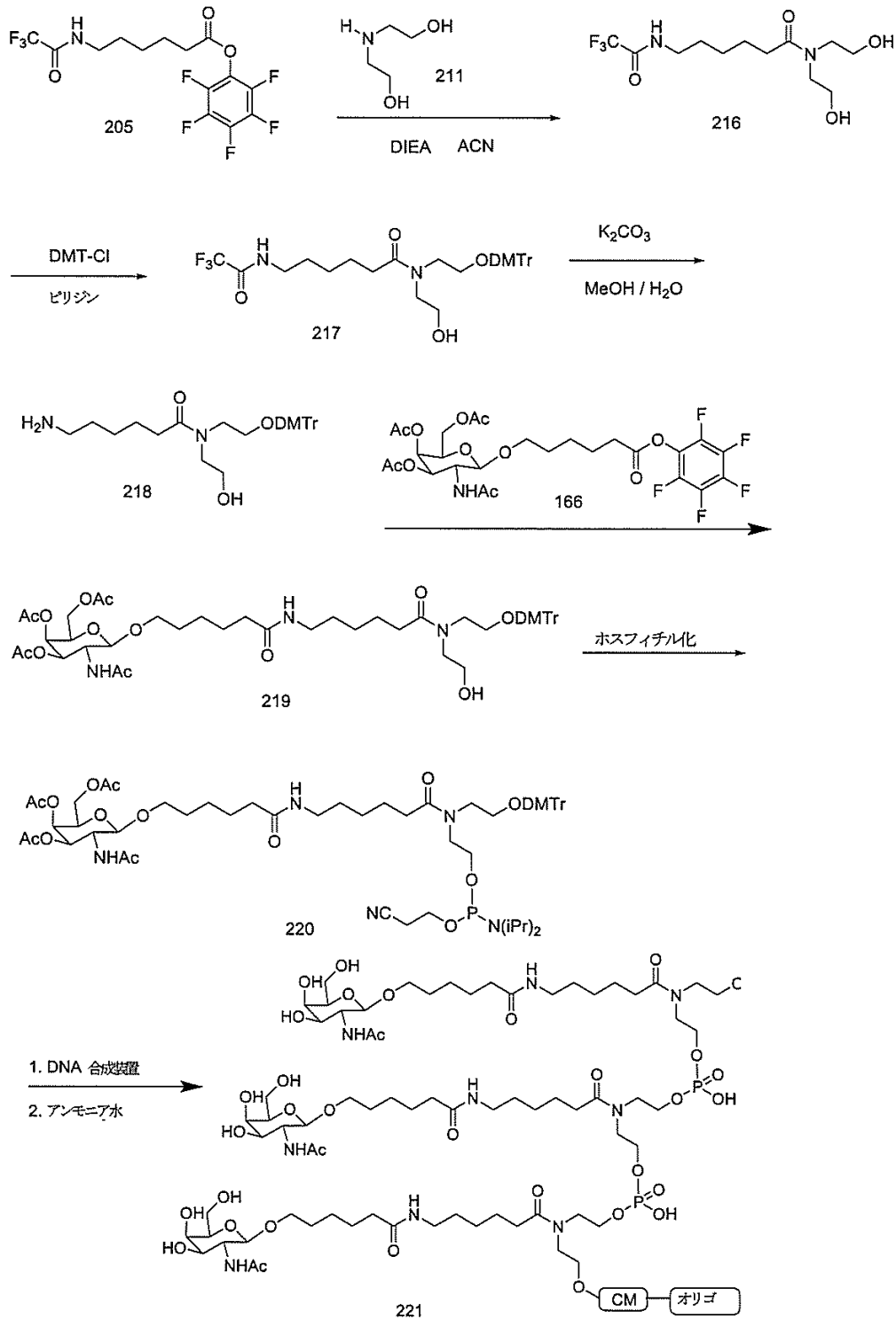
【1 0 3 1】

30

40

50

【化 2 3 4】



ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドを用いて、化合物 220 を化合物 219 から調製した。実施例 5 に例証される一般的な手順を用いて、GalNAc₃-21 共役基を含むオリゴマー化合物 221 を化合物 220 から調製する。共役基 GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、切断可能部分は、 $-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-$ である。GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1032】

10

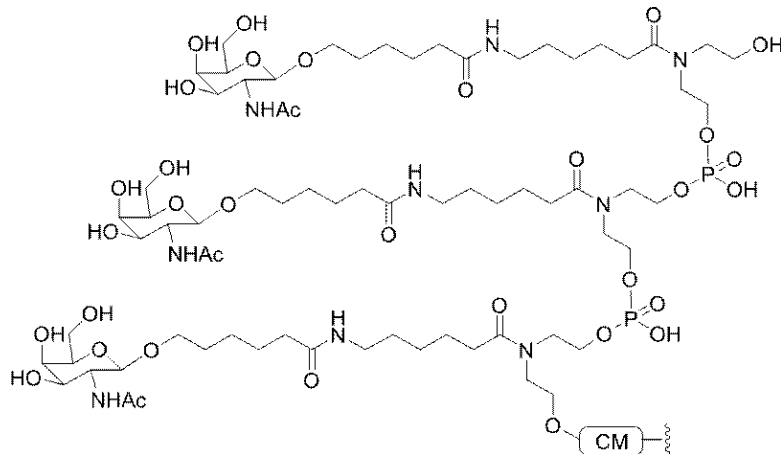
20

30

40

50

【化 2 3 5】



10

【1 0 3 3】

実施例 7 4：5' - G a l N A c₃ 共役体を含む S R B - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害へのさまざまな切断可能部分の影響

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける S R B - 1 のアンチセンス阻害について試験した。G a l N A c₃ 共役基のそれぞれは、それぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に取り付けられた。

20

【1 0 3 4】

【表 4 8】

表 6 0

S R B - 1 を標的とする修飾 A S O

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	G a l N A c ₃ クラ スター	CM	配 列 番号
3 5 3 3 8 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	該当なし	該当なし	2 2 5 6
6 6 1 1 6 1	G a l N A c ₃ - 3 _a - o _o · A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	G a l N A c ₃ - 3 a	A _d	2 2 5 8
6 6 6 9 0 4	G a l N A c ₃ - 3 _a - o _o · G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	G a l N A c ₃ - 3 a	P O	2 2 5 6
6 7 5 4 4 1	G a l N A c ₃ - 1 7 _a - o _o · A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	G a l N A c ₃ - 1 7 a	A _d	2 2 5 8
6 7 5 4 4 2	G a l N A c ₃ - 1 8 _a - o _o · A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	G a l N A c ₃ - 1 8 a	A _d	2 2 5 8

30

40

50

すべての表において、大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【1035】

GalNAc₃-3aの構造は、先の実施例39に示した。GalNAc₃-17aの構造は、先の実施例68に示し、GalNAc₃-18aの構造は、実施例69に示した。

【1036】

処理

6~8週齢のC57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、表60に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して正規化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【1037】

表61に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。GalNAc共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、同様の力価を示し、GalNAc共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【1038】

10

20

30

40

50

【表 49】

表 61

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	用量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
Saline	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
353382	3	79.38	該当なし	該当なし
	10	68.67		
	30	40.70		
661161	0.5	79.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	75.96		
	5	30.53		
	15	12.52		
666904	0.5	91.30	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	57.88		
	5	21.22		
	15	16.49		
675441	0.5	76.71	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	63.63		
	5	29.57		
	15	13.49		
675442	0.5	95.03	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	60.06		
	5	31.04		
	15	19.40		

【1039】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった (データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表 62 に示される。

【1040】

10

20

30

40

50

【表 50】

表 6 2

ISIS 番号	用 量 (mg /k g)	ALT (U/ L)	AST (U/ L)	総ビリル ビン (mg/ dL)	BUN (mg /dL)	GalNA c ₃ クラ スター	CM
Saline	該当なし	26	59	0.16	42	該当なし	該当 なし
3533 82	3	23	58	0.18	39	該当なし	該当 なし
	10	28	58	0.16	43		
	30	20	48	0.12	34		
6611 61	0.5	30	47	0.13	35	GalNA c ₃ -3a	A _d
	1.5	23	53	0.14	37		
	5	26	48	0.15	39		
	15	32	57	0.15	42		
6669 04	0.5	24	73	0.13	36	GalNA c ₃ -3a	PO
	1.5	21	48	0.12	32		
	5	19	49	0.14	33		
	15	20	52	0.15	26		
6754 41	0.5	42	148	0.21	36	GalNA c ₃ -17 a	A _d
	1.5	60	95	0.16	34		
	5	27	75	0.14	37		
	15	24	61	0.14	36		
6754 42	0.5	26	65	0.15	37	GalNA c ₃ -18 a	A _d
	1.5	25	64	0.15	43		
	5	27	69	0.15	37		
	15	30	84	0.14	37		

【1041】

実施例 75：5' - 共役基を含むオリゴヌクレオチドの薬物動態分析

実施例 65、66、及び 74 に記載される処理手順に従って得た肝臓試料を用いて、上の表 54、57、及び 60 における ASO の PK を評価した。肝臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出し、内部標準とともに IP-HPLC-MS によって分析した。適切な UV ピークを統合することによってすべての代謝物の合わせた組織レベル (μg/g) を測定し、適切な抽出イオンクロマトグラム (EIC) を用いて、共役体を欠く全長 ASO (この場合、ISIS 番号 353382 の「親」) の組織レベルを測定した。

【1042】

10

20

30

40

50

【表 5 1】

表 6 3

肝臓におけるPK分析

I S I S 番号	用量 (m g / k g)	UVによる総組 織レベル (μg /g)	E I Cによる親A S O 組 織 レ ベ ル (μg/g)	G a l N A c ₃ クラスタ ー	CM
3 5 3 3 8 2	3 1 0 3 0	8. 9 2 2. 4 5 4. 2	8. 6 2 1. 0 4 4. 2	該当なし	該 当 な し
6 6 1 1 6 1	5 1 5	3 2. 4 6 3. 2	2 0. 7 4 4. 1		
6 7 1 1 4 4	5 1 5	2 0. 5 4 8. 6	1 9. 2 4 1. 5		
6 7 0 0 6 1	5 1 5	3 1. 6 6 7. 6	2 8. 0 5 5. 5	G a l N A c ₃ -1 2 a	A _d
6 7 1 2 6 1	5 1 5	1 9. 8 6 4. 7	1 6. 8 4 9. 1	G a l N A c ₃ -1 2 a	A _d
6 7 1 2 6 2	5 1 5	1 8. 5 5 2. 3	7. 4 2 4. 2	G a l N A c ₃ -1 3 a	A _d
6 7 0 6 9 9	5 1 5	1 6. 4 3 1. 5	1 0. 4 2 2. 5	G a l N A c ₃ -1 4 a	A _d
6 7 0 7 0 0	5 1 5	1 9. 3 3 8. 1	1 0. 9 2 0. 0	G a l N A c ₃ -1 5 a	A _d
6 7 0 7 0 1	5 1 5	2 1. 8 3 5. 2	8. 8 1 6. 1	G a l N A c ₃ -3 a	T _d
6 7 1 1 6 5	5 1 5	2 7. 1 4 8. 3	2 6. 5 4 4. 3	G a l N A c ₃ -3 a	T _c
6 6 6 9 0 4	5 1 5	3 0. 8 5 2. 6	2 4. 0 3 7. 6	G a l N A c ₃ -1 3 a	A _d
6 6 6 9 0 4	5 1 5	3 0. 8 5 2. 6	2 4. 0 3 7. 6	G a l N A c ₃ -3 a	P O
6 7 5 4 4 1	5 1 5	2 5. 4 5 4. 2	1 9. 0 4 2. 1	G a l N A c ₃ -1 7 a	A _d
6 7 5 4 4 2	5 1 5	2 2. 2 3 9. 6	2 0. 7 2 9. 0	G a l N A c ₃ -1 8 a	A _d

【1 0 4 3】

上の表 6 3 における結果は、特に G a l N A c₃ 共役基を有するオリゴヌクレオチドと G a l N A c₃ 共役基を有しないオリゴヌクレオチドとの間の投薬の違いを考慮に入れた場合、オリゴヌクレオチド投与の 7 2 時間後に、G a l N A c₃ 共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓組織レベルが、G a l N A c₃ 共役基を含まない親オリゴヌクレオチド (I S I S 3 5 3 3 8 2) の肝臓組織レベルよりも高かったことを示す。さらに、7 2 時間までに、G a l N A c₃ 共役基を含む各オリゴヌクレオチドの 4 0 ~ 9 8 % が親化合物に代謝され、G a l N A c₃ 共役基がオリゴヌクレオチドから切断されたことを示す。

【1 0 4 4】

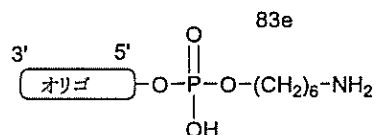
実施例 7 6 : G a l N A c₃ - 2 3 を含むオリゴマー化合物 2 3 0 の調製

【1 0 4 5】

HOCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2OH (222) $\xrightarrow[\text{ピリジン}]{\text{ToSCl}}$ HOCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2OTs (223) $\xrightarrow{\text{NaN}_3}$ HOCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2N3 (224) $\xrightarrow{\text{4, TMSOTf}}$ CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)O[C@H]1COCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2N3 (225) $\xrightarrow[\text{H}_2, \text{EtOAc, MeOH}]{\text{Pd(OH)}_2}$ CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)O[C@H]1COCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2NH2 (226) $\xrightarrow{\text{ACN}}$ CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)O[C@H]1COCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2NC(=O)CC(C(F)(F)F)C(F)(F)F (227) $\xrightarrow{\text{1) 還元, 2) 二酸カップリング, 3) Pd/C, 4) PFPTFA}}$ CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)O[C@H]1COCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2NC(=O)CC(C(F)(F)F)C(F)(F)F (228) $\xrightarrow{\text{1) 還元, 2) 二酸カップリング, 3) Pd/C, 4) PFPTFA}}$ CC(=O)N[C@@H]1[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)[C@H](OC(=O)C)O[C@H]1COCH2CH2OCH2CH2OCH2CH2NC(=O)CC(C(F)(F)F)C(F)(F)F (229)

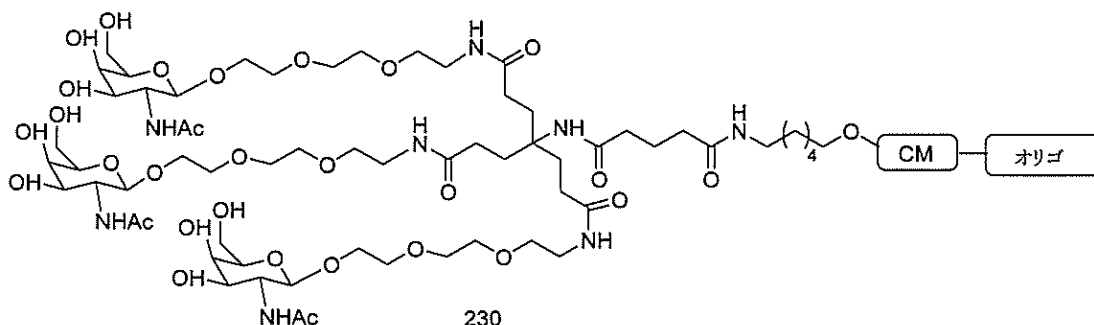
【 1 0 4 6 】

【化 2 3 7】



1. ホウ酸水溶液、DMSO, pH 8.5, 室温

2. アンモニア水、室温



化合物 2 2 2 は、市販のものである。4 4 . 4 8 m L (0 . 3 3 m o l) の化合物 2 2 2 をピリジン (5 0 0 m L) 中の塩化トシル (2 5 . 3 9 g 、 0 . 1 3 m o l) で 1 6 時間処理した。その後、反応物を蒸発させて油状物とし、E t O A c 中に溶解し、水、飽和 N a H C O ₃、ブラインで洗浄し、N a ₂ S O ₄ 上で乾燥させた。酢酸エチルを濃縮乾固させ、カラムクロマトグラフィーによって精製し、E t O A c / ヘキサン (1 : 1) 、続いて、C H ₂ C l ₂ 中の 1 0 % メタノールで溶出して、無色の油状物として化合物 2 2 3 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。1 0 g (3 2 . 8 6 m m o l) の 1 - トシルトリエチレングリコール (化合物 2 2 3) を、D M S O (1 0 0 m L) 中のアジ化ナトリウム (1 0 . 6 8 g 、 1 6 4 . 2 8 m m o l) で、室温で 1 7 時間処理した。その後、反応混合物を水上に注ぎ、E t O A c で抽出した。有機層を水で 3 回洗浄し、N a ₂ S O ₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させて、5 . 3 g の化合物 2 2 4 (9 2 %) を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。1 - アジドトリエチレングリコール (化合物 2 2 4 、 5 . 5 3 g 、 2 3 . 6 9 m m o l) 及び化合物 4 (6 g 、 1 8 . 2 2 m m o l) を、4 A モレキュラーシーブ (5 g) 及びジクロロメタン (1 0 0 m L) 中の T M S O T f (1 . 6 5 m L 、 9 . 1 1 m m o l) で、不活性雰囲気下で処理した。1 4 時間後、反応物を濾過して当該モレキュラーシーブを除去し、有機層を飽和 N a H C O ₃、水、ブラインで洗浄し、N a ₂ S O ₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させ、カラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 2 ~ 4 % メタノールの勾配で溶出して、化合物 2 2 5 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。化合物 2 2 5 (1 1 . 9 g 、 2 3 . 5 9 m m o l) をパールマン触媒上で、E t O A c / メタノール (4 : 1 、 2 5 0 m L) 中で水素化した。8 時間後、触媒を濾去し、溶媒を除去乾固して、化合物 2 2 6 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。

【1 0 4 7】

化合物 2 2 7 を生成するために、D M F (1 0 0 m L) 中のニトロメタントリスプロピオン酸 (4 . 1 7 g 、 1 5 . 0 4 m m o l) 及びヒューニッヒ塩基 (1 0 . 3 m L 、 6 0 . 1 7 m m o l) の溶液をペンタフルオロトリフルオロアセテート (9 . 0 5 m L 、 5 2 . 6 5 m m o l) で液滴処理した。3 0 分間後、反応物を氷水上に注ぎ、E t O A c で抽出した。有機層を水、ブラインで洗浄し、N a ₂ S O ₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させ、その後、ヘプタンから再結晶化して、白色の固体として化合物 2 2 7 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。化合物 2 2 7 (1 . 5 g 、 1 . 9 3 m m o l) 及び化合物 2 2 6 (3 . 7 g 、 7 . 7 4 m m o l) をアセトニトリル (1 5 m L) 中で

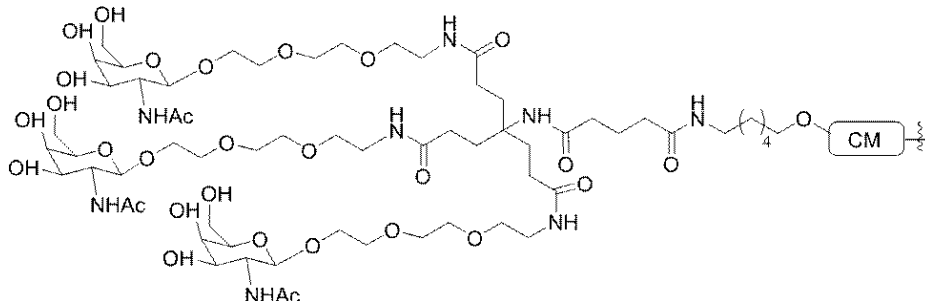
、室温で2時間撹拌した。その後、反応物を蒸発乾固し、カラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の2～10%メタノールの勾配で溶出して、化合物228を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。化合物228(1.7g、1.02mmol)をエタノール(100mL)中のラーニッケル(約2g、湿性)で、水素雰囲気下で処理した。12時間後、触媒を濾去し、有機層を蒸発させて固体にし、これを次のステップで直接使用した。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。この固体(0.87g、0.53mmol)をDMF(5mL)中のベンジルグルタル酸(0.18g、0.8mmol)、HBTU(0.3g、0.8mmol)、及びDIEA(273.7μL、1.6mmol)で処理した。16時間後、DMFを減圧下で65℃で除去して油状物とし、この油状物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を飽和NaHCO₃、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄上で乾燥させた。有機層を蒸発させた後、化合物をカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の2～20%メタノールの勾配で溶出して、カップリング生成物を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。ベンジレステルをパールマン触媒で、水素雰囲気下で1時間脱保護した。その後、この触媒を濾去し、溶媒を除去乾固して、酸を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。酸(486mg、0.27mmol)を乾燥DMF(3mL)中に溶解した。ピリジン(53.61μL、0.66mmol)を添加し、反応物をアルゴンでパージした。ペンタフルオロトリフルオロアセテート(46.39μL、0.4mmol)を反応混合物に緩徐に添加した。反応物の色が淡黄色からワイン色に変化し、少しの煙を発生し、この煙をアルゴン流で吹き飛ばした。反応物を室温で1時間撹拌させた(反応の完了をLCMSによって確認した)。この溶媒を減圧下(回転蒸発)で70℃で除去した。残渣をDCMで希釈し、1N NaHSO₄、ブライン、飽和重炭酸ナトリウム、及び再度ブラインで洗浄した。有機物をNa₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、黄色の脆い泡状物として225mgの化合物229を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。

【1048】

実施例46に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-23共役基を含むオリゴマー化合物230を化合物229から調製した。GalNAc₃-23共役基(GalNAc₃-23a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-23(GalNAc₃-23a-CM)の構造は、以下に示される：

【1049】

【化238】



【1050】

実施例77：GalNAc₃共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

【1051】

10

20

30

40

50

【表 5 2】

表 6 4

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalN Ac ₃ クラス ー	CM	配列番号
6 6 1 1 6 1	GalNAc ₃ -3 _a -o' A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalN Ac ₃ - 3a	A _d	2 2 5 8
6 6 6 9 0 4	GalNAc ₃ -3 _a -o' G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalN Ac ₃ - 3a	PO	2 2 5 6
6 7 3 5 0 2	GalNAc ₃ -10 _a -o' A _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalN Ac ₃ - 10a	A _d	2 2 5 8
6 7 7 8 4 4	GalNAc ₃ -9 _a -o' A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalN Ac ₃ - 9a	A _d	2 2 5 8
6 7 7 8 4 3	GalNAc ₃ -23 _a -o' A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalN Ac ₃ - 23a	A _d	2 2 5 8
6 5 5 8 6 1	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e sT _{es} T _{eo} A _{do} ' -GalNAc ₃ -1 _a	GalN Ac ₃ - 1a	A _d	2 2 5 7
6 7 7 8 4 1	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e sT _{es} T _{eo} A _{do} ' -GalNAc ₃ -19 _a	GalN Ac ₃ - 19a	A _d	2 2 5 7
6 7 7 8 4 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e sT _{es} T _{eo} A _{do} ' -GalNAc ₃ -20 _a	GalN Ac ₃ - 20a	A _d	2 2 5 7

【1 0 5 2】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例 9 に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例 3 9 に示され、GalNAc₃-9_aは、実施例 5 2 に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例 4 6 に示され、GalNAc₃-19_aは、実施例 7 0 に示され、GalNAc₃-20_aは、実施例 7 1 に示され、GalNAc₃-23_aは、実施例 7 6 に示される。

【1 0 5 3】

処理

6 ~ 8 週齢の C 5 7 B L / 6 マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r

10

20

30

40

50

Harbor, ME) のそれぞれに、表 6 4 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺して、リアルタイム PCR 及び R I B O G R E E N (登録商標) RNA 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、肝臓における S R B - 1 m R N A レベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水 (対照) に対して正規化された各処理群の S R B - 1 m R N A レベルの平均パーセントとして提示される。

【 1 0 5 4 】

表 6 5 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で S R B - 1 m R N A レベルを低下させた。

【 1 0 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 3】

表 6 5

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	用量 (mg/k g)	SRB-1 mRNA (%) 生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
661161	0.5	89.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	77.02		
	5	29.10		
	15	12.64		
666904	0.5	93.11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	55.85		
	5	21.29		
	15	13.43		
673502	0.5	77.75	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	41.05		
	5	19.27		
	15	14.41		
677844	0.5	87.65	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	93.04		
	5	40.77		
	15	16.95		
677843	0.5	102.28	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	70.51		
	5	30.68		
	15	13.26		
655861	0.5	79.72	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	55.48		
	5	26.99		
	15	17.58		
677841	0.5	67.43	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	45.13		
	5	27.02		
	15	12.41		
677842	0.5	64.13	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	53.56		
	5	20.47		
	15	10.23		

【1056】

標準のプロトコルを用いて、血清中の肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) も測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった (データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表 6 6 に示される。

【1057】

10

20

30

40

50

【表 5 4】

表 6 6

ISIS 番号	用 量 (mg / k g)	ALT (U/ L)	AST (U/ L)	総ビリル ビン (m g / d L)	BUN (mg /dL)	GalNA c ₃ クラ スター	CM
Saline	該当なし	21	45	0.13	34	該当なし	該当なし
661161	0.5	28	51	0.14	39	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	42	0.13	39		
	5	22	59	0.13	37		
	15	21	56	0.15	35		
666904	0.5	24	56	0.14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	26	68	0.15	35		
	5	23	77	0.14	34		
	15	24	60	0.13	35		
673502	0.5	24	59	0.16	34	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	20	46	0.17	32		
	5	24	45	0.12	31		
	15	24	47	0.13	34		
677844	0.5	25	61	0.14	37	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	23	64	0.17	33		
	5	25	58	0.13	35		
	15	22	65	0.14	34		
677843	0.5	53	53	0.13	35	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	25	54	0.13	34		
	5	21	60	0.15	34		
	15	22	43	0.12	38		
655861	0.5	21	48	0.15	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	28	54	0.12	35		
	5	22	60	0.13	36		
	15	21	55	0.17	30		
677841	0.5	32	54	0.13	34	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	24	56	0.14	34		
	5	23	92	0.18	31		
	15	24	58	0.15	31		
677842	0.5	23	61	0.15	35	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	24	57	0.14	34		
	5	41	62	0.15	35		
	15	24	37	0.14	32		

【1058】

実施例 78 : GalNAc₃ 共役体を含むアンギオテンシノーゼンを標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験において正常血圧の Sprague Dawley ラットにおけるアンギオテンシノーゼン (AGT) のアンチセンス阻害について試験した。

【1059】

10

20

30

40

50

【表 5 5】

表 6 7

AGTを標的とする修飾ASO

I S I S 番号	配列番号 (5' ~ 3')	G a l N A c ₃ クラスター	C M	配列番 号
5 5 2 6 6 8	${}^mC_{es}A_{es}{}^mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}A_{es}G_{es}G_{es}A_{es}T_e$	該当なし	該 当 な し	2 2 6 2
6 6 9 5 0 9	${}^mC_{es}A_{es}{}^mC_{es}T_{es}G_{es}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}{}^mC_{ds}A_{es}G_{es}G_{es}A_{es}T_{eo}A_{do} \cdot -GalNAc_3-1_a$	G a l N A c ₃ -1 _a	A _d	2 2 6 3

G a l N A c ₃ - 1_a の構造は、先の実施例 9 に示した。

【1060】

処理

6 週齢の雄 S p r a g u e D a w l e y ラットのそれぞれに、表 6 7 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を、以下に示される投与量で週 1 回、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にラットを殺した。リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、肝臓における A G T m R N A レベルを決定した。全アンギオテンシノーゲン E L I S A (カタログ番号 J P 2 7 4 1 2 , I B L I n t e r n a t i o n a l , T o r o n t o , O N) を用いて、1 : 2 0 , 0 0 0 で希釈した A G T 血漿タンパク質レベルを測定した。以下の結果は、P B S 対照に対して正規化された各処理群の肝臓における A G T m R N A レベルまたは血漿における A G T タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。

【1061】

表 6 8 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓における A G T m R N A 及び血漿タンパク質レベルを低下させ、G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチドは、G a l N A c 共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【1062】

10

20

30

40

50

【表 5 6】

表 6 8

肝臓における AGT mRNA 及び血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg / kg)	AGT 肝臓 mRNA (% PBS)	AGT 血漿タンパク質 (% PBS)	GalNAc ₃ クラスター	CM
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし
552668	3	95	122	該当なし	該当なし
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0.3	95	70	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

10

【1063】

標準のプロトコルを用いて、殺時に血漿中の肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、ならびに体重も測定した。結果が以下の表 6 9 に示される。

20

【1064】

【表 5 7】

表 6 9

肝臓トランスアミナーゼレベル及びラット体重

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	体重 (% ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM
PBS	該当なし	51	81	186	該当なし	該当なし
552668	3	54	93	183	該当なし	該当なし
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0.3	53	90	190	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

30

【1065】

実施例 7 9 : GalNAc₃ 共役体を含む APOC-III を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

40

以下の表 7 0 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1066】

50

【表 58】

表 70

APOC-III を標的とする修飾 ASO

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラ スター	CM	配 列 番号
304 801	A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	該当なし	該当 なし	2 2 4 8
647 535	A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _{co} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	2 2 4 9
663 083	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	2 2 6 4
674 449	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{do} A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	2 2 6 4
674 450	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _d _s A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	2 2 6 4
674 451	GalNAc ₃ -13 _a -o'-A _{do} A _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _d _s A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{cs} T _{cs} T _{cs} A _{cs} T _c	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	2 2 6 4

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示される。

【1067】

処理

ヒトAPOC-IIIを発現する6～8週齢のトランスジェニックマウスのそれぞれに、表70に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを1回皮下注入した。各処理群は、3匹の動物からなった。投薬前に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後72時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、及び6週間時点のレベルを決定した。実施例20に記載されるように、血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベルを測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIレベルの平均パーセントとして提示され、親オリゴヌクレオチドの投与量がGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドの投与量の3倍であったにもかかわらず、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドが共役基を有しない親オリゴヌクレオチド (ISIS 304801) よりも長い作用持続時間を示したことを示す。

【1068】

10

20

30

40

50

【表 59-1】

表 71

トランスジェニックマウスにおける血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベル

I S I S 番号	投与量 (mg/kg)	時点 (投与後の日数)	トリグリセリド (%ベースライン)	APOC-IIIタンパク質 (%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM
P B S	該当なし	3	97	102	該当なし	該当なし
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
30 48 01	30	3	40	34	該当なし	該当なし
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
64 75 35	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	A _d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
66 30 83	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		

【1069】

10

20

30

40

50

【表 5 9 - 2】

6 7 4 4 4 9	1 0	3	2 9	2 6	G a l N A c ₃ -7 a	A _d
		7	3 2	3 1		
		1 4	3 8	4 1		
		2 1	4 4	4 4		
		2 8	5 3	6 3		
		3 5	6 9	7 7		
		4 2	7 8	9 9		
6 7 4 4 5 0	1 0	3	3 3	3 0	G a l N A c ₃ -1 0 a	A _d
		7	3 5	3 4		
		1 4	3 1	3 4		
		2 1	4 4	4 4		
		2 8	5 6	6 1		
		3 5	6 8	7 0		
		4 2	8 3	9 5		
6 7 4 4 5 1	1 0	3	3 5	3 3	G a l N A c ₃ -1 3 a	A _d
		7	2 4	3 2		
		1 4	4 0	3 4		
		2 1	4 8	4 8		
		2 8	5 4	6 7		
		3 5	6 5	7 5		
		4 2	7 4	9 7		

10

20

【1 0 7 0】

実施例 8 0 : G a l N A c₃ 共役体を含む α -1 抗トリプシン (A 1 A T) を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおける A 1 A T の用量依存的阻害試験において試験した。

30

【1 0 7 1】

40

50

【表 60】

表 7 2

A1ATを標的とする修飾ASO

ISIS S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラス ター	CM	配列 番号
476 366	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	該当なし	該当 なし	2 2 6 5
656 326	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _{eo} A _{do} ・-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	2 2 6 6
678 381	GalNAc ₃ -3 _a -o・A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d sG _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	2 2 6 7
678 382	GalNAc ₃ -7 _a -o・A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d sG _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	2 2 6 7
678 383	GalNAc ₃ -10 _a -o・A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d dsG _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	2 2 6 7
678 384	GalNAc ₃ -13 _a -o・A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d dsG _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _e	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	2 2 6 7

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示される。

【1072】

処理

6週齢の雄C57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)のそれぞれに、表72に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを、以下に示される投与量で週1回、合計3回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺した。リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるA1AT mRNAレベルを決定した。マウスα1-抗トリプシンELISA(カタログ番号41-A1AMS-E01, Alpco, Salem, NH)を用いて、A1AT血漿タンパク質レベルを決定した。以下の結果は、PBS対照に対して正規化された各処理群の肝臓におけるA1AT mRNA及び血漿タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。

【1073】

表73に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓におけるA1AT mRNA及びA1AT血漿タンパク質レベルを低下させた。GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、親(ISIS 476366)よりも著しく強力であった。

【1074】

10

20

30

40

50

【表 6 1】

表 7 3

肝臓におけるA1AT mRNA及び血漿タンパク質レベル

I S I S 番号	投与量 (mg / kg)	肝臓における A1AT mRNA (%PB S)	A1AT血漿 タンパク質 (%PBS)	G a l N A c ₃ クラスター	CM
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし
476 366	5	86	78	該当なし	該当なし
	15	73	61		
	45	30	38		
656 326	0.6	99	90	G a l N A c ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678 381	0.6	105	90	G a l N A c ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678 382	0.6	90	79	G a l N A c ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678 383	0.6	94	84	G a l N A c ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678 384	0.6	106	91	G a l N A c ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

【1075】

標準のプロトコルを用いて、殺時に血漿中の肝臓トランスアミナーゼ及びBUNレベルを測定した。体重及び臓器重量も測定した。結果が以下の表74に示される。体重は、ベースラインと比較した%として示される。臓器重量は、PBS対照群と比較した体重の%として示される。

【1076】

10

20

30

40

50

【表 6 2】

表 7 4

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	体重（% ベースラ イン）	肝臓重量 （体重の 相対%）	腎臓重量 （体重の 相対%）	脾臓重量 （体重の 相対%）
PBS	n/a	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
	0.6	29	57	40	123	100	103	119
656326	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
	0.6	26	57	32	117	93	109	110
678381	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
	0.6	26	42	35	114	100	103	103
678382	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
	0.6	30	67	38	121	91	100	123
678383	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
	0.6	36	63	31	118	98	103	98
678384	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104
	0.6	36	63	31	118	98	103	98

【1 0 7 7】

実施例 8 1：生体内における G a l N A c₃ クラスターを含む A 1 A T を標的とするオリゴヌクレオチドの作用持続時間

表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1 0 7 8】

処理

6 週齢の雄 C 5 7 B L / 6 マウスのそれぞれに、表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 5、12、19、及び 25 日時点のレベルを決定した。E L I S A を用いて血漿 A 1 A T タンパク質レベルを測定した（実施例 8 0 を参照のこと）。以下の結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の血漿 A 1 A T タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。結果は、G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチドが G a l N A c 共役体を欠く親（I S I S 4 7 6 3 6 6）よりも強力であり、かつより長い作用持続時間を有したことを示す。さらに、5'-G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチド（I S I S 6 7 8 3 8 1、6 7 8 3 8 2、6 7 8 3 8 3、及び 6 7 8 3 8 4）は、概して、3'-G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチド（I S I S 6 5 6 3 2 6）よりもさらに強力であり、さらに長い作用持続時間を有した。

【1 0 7 9】

10

20

30

40

50

【表 6 3】

表 7 5

マウスにおける血漿A1ATタンパク質レベル

I S I S 番号	投与量 (mg ／k g)	時点 (投与 後の日数)	A 1 A T (% ベ ー ス ラ イ ン)	G a l N A c ₃ クラスタ ー	CM
P B S	該 当 な し	5	9 3	該 当 な し	該 当 な し
		1 2	9 3		
		1 9	9 0		
		2 5	9 7		
4 7 6 3 6 6	1 0 0	5	3 8	該 当 な し	該 当 な し
		1 2	4 6		
		1 9	6 2		
		2 5	7 7		
6 5 6 3 2 6	1 8	5	3 3	G a l N A c ₃ - 1 a	A _d
		1 2	3 6		
		1 9	5 1		
		2 5	7 2		
6 7 8 3 8 1	1 8	5	2 1	G a l N A c ₃ - 3 a	A _d
		1 2	2 1		
		1 9	3 5		
		2 5	4 8		
6 7 8 3 8 2	1 8	5	2 1	G a l N A c ₃ - 7 a	A _d
		1 2	2 1		
		1 9	3 9		
		2 5	6 0		
6 7 8 3 8 3	1 8	5	2 4	G a l N A c ₃ - 1 0 a	A _d
		1 2	2 1		
		1 9	4 5		
		2 5	7 3		
6 7 8 3 8 4	1 8	5	2 9	G a l N A c ₃ - 1 3 a	A _d
		1 2	3 4		
		1 9	5 7		
		2 5	7 6		

【1080】

実施例 8 2 : G a l N A c ₃ 共役体を含む S R B - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体外におけるアンチセンス阻害

処理の 2 時間前に、初代マウス肝細胞を 1 5 , 0 0 0 細胞 / ウェルで 9 6 ウェルプレートに播種した。表 7 6 に列記されるオリゴヌクレオチドをウィリアム E 培地に 2、10、50、または 2 5 0 n M で添加し、細胞を 3 7 ° C、5 % C O ₂ で一晩インキュベートした。オリゴヌクレオチド添加の 1 6 時間後に細胞を溶解し、R N e a s e 3 0 0 0 B i o R o b o t (Q i a g e n) を用いて全 R N A を精製した。リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、S R B - 1 m R N A レベルを標準のプロトコルに従って決定した。P r i s m 4 ソフトウェア (G r a p h P a d) を用いて、I C ₅₀

値を決定した。結果は、さまざまな異なる G a l N A c 共役基及びさまざまな異なる切断可能部分を含むオリゴヌクレオチドが、生体外自由取り込み実験において、G a l N A c 共役基を欠く親オリゴヌクレオチド (I S I S 3 5 3 3 8 2 及び 6 6 6 8 4 1) よりも著しく強力であることを示す。

【1081】

【表64-1】

表76

生体外におけるSRB-1発現の阻害

I S I S 番号	配列 (5' ~ 3')	結合	G a l N A c クラスタ	CM	I C ₅₀ (nM)	配列番号
3 5 3 3 8 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	該当なし	該当なし	2 5 0	2 2 5 6
6 5 5 8 6 1	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} · -G a l N A c ₃ -1 _a	PS	G a l N A c ₃ -1 _a	A _d	4 0	2 2 5 7
6 6 1 1 6 1	G a l N A c ₃ -3 _a -o·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _e ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	G a l N A c ₃ -3 _a	A _d	4 0	2 2 5 8
6 6 1 1 6 2	G a l N A c ₃ -3 _a -o·A _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _e ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	PO / P S	G a l N A c ₃ -3 _a	A _d	8	2 2 5 8
6 6 4 0 7 8	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} · -G a l N A c ₃ -9 _a	PS	G a l N A c ₃ -9 _a	A _d	2 0	2 2 5 7
6 6 5 0 0 1	G a l N A c ₃ -8 _a -o·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	G a l N A c ₃ -8 _a	A _d	7 0	2 2 5 8
6 6 6 2 2 4	G a l N A c ₃ -5 _a -o·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	G a l N A c ₃ -5 _a	A _d	8 0	2 2 5 8
6 6 6 8 4 1	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	PO / P S	該当なし	該当なし	> 2 5 0	2 2 5 6

【1082】

10

20

30

40

50

【表 6 4 - 2】

6 6 6 8 8 1	$G a l N a c_3-10_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m$ $C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m$ $C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-1$ 0_a	A_d	3 0	2 2 5 8
6 6 6 9 0 4	$G a l N a c_3-3_a-o \cdot G_{es}^m C_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-3$ a	PO	9	2 2 5 6
6 6 6 9 2 4	$G a l N a c_3-3_a-o \cdot T_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $s^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-3$ a	T_d	1 5	2 2 6 1
6 6 6 9 6 1	$G a l N a c_3-6_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-6$ a	A_d	1 5 0	2 2 5 8
6 6 6 9 8 1	$G a l N a c_3-7_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-7$ a	A_d	2 0	2 2 5 8
6 7 0 0 6 1	$G a l N a c_3-13_a-o \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-1$ 3_a	A_d	3 0	2 2 5 8
6 7 0 6 9 9	$G a l N a c_3-3_a-o \cdot T_{do} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $o^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO / P S	$G a l N$ $A c_3-3$ a	T_d	1 5	2 2 6 1
6 7 0 7 0 0	$G a l N a c_3-3_a-o \cdot A_{eo} G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_e$ $o^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_e$	PO / P S	$G a l N$ $A c_3-3$ a	A_e	3 0	2 2 5 8

【1 0 8 3】

10

20

30

40

50

【表 6 4 - 3】

6 7 0 7 0 1	$GaINAc_3-3_a-o \cdot TeoG_{es}^mC_{eo}TeoT_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{es}T_{es}T_e$	$\begin{matrix} P O \\ / P \\ S \end{matrix}$	$GaINAc_3-3_a$	T_e	2 5	2 2 6 1
6 7 1 1 4 4	$GaINAc_3-12_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$GaINAc_3-12_a$	A_d	4 0	2 2 5 8
6 7 1 1 6 5	$GaINAc_3-13_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{es}T_{es}T_e$	$\begin{matrix} P O \\ / P \\ S \end{matrix}$	$GaINAc_3-13_a$	A_d	8	2 2 5 8
6 7 1 2 6 1	$GaINAc_3-14_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$GaINAc_3-14_a$	A_d	> 2 5 0	2 2 5 8
6 7 1 2 6 2	$GaINAc_3-15_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$GaINAc_3-15_a$	A_d	> 2 5 0	2 2 5 8
6 7 3 5 0 1	$GaINAc_3-7_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{es}T_{es}T_e$	$\begin{matrix} P O \\ / P \\ S \end{matrix}$	$GaINAc_3-7_a$	A_d	3 0	2 2 5 8
6 7 3 5 0 2	$GaINAc_3-10_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{eo}T_{eo}T_{eo}^mC_{eo}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{eo}^mC_{eo}^mC_{es}T_{es}T_e$	$\begin{matrix} P O \\ / P \\ S \end{matrix}$	$GaINAc_3-10_a$	A_d	8	2 2 5 8
6 7 5 4 4 1	$GaINAc_3-17_a-o \cdot A_{do}G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$GaINAc_3-17_a$	A_d	3 0	2 2 5 8

【1 0 8 4】

10

20

30

40

50

【表 6 4 - 4】

6 7 5 4 4 2	$G a l N A c_3-18_a-o, A_{do}G_{es}^m$ $C_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^m$ $C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}$ $T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-1$ 8_a	A_d	2 0	2 2 5 8
6 7 7 8 4 1	$G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_{eo}A_{do},$ $-G a l N A c_3-19_a$	PS	$G a l N$ $A c_3-1$ 9_a	A_d	4 0	2 2 5 7
6 7 7 8 4 2	$G_{es}^mC_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}$ $T_{ds}^mC_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}$ $T_{ds}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_{eo}A_{do},$ $-G a l N A c_3-20_a$	PS	$G a l N$ $A c_3-2$ 0_a	A_d	3 0	2 2 5 7
6 7 7 8 4 3	$G a l N A c_3-23_a-o, A_{do}G_{es}^m$ $C_{es}T_{es}T_{es}^mC_{es}A_{ds}G_{ds}T_{ds}^m$ $C_{ds}A_{ds}T_{ds}G_{ds}A_{ds}^mC_{ds}T_{ds}$ $T_{es}^mC_{es}^mC_{es}T_{es}T_e$	PS	$G a l N$ $A c_3-2$ 3_a	A_d	4 0	2 2 5 8

$G a l N A c_3-1_a$ の構造は、先の実施例 9 に示され、 $G a l N A c_3-3_a$ は、実施例 3 9 に示され、 $G a l N A c_3-5_a$ は、実施例 4 9 に示され、 $G a l N A c_3-6_a$ は、実施例 5 1 に示され、 $G a l N A c_3-7_a$ は、実施例 4 8 に示され、 $G a l N A c_3-8_a$ は、実施例 4 7 に示され、 $G a l N A c_3-9_a$ は、実施例 5 2 に示され、 $G a l N A c_3-10_a$ は、実施例 4 6 に示され、 $G a l N A c_3-12_a$ は、実施例 6 1 に示され、 $G a l N A c_3-13_a$ は、実施例 6 2 に示され、 $G a l N A c_3-14_a$ は、実施例 6 3 に示され、 $G a l N A c_3-15_a$ は、実施例 6 4 に示され、 $G a l N A c_3-17_a$ は、実施例 6 8 に示され、 $G a l N A c_3-18_a$ は、実施例 6 9 に示され、 $G a l N A c_3-19_a$ は、実施例 7 0 に示され、 $G a l N A c_3-20_a$ は、実施例 7 1 に示され、 $G a l N A c_3-23_a$ は、実施例 7 6 に示される。

【1 0 8 5】

実施例 8 3： $G a l N A c_3$ クラスターを含む、第 X I 因子を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表 7 7 に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおける第 X I 因子の用量依存的阻害試験において試験した。

【1 0 8 6】

【表 6 5】

表 7 7

第 X I 因子を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc クラスター	CM	配列番 号
4 0 4 0 7 1	T _{cs} G _{cs} G _{cs} T _{cs} A _{cs} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{cs} G _{cs} A _e sG _{cs} G _e	該当なし	該 当 なし	2 2 5 9
6 5 6 1 7 3	T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _e sG _{cs} G _{eo} A _{do} ・-GalNAc _{3-1a}	GalNAc _{3-1a}	A _d	2 2 6 0
6 6 3 0 8 6	GalNAc _{3-3a-o} ・A _{do} T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{cs} G _{cs} G _e	GalNAc _{3-3a}	A _d	2 2 6 8
6 7 8 3 4 7	GalNAc _{3-7a-o} ・A _{do} T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{cs} G _{cs} G _e	GalNAc _{3-7a}	A _d	2 2 6 8
6 7 8 3 4 8	GalNAc _{3-10a-o} ・A _{do} T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{cs} G _{cs} G _e	GalNAc _{3-10a}	A _d	2 2 6 8
6 7 8 3 4 9	GalNAc _{3-13a-o} ・A _{do} T _{cs} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{cs} G _{cs} G _e	GalNAc _{3-13a}	A _d	2 2 6 8

GalNAc_{3-1a}の構造は、先の実施例 9 に示され、GalNAc_{3-3a}は、実施例 3 9 に示され、GalNAc_{3-7a}は、実施例 4 8 に示され、GalNAc_{3-10a}は、実施例 4 6 に示され、GalNAc_{3-13a}は、実施例 6 2 に示される。

【1 0 8 7】

処理

6 ~ 8 週齢のマウスのそれぞれに、以下に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を、以下に示される投与量で週 1 回、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺した。リアルタイム P C R を用いて肝臓における第 X I 因子 mRNA レベルを測定し、標準のプロトコルに従ってシクロフィリンに対して正規化した。肝臓トランスアミナーゼ、B U N、及びビリルビンも測定した。以下の結果は、P B S 対照に対して正規化された各処理群の平均パーセントとして提示される。

【1 0 8 8】

表 7 8 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓における第 X I 因子 mRNA を低下させた。結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、GalNAc 共役体を欠く親 (I S I S 4 0 4 0 7 1) よりも強力であったことを示す。さらに、5' - GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 6 3 0 8 6、6 7 8 3 4 7、6 7 8 3 4 8、及び 6 7 8 3 4 9) は、3' - GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 5 6 1 7 3) よりもさらに強力であった。

【1 0 8 9】

10

20

30

40

50

【表 6 6】

表 7 8

肝臓における第X I 因子mRNA、肝臓トランスアミナーゼ、BUN、及びビリルビンレベル

ISIS 番号	用量 (mg/kg)	第X I 因子 mRNA (% PBS)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	ビリルビン (mg/dL)	GalNAc ₃ クラスター	配列 番号
PBS	該当なし	100	63	70	21	0.18	該当なし	該当なし
404071	3	65	41	58	21	0.15	該当なし	2259
	10	33	49	53	23	0.15		
	30	17	43	57	22	0.14		
656173	0.7	43	90	89	21	0.16	GalNAc ₃ -1a	2260
	2	9	36	58	26	0.17		
	6	3	50	63	25	0.15		
663086	0.7	33	91	169	25	0.16	GalNAc ₃ -3a	2268
	2	7	38	55	21	0.16		
	6	1	34	40	23	0.14		
678347	0.7	35	28	49	20	0.14	GalNAc ₃ -7a	2268
	2	10	180	149	21	0.18		
	6	1	44	76	19	0.15		
678348	0.7	39	43	54	21	0.16	GalNAc ₃ -10a	2268
	2	5	38	55	22	0.17		
	6	2	25	38	20	0.14		
678349	0.7	34	39	46	20	0.16	GalNAc ₃ -13a	2268
	2	8	43	63	21	0.14		
	6	2	28	41	20	0.14		

【1090】

実施例 84：GalNAc₃ 共役体を含む第X I 因子を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

表 7 7 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1091】

処理

6～8 週齢のマウスのそれぞれに、表 7 7 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは PBS を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬の前日に尾採血によって血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 3、10、及び 17 日間時点のレベルを決定した。R & D Systems (Minneapolis, MN) の第X I 因子捕捉及びビオチン化検出抗体（それぞれ、カタログ番号 AF2460 及び BAF2460）、ならびに OptEIA 試薬セット B（カタログ番号 550534、BD Biosciences, San Jose, CA）を用いて、第X I 因子血漿タンパク質レベルを ELISA によって測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の第X I 因子血漿タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、GalNAc 共役体を欠く親（ISIS 404071）よりも強力であり、より長い作用持続時間を有したことを示す。さらに、5'-GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド（ISIS 663086、678347、678348、及び 678349）は、3'-GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド（ISIS 656173）よりもさらに強力であり、さらに長い作用持続時間を有した。

【1092】

10

20

30

40

50

【表 67】

表 79

マウスにおける第X I 因子血漿タンパク質レベル

I S I S 番号	用量(mg ／k g)	タイムポイント (投与後の日数)	第X I 因子 (% ベー スライン)	G a l N A c ₃ ク ラスター	CM	配列番号
P B S	該当なし	3	1 2 3	該当なし	該当なし	該当なし
		1 0	5 6			
		1 7	1 0 0			
4 0 4 0 7 1	3 0	3	1 1	該当なし	該当なし	2 2 5 9
		1 0	4 7			
		1 7	5 2			
6 5 6 1 7 3	6	3	1	G a l N A c ₃ - 1	A _d	2 2 6 0
		1 0	3	a		
		1 7	2 1			
6 6 3 0 8 6	6	3	1	G a l N A c ₃ - 3	A _d	2 2 6 8
		1 0	2	a		
		1 7	9			
6 7 8 3 4 7	6	3	1	G a l N A c ₃ - 7	A _d	2 2 6 8
		1 0	1	a		
		1 7	8			
6 7 8 3 4 8	6	3	1	G a l N A c ₃ - 1	A _d	2 2 6 8
		1 0	1	0 a		
		1 7	6			
6 7 8 3 4 9	6	3	1	G a l N A c ₃ - 1	A _d	2 2 6 8
		1 0	1	3 a		
		1 7	5			

【1093】

実施例 85 : G a l N A c₃ 共役体を含む、S R B - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

表 76 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける S R B - 1 のアンチセンス阻害について試験した。

【1094】

処理

6 ～ 8 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスのそれぞれに、表 76 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で週 1 回、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 48 時間後にマウスを殺して、リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、S R B - 1 m R N A レベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水 (対照) に対して正規化された各処理群の肝臓における S R B - 1 m R N A レベルの平均パーセントとして提示される。

【1095】

表 80 及び 81 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で S R B - 1 m R N A レベルを低下させた。

【1096】

10

20

30

40

50

【表 6 8】

表 8 0

肝臓におけるSRB-1 mRNA

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100	該当なし	該当なし
655861	0.1	94	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0.1	120	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0.1	107	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0.1	120	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0.1	118	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0.1	119	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	96		
	1	65		
	3	23		

表 8 1

肝臓におけるSRB-1 mRNA

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
661161	0.1	107	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0.1	110	GalNAc ₃ -19a	A _d
	0.3	88		
	1	52		
	3	25		

【1097】

標準のプロトコルを用いて、肝臓トランスアミナーゼレベル、総ビリルビン、BUN、及び体重も測定した。各処理群の平均値が以下の表 8 2 に示される。

【1098】

10

20

30

40

50

【表 6 9】

表 8 2

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ビリルビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	体重 (%) ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	19	39	0.17	26	118	該当なし	該当なし
655861	0.1	25	47	0.17	27	114	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	29	56	0.15	27	118		
	1	20	32	0.14	24	112		
	3	27	54	0.14	24	115		
661161	0.1	35	83	0.13	24	113	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	42	61	0.15	23	117		
	1	34	60	0.18	22	116		
	3	29	52	0.13	25	117		
666881	0.1	30	51	0.15	23	118	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	49	82	0.16	25	119		
666981	1	23	45	0.14	24	117	GalNAc ₃ -7a	A _d
	3	20	38	0.15	21	112		
	0.1	21	41	0.14	22	113		
	0.3	29	49	0.16	24	112		
	1	19	34	0.15	22	111		
	3	77	78	0.18	25	115		
670061	0.1	20	63	0.18	24	111	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	20	57	0.15	21	115		
	1	20	35	0.14	20	115		
	3	27	42	0.12	20	116		
677842	0.1	20	38	0.17	24	114	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	31	46	0.17	21	117		
	1	22	34	0.15	21	119		
	3	41	57	0.14	23	118		

【1099】

実施例 86 : GalNAc₃クラスターを含む、TTRを標的とするオリゴヌクレオチドの生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表 8 3 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてヒト TTR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるヒトトランスサイレチン (TTR) のアンチセンス阻害について試験した。

【1100】

処理

8 週齢の TTR トランスジェニックマウスのそれぞれに、以下の表に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量または PBS を、週 1 回 3 週間、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 72 時間後にマウスを殺した。この実験を通してさまざまな時点で尾採血を実行し、血漿 TTR タンパク質、ALT、及び AST レベルを測定し、表 8 5 ~ 8 7 に報告した。動物を殺した後、血漿 ALT、AST、及びヒト TTR レベルを測定し、体重、臓器重量、及び肝臓におけるヒト TTR mRNA レベルも測定した。臨床分析器 (AU480、Beckman Coulter, CA) を用いて、TTR タンパク質レベルを測定した。標準のプロトコルに従ってリアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓におけるヒト TTR mRNA レベルを決定した。表 8 4 ~ 8 7 に提示される結果は、各処理群の平均値である。mRNA レベルは、PBS 群の平均と比較した平均値である。血漿タンパク質レベルは、ベースラインでの PBS 群の平均値と比較した平均値である。体重は、個々の処理群それぞれを殺するまでのベースラインからの平均体重変化率である。示される臓器重量は、動物の体重に対して正規化されており、各処理群の平均正規化臓器重量は、PBS 群

の平均正規化臓器重量との比較で提示される。

【1101】

表84～87において、「BL」は、第1の投与の直前に測定したベースラインを示す。表84及び85に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でTTR発現レベルを低下させた。GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を欠く親（ISIS 420915）よりも強力であった。さらに、GalNAc共役体及び混成PS/POヌクレオシド間連結部を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体及び完全PS連結部を含むオリゴヌクレオチドよりもさらに強力であった。

【1102】

【表70】

表83

ヒトTTRを標的とするオリゴヌクレオチド

Isis番号	配列5'～3'	結合	GalNAc クラスター	CM	配列 番号
420915	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS	n/a	n/a	2269
660261	$T_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es} G_{ds} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo} A_{do} \text{---GalNAc}_3\text{---I}_a$	PS	GalNAc ₃ -1a	A _d	2270
682883	$\text{GalNAc}_3\text{---3}_{a-o} T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	2269
682884	$\text{GalNAc}_3\text{---7}_{a-o} T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds}$ $T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	PO	2269
682885	$\text{GalNAc}_3\text{---10}_{a-o} T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	PO	2269
682886	$\text{GalNAc}_3\text{---13}_{a-o} T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}$ $A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_e$	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	PO	2269
684057	$T_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo} G_{eo} G_{ds} T_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds} A_{ds}$ $A_{eo} T_{eo}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{eo} A_{do} \text{---GalNAc}_3\text{---19}_a$	PS/PO	GalNAc ₃ -19a	A _d	2270

表85の説明文を実施例74で見つけることができる。GalNAc₃-1の構造は、実施例9に示される。GalNAc₃-3aの構造は、実施例39に示される。GalNAc₃-7aの構造は、実施例48に示される。GalNAc₃-10aの構造は、実施例46に示される。GalNAc₃-13aの構造は、実施例62に示される。GalNAc₃-19aの構造は、実施例70に示される。

【1103】

【表71】

表84

生体内におけるヒトTTRのアンチセンス阻害

Isis番号	用量 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	血漿TTR タ ンパク質 (% PBS)	GalNAc クラスター	CM	配列 番号
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし	
420915	6	99	95	該当なし	該当 なし	2269
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	GalNAc ₃ -1a	A _d	2270
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

【1104】

【表 7 2】

表 8 5

生体内におけるヒト TTR のアンチセンス阻害

I S I S 番号	用 量 (mg / k g)	T T R m R N A (% P B S)	血漿 TTR タンパク質 (BL における P B S %)				G a l N A c ク ラ ス ター	C M	配 列 番 号
			B L	D a y 3	D a y 1 0	D a y 1 7 (A f t e r s a c)			
P B S	該 当 な し	1 0 0	1 0 0	9 6	9 0	1 1 4	該 当 な し	該 当 な し	
4 2 0 9 1 5	6	7 4	1 0 6	8 6	7 6	8 3	該 当 な し	該 当 な し	2
	2 0	4 3	1 0 2	6 6	6 1	5 8			2
	6 0	2 4	9 2	4 3	2 9	3 2			6 9
6 8 2 8 8 3	0. 6	6 0	8 8	7 3	6 3	6 8	G a l N A c 3 - 3 a	P O	2
	2	1 8	7 5	3 8	2 3	2 3			2
	6	1 0	8 0	3 5	1 1	9			6 9
6 8 2 8 8 4	0. 6	5 6	8 8	7 8	6 3	6 7	G a l N A c 3 - 7 a	P O	2
	2	1 9	7 6	4 4	2 5	2 3			2
	6	1 5	8 2	3 5	2 1	2 4			6 9
6 8 2 8 8 5	0. 6	6 0	9 2	7 7	6 8	7 6	G a l N A c 3 - 1 0 a	P O	2
	2	2 2	9 3	5 8	3 2	3 2			2
	6	1 7	8 5	3 7	2 5	2 0			6 9
6 8 2 8 8 6	0. 6	5 7	9 1	7 0	6 4	6 9	G a l N A c 3 - 1 3 a	P O	2
	2	2 1	8 9	5 0	3 1	3 0			2
	6	1 8	1 0 2	4 1	2 4	2 7			6 9
6 8 4 0 5 7	0. 6	5 3	8 0	6 9	5 6	6 2	G a l N A c 3 - 1 9 a	A _d	2
	2	2 1	9 2	5 5	3 4	3 0			2
	6	1 1	8 2	5 0	1 8	1 3			7 0

【1 1 0 5】

10

20

30

40

50

【表 7 3】

表 8 6

トランスアミナーゼレベル、体重変化、及び相対臓器重量

Isis番号	用量 (mg/kg)	ALT (U/L)				AST (U/L)				体重 (% BL)	腎臓 (% PBS)	脾臓 (% PBS)	腎臓 y (% PBS)	配列 番号
		BL	3 日目	10 日目	17 日目	BL	3 日目	10 日目	17 日目					
PBS	n/a	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	該当なし
420915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	2269
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	2270
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

10

【1 1 0 6】

20

30

40

50

【表 7 4 - 1】

表 8 7

トランスアミナーゼレベル、体重変化、及び相対臓器重量

I S S 番 号	用 量 (m g / k g)	A L T (U/L)				A S T (U/L)				体 重 (% B L)	肝 臓 (% P B S)	脾 臓 (% P B S)	腎 臓 (% P B S)	配 列 番 号
		B L	3 日 目	1 0 日 目	1 7 日 目	B L	3 日 目	1 0 日 目	1 7 日 目					
P B S	該 当 な し	3 2	3 4	3 7	4 1	6 2	7 8	7 6	7 7	1 0 4	1 0 0	1 0 0	1 0 0	該 当 な し
4 2 0 9 1 5	6	3 2	3 0	3 4	3 4	6 1	7 1	7 2	6 6	1 0 2	1 0 3	1 0 2	1 0 5	2 6 9
	2	4 1	3 4	3 7	3 3	8 0	7 6	6 3	5 4	1 0 6	1 0 7	1 3 5	1 0 1	
	6	3 6	3 0	3 2	3 4	5 8	8 1	5 7	6 0	1 0 6	1 0 5	1 0 4	9 9	
6 8 2 8 3	0. 6	3 2	3 5	3 8	4 0	5 3	8 1	7 4	7 6	1 0 4	1 0 1	1 1 2	9 5	2 2 6 9
	2	3 8	3 9	4 2	4 3	7 1	8 4	7 0	7 7	1 0 7	9 8	1 1 6	9 9	
	6	3 5	3 5	4 1	3 8	6 2	7 9	1 0 3	6 5	1 0 5	1 0 3	1 4 3	9 7	
6 8 2 8 4	0. 6	3 3	3 2	3 5	3 4	7 0	7 4	7 5	6 7	1 0 1	1 0 0	1 3 0	9 9	2 2 6 9
	2	3 1	3 2	3 8	3 8	6 3	7 7	6 6	5 5	1 0 4	1 0 3	1 2 2	1 0 0	
	6	3 8	3 2	3 6	3 4	6 5	8 5	8 0	6 2	9 9	1 0 5	1 2 9	9 5	
6 8 2 8 5	0. 6	3 9	2 6	3 7	3 5	6 3	6 3	7 7	5 9	1 0 0	1 0 9	1 0 9	1 1 2	2 2 6 9
	2	3 0	2 6	3 8	4 0	5 4	5 6	7 1	7 2	1 0 2	9 8	1 1 1	1 0 2	
	6	2 7	2 7	3 4	3 5	4 6	5 2	5 6	6 4	1 0 2	9 8	1 1 3	9 6	

【1 1 0 7】

10

20

30

40

50

【表 7 4 - 2】

6	0	3	4	3	3	5	8	5	6	1 0	9 9	1 2	1 0	2 2 6 9
8	6	0	0	4	6	8	7	4	1	4		0	1	
2	2	2	2	3	3	5	5	5	6	1 0	9 1	1 0	9 2	
8		7	6	4	6	1	5	5	9	3		5		2 2 6 9
8	6	4	2	3	3	1	5	6	6	1 0	1 0	1 0	9 9	
6		0	8	4	7	0	4	1	9	9	0	2		
6	0	3	2	3	3	5	5	5	6	1 0	9 9	1 1	1 0	2 2 7 0
8	6	5	6	3	9	6	1	1	9	4		0	2	
4	2	3	3	3	4	5	5	5	8	1 0	1 0	1 1	9 7	
0		3	2	1	0	4	7	6	7	3	0	2		2 2 7 0
5	6	3	3	3	4	6	5	5	9	9 8	1 0	1 2	1 0	
7		9	3	5	0	7	2	5	2		4	1	8	

10

【1 1 0 8】

実施例 8 7 : G a l N A c 3 クラスターを含む T T R を標的とするオリゴヌクレオチドの単回投与による生体内における作用持続時間

20

I S I S 番号 4 2 0 9 1 5 及び 6 6 0 2 6 1 (表 8 3 を参照のこと) を、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。I S I S 番号 4 2 0 9 1 5、6 8 2 8 8 3、及び 6 8 2 8 8 5 (表 8 3 を参照のこと) も、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1 1 0 9】

処理

ヒト T T R を発現する 8 週齢の雄トランスジェニックマウスのそれぞれに、1 0 0 m g / k g の I S I S 番号 4 2 0 9 1 5 または 1 3 . 5 m g / k g の I S I S 番号 6 6 0 2 6 1 を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬前に尾採血を実行して、ベースライン、ならびに投与後 3、7、1 0、1 7、2 4、及び 3 9 日目のレベルを決定した。実施例 8 6 に記載されるように、血漿 T T R タンパク質レベルを測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の血漿 T T R レベルの平均パーセントとして提示される。

30

【1 1 1 0】

40

50

【表 7 5】

表 8 8

血漿 T T R タンパク質レベル

I S I S 番号	用 量 (m g ／ k g)	タイムポイン ト (投与後の 日数)	T T R (％ ベー スライン)	G a l N A c ₃ ク ラスター	CM	配 列 番号
4 2 0 9 1 5	1 0 0	3	3 0	該当なし	該当なし	2 2 6 9
		7	2 3			
		1 0	3 5			
		1 7	5 3			
		2 4	7 5			
		3 9	1 0 0			
6 6 0 2 6 1	1 3 . 5	3	2 7	G a l N A c ₃ -1 a	A _d	2 2 7 0
		7	2 1			
		1 0	2 2			
		1 7	3 6			
		2 4	4 8			
		3 9	6 9			

10

20

【1 1 1 1】

処理

ヒト T T R を発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、1 0 0 m g ／ k g の I S I S 番号 4 2 0 9 1 5、1 0 . 0 m g ／ k g の I S I S 番号 6 8 2 8 8 3、または 1 0 . 0 m g ／ k g の 6 8 2 8 8 5 を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬前に尾採血を実行して、ベースライン、ならびに投与後 3、7、1 0、1 7、2 4、及び 3 9 日目のレベルを決定した。実施例 8 6 に記載されるように、血漿 T T R タンパク質レベルを測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の血漿 T T R レベルの平均パーセントとして提示される。

30

【1 1 1 2】

40

50

【表 76】

表 89

血漿TTRタンパク質レベル

ISIS番号	用量 (mg / kg)	タイムポイント (投与後の日数)	TTR (%) ベースライン	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
420915	100	3	48	該当なし	該当なし	2269
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10.0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	2269
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10.0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	2269
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

表 88 及び 89 における結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠く親オリゴヌクレオチド (ISIS 420915) よりも強力であり、より長い作用持続時間を有することを示す。

【1113】

実施例 88 : GalNAc₃ 共役体を含む SMN を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるスプライシング調節

表 90 に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおけるヒト運動ニューロン生存 (SMN) のスプライシング調節について試験した。

【1114】

10

20

30

40

50

【表 77】

表 90

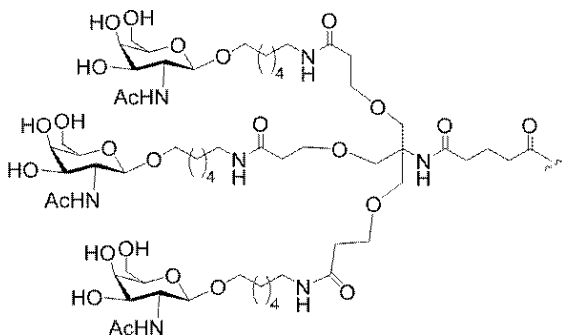
SMNを標的とする修飾ASO

ISIS S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラ スター	CM	配列 番号
387 954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	該当なし	該当 なし	22 71
699 819	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 71
699 821	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·A _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 71
700 000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} ·-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	22 72
703 421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTG G	該当なし	該当 なし	22 71
703 422	GalNAc ₃ -7 _b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7 _b	該当 なし	22 71

GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示した。「X」は、Gene Tools (Philomath, OR) によって生成された5'一次アミンを示し、GalNAc₃-7_bは、以下に示すように、リンカーの-NH-C₆-O部分を欠くGalNAc₃-7_aの構造を示す。

【1115】

【化239】



ISIS番号703421及び703422は、モルホリノオリゴヌクレオチドであり、これら2つのオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドは、モルホリノヌクレオチドである。

【1116】

処理

ヒトSMNを発現する6週齢のトランスジェニックマウスに、表91に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を1回皮下注入した。各処理群は、2匹の雄及び2匹の雌からなった。投与の3日後にマウスを殺して、標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCRを用いて、エクソン7を有する場合とエクソン7を有しない場合の肝臓におけるヒトSMN mRNAレベルを決定した。Ribogreen試薬を用いて総RNAを測

定した。SMN mRNAレベルを総mRNAに対して正規化し、さらに生理食塩水処理群の平均に対して正規化した。結果として生じたエクソン7を含むSMN mRNAとエクソン7を欠くSMN mRNAとの平均比が、表91に示される。結果は、スプライシングを調節し、かつGalNAc共役体を含む完全修飾オリゴヌクレオチドが、GalNAc共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも肝臓におけるスプライシングの改変に著しく強力であることを示す。さらに、この傾向は、2'-MOE及びモルホリノ修飾オリゴヌクレオチドを含む複数の修飾化学でも維持される。

【1117】

【表78】

表91

生体内におけるヒトSMNを標的とするオリゴヌクレオチドの影響

ISI S番号	用量 (mg/kg)	+ エクソン 7 / -エ クソン 7	GalNAc ₃ ク ラスター	CM	配列番 号
生理食 塩水	該当なし	1.00	該当なし	該当なし	該当なし
387 954	32	1.65	該当なし	該当なし	227 1
387 954	288	5.00	該当なし	該当なし	227 1
699 819	32	7.84	GalNAc ₃ -7 a	PO	227 1
699 821	32	7.22	GalNAc ₃ -7 a	PO	227 1
700 000	32	6.91	GalNAc ₃ -1 a	A _d	227 2
703 421	32	1.27	該当なし	該当なし	227 1
703 422	32	4.12	GalNAc ₃ -7 b	該当なし	227 1

【1118】

実施例89：GalNAc₃共役体を含むアポリポタンパク質A（Apo（a））を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表92に列記されるオリゴヌクレオチドを、トランスジェニックマウスにおけるApo（a）の用量依存的阻害に関する試験で試験した。

【1119】

【表 79】

表 92

Apo (a) を標的とする修飾ASO

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラス ター	CM	配列 番号
494 372	T _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _d sG _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} G _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	該当なし	該当 なし	22 81
681 257	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _e o ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 81

GalNAc₃-7_aの構造は、実施例48に示される。

【1120】

処理

8週齢の雌C57BL/6マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) のそれぞれに、表92に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを、以下に示される投与量で週1回、合計6回の投与で、皮下注入した。各処理群は、3～4匹の動物からなった。第1の投与の前日に、かつ各投与後週1回、尾採血を実行して、血漿Apo (a) タンパク質レベルを決定した。最終投与の2日後にマウスを殺した。リアルタイムPCR及びRIBOGREEN (登録商標) RNA定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓におけるApo (a) mRNAレベルを決定した。ELISAを用いてApo (a) 血漿タンパク質レベルを決定し、肝臓トランスアミナーゼレベルを決定した。表93におけるmRNA及び血漿タンパク質の結果は、PBS処理群と比較した処理群の平均パーセントとして提示される。血漿タンパク質レベルをさらにPBS群のベースライン (BL) 値に対して正規化した。平均絶対トランスアミナーゼレベル及び体重 (ベースライン平均と比較した%) が表94に報告される。

【1121】

表93に例証されるように、オリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓におけるApo (a) mRNA及び血漿タンパク質レベルを低下させた。さらに、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であり、より長い作用持続時間を有した。表94に例証されるように、トランスアミナーゼレベル及び体重はオリゴヌクレオチドの影響を受けず、オリゴヌクレオチドが良好な耐容性を示したことを示す。

【1122】

10

20

30

40

50

【表 8 0】

表 9 3

肝臓におけるA p o (a) mRNA及び血漿タンパク質レベル

I S I S 番号	投与量 (m g /k g)	A p o (a) mR NA (%P BS)	A p o (a) 血漿タンパク質 (%PBS)						
			B L	1 週 目	2 週 目	3 週 目	4 週 目	5 週 目	6 週 目
PBS	該当なし	1 0 0	1 0 0	1 2 0	1 1 9	1 1 3	8 8	1 2 1	9 7
4 9 4 3 7 2	3	8 0	8 4	8 9	9 1	9 8	8 7	8 7	7 9
	1 0	3 0	8 7	7 2	7 6	7 1	5 7	5 9	4 6
	3 0	5	9 2	5 4	2 8	1 0	7	9	7
6 8 1 2 5 7	0. 3	7 5	7 9	7 6	8 9	9 8	7 1	9 4	7 8
	1	1 9	7 9	8 8	6 6	6 0	5 4	3 2	2 4
	3	2	8 2	5 2	1 7	7	4	6	5
	1 0	2	7 9	1 7	6	3	2	4	5

10

20

【1 1 2 3】

【表 8 1】

表 9 4

I S I S 番号	投与量 (m g / k g)	ALT (U /L)	AST (U / L)	体重 (%ベースライン)
PBS	該当なし	3 7	5 4	1 0 3
4 9 4 3 7 2	3	2 8	6 8	1 0 6
	1 0	2 2	5 5	1 0 2
	3 0	1 9	4 8	1 0 3
6 8 1 2 5 7	0. 3	3 0	8 0	1 0 4
	1	2 6	4 7	1 0 5
	3	2 9	6 2	1 0 2
	1 0	2 1	5 2	1 0 7

30

40

【1 1 2 4】

実施例 9 0 : G a l N A c 3 クラスターを含むT T Rを標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表 9 5 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてヒトT T R遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるヒトトランスサイレチン (T T R) のアンチセンス阻害について試験した。

【1 1 2 5】

50

処理

TTRトランスジェニックマウスのそれぞれに、表96に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量またはPBSを、週1回3週間、合計3回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。第1の投与の前に、尾採血を実行して、ベースライン(BL)での血漿TTRタンパク質レベルを決定した。最終投与の72時間後にマウスを殺した。臨床分析器(AU480、Beckman Coulter, CA)を用いて、TTRタンパク質レベルを測定した。標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるヒトTTR mRNAレベルを決定した。表96に提示される結果は、各処理群の平均値である。mRNAレベルは、PBS群の平均と比較した平均値である。血漿タンパク質レベルは、ベースラインでのPBS群の平均値と比較した平均値である。「BL」は、第1の投与の直前に測定したベースラインを示す。表96に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でTTR発現レベルを低下させた。GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を欠く親(ISIS 420915)よりも強力であり、ホスホジエステルまたはデオキシアデノシンの切断可能部分を含むオリゴヌクレオチドは、共役体を欠く親と比較して、力価の著しい改善を示した(ISIS番号682883及び666943対420915、ならびに実施例86及び87を参照のこと)。

【1126】

10

20

30

40

50

【表 8 2】

表 9 5

ヒト TTR を標的とするオリゴヌクレオチド

ISI S 番号	配列 5' ~ 3'	結合	G a l N A c クラ スター	CM	配列番 号
4 2 0 9 1 5	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _e s ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	P S	該当なし	該当 なし	2 2 6 9
6 8 2 8 8 3	G a l N A c ₃ -3 _{a-o} ·T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} s _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	P S / P O	G a l N A c ₃ -3 a	P O	2 2 6 9
6 6 6 9 4 3	G a l N A c ₃ -3 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} s _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _e s ^m C _e	P S / P O	G a l N A c ₃ -3 a	A _d	2 2 7 3
6 8 2 8 8 7	G a l N A c ₃ -7 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} s _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} s ^m C _e	P S / P O	G a l N A c ₃ -7 a	A _d	2 2 7 3
6 8 2 8 8 8	G a l N A c ₃ -10 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	P S / P O	G a l N A c ₃ -1 0 a	A _d	2 2 7 3
6 8 2 8 8 9	G a l N A c ₃ -13 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	P S / P O	G a l N A c ₃ -1 3 a	A _d	2 2 7 3

表 9 5 の説明文を実施例 7 4 で見つけることができる。G a l N A c₃-3_aの構造は、実施例 3 9 に示される。G a l N A c₃-7_aの構造は、実施例 4 8 に示される。G a l N A c₃-10_aの構造は、実施例 4 6 に示される。G a l N A c₃-13_aの構造は、実施例 6 2 に示される。

【1 1 2 7】

10

20

30

40

50

【表 8 3】

表 9 6
生体内におけるヒト TTR のアンチセンス阻害

Isis番号	投与量 (mg/kg)	TTR mRNA (% PBS)	TTRタンパク質 (% B L)	G a l N A c クラスター	CM
PBS	該当なし	100	124	該当なし	該当なし
420915	6	69	114	該当なし	該当なし
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0.6	61	73	GalNAc ₃ -3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0.6	74	93	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0.6	60	97	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0.6	65	92	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0.6	72	74	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

【1 1 2 8】

実施例 9 1：非ヒト霊長類における G a l N A c₃ 共役体を含む第 V I I 因子を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表 9 7 に列記されるオリゴヌクレオチドを、非終末用量増加試験 (non-terminal, dose escalation study) においてサルにおける第 V I I 因子のアンチセンス阻害について試験した。

【1 1 2 9】

処理

処置した (non-naive) サルのそれぞれに、増加用量の表 9 7 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を、0、15、及び 29 日目に皮下注入した。各処理群は、4 匹の雄及び 1 匹の雌からなった。第 1 の投与の前とその後のさまざまな時点で、血液採取を実行して、血漿第 V I I 因子タンパク質レベルを決定した。E L I S A によって第 V I I 因子タンパク質レベルを測定した。表 9 8 に提示される結果は、第 1 の投与の直前に測定したベースライン (B L) での P B S 群の平均値と比較した各処理群の平均値である。表 9 8 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で第 V I I 因子の発現レベルを低下させ、G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチドは、サルにおいて G a l N A c 共役体を欠くオリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【1 1 3 0】

10

20

30

40

50

【表 8 4】

表 9 7

第 V I I 因子を標的とするオリゴヌクレオチド

I S I S 番号	配列 5' ~ 3'	結合	G a l N A c クラスター	C M	配 列 番号
4 0 7 9 3 5	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	P S	該当なし	該当なし	2 2 7 4
6 8 6 8 9 2	G a l N A c ₃ -1 0 _{a-o} · A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	P S	G a l N A c ₃ -1 0 _a	P O	2 2 7 4

10

表 9 7 の説明文を実施例 7 4 で見つけることができる。G a l N A c₃-1 0_aの構造は、実施例 4 6 に示される。

【1 1 3 1】

【表 8 5】

表 9 8

第 V I I 因子血漿タンパク質レベル

I S I S 番号	日数	用量 (mg / k g)	第 V I I 因子 (% B L)
4 0 7 9 3 5	0	該当なし	1 0 0
	1 5	1 0	8 7
	2 2	該当なし	9 2
	2 9	3 0	7 7
	3 6	該当なし	4 6
	4 3	該当なし	4 3
6 8 6 8 9 2	0	3	1 0 0
	1 5	1 0	5 6
	2 2	該当なし	2 9
	2 9	3 0	1 9
	3 6	該当なし	1 5
	4 3	該当なし	1 1

30

【1 1 3 2】

実施例 9 2 : G a l N A c₃共役体を含む A p o - C I I I を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによる初代肝細胞におけるアンチセンス阻害

初代マウス肝細胞を 1 5 , 0 0 0 細胞 / ウェルで 9 6 ウェルプレートに播種し、マウス A p o C - I I I を標的とする表 9 9 に列記されるオリゴヌクレオチドを、0 . 4 6 、 1 . 3 7 、 4 . 1 2 、または 1 2 . 3 5 、 3 7 . 0 4 、 1 1 1 . 1 1 、もしくは 3 3 3 . 3 3 n M または 1 . 0 0 μ m で添加した。オリゴヌクレオチドとともに 2 4 時間インキュベートした後、細胞を溶解し、R N e a s y (Q i a g e n) を用いて全 R N A を精製した。標準のプロトコルに従ってリアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c .) を用いて、A p o C - I I I m R N A レベルを決定した。P r i s m 4 ソフトウェア (G r a p h P a d) を

50

用いて、IC₅₀値を決定した。結果は、切断可能部分がホスホジエステルであるかホスホジエステル連結デオキシアデノシンであるかにかかわらず、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。

【1133】

【表86】

表99

マウス初代肝細胞におけるマウスAPOC-III発現の阻害

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	CM	IC ₅₀ (nM)	配列 番号
440 670	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	該当 なし	13. 20	22 75
661 180	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} ・-GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1.4 0	22 76
680 771	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ・ ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	0.7 0	22 75
680 772	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ・ ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.7 0	22 75
680 773	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ・ ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _d sT _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _e sG _{es} ^m C _{es} A _e	PO	2.0 0	22 75
680 774	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ・ ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _d sT _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _e sG _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.5 0	22 75
681 272	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ・ ^m C _{es} A _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{eo} A _{eo} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	< 0.4 6	22 75
681 273	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ・A _{do} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	A _d	1.1 0	22 77
683 733	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} ・-GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2.5 0	22 76

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示され、GalNAc₃-19_aは、実施例70に示される。

【1134】

実施例93：混成ウイング及び5'-GalNAc共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

表100に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける

SRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

【1135】

【表87】

表100

SRB-1を標的とする修飾ASO

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラス ター	CM	配列 番号
449 093	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	該当なし	該当 なし	22 78
699 806	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _k _s ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	22 78
699 807	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _k _s ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 78
699 809	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _d _s T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 78
699 811	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _k _s ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 78
699 813	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{ks} T _{ds} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _k _s ^m C _{ds} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 78
699 815	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ ·T _{es} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _k _s ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 78

GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示され、GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示される。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、β-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₃二環式ヌクレオシド(cEt)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。

【1136】

処理

6~8週齢のC57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、表100に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺した。リアルタイムPCRを用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを測定した。標準のプロトコルに従って、SRB-1 mRNAレベルをシクロフィリンmRNAレベルに対して正規化した。結果は、生理食塩水対照群と比較した各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。表101に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させ、GalNAc共役体を含み、かつ完全cEtまたは混成糖修飾のいずれかのウイングを有するギャップマーオリゴヌクレオチド

は、共役体を欠き、かつ完全c E t修飾ウイングを含む親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【1137】

体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及びBUNも測定し、各処理群の平均値が表101に示される。体重は、オリゴヌクレオチド投与の直前に測定したベースライン体重(%BL)と比較した平均体重率として示される。

【1138】

【表88-1】

表101

SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN、及び総ビリルビンレベル、ならびに体重

I S I S番号	投与量 (mg/ kg)	SRB-1 mRNA (%) PBS)	ALT(U /L)	AST(U /L)	Bi l	BUN	体重(%B L)
PBS	該当なし	100	31	84	0.1 5	28	102
449 093	1	111	18	48	0.1 7	31	104
	3	94	20	43	0.1 5	26	103
	10	36	19	50	0.1 2	29	104
699 806	0.1	114	23	58	0.1 3	26	107
	0.3	59	21	45	0.1 2	27	108
	1	25	30	61	0.1 2	30	104
699 807	0.1	121	19	41	0.1 4	25	100
	0.3	73	23	56	0.1 3	26	105
	1	24	22	69	0.1 4	25	102
699 809	0.1	125	23	57	0.1 4	26	104
	0.3	70	20	49	0.1 0	25	105
	1	33	34	62	0.1 7	25	107
699 811	0.1	123	48	77	0.1 4	24	106
	0.3	94	20	45	0.1 3	25	101
	1	66	57	104	0.1 4	24	107

【1139】

【表 88-2】

699 813	0.1	95	20	58	0.1 3	28	104
	0.3	98	22	61	0.1 7	28	105
	1	49	19	47	0.1 1	27	106
699 815	0.1	93	30	79	0.1 7	25	105
	0.3	64	30	61	0.1 2	26	105
	1	24	18	41	0.1 4	25	106

10

【1140】

実施例94：2'-糖修飾及び5'-GalNAc共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

表102に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

20

【1141】

【表 89】

表102

SRB-1を標的とする修飾ASO

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc ₃ クラ スター	CM	配列 番号
353 382	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _d sT _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	該当なし	該当 なし	22 56
700 989	G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} U _{ms} C _{ms} C _{ms} U _{ms} U _m	該当なし	該当 なし	22 79
666 904	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e sA _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _d dsT _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3 _a	PO	22 56
700 991	GalNAc ₃ -7 _a -o ₁ G _{ms} C _{ms} U _{ms} U _{ms} C _{ms} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _d sU _{ms} C _{ms} C _{ms} U _{ms} U _m	GalNAc ₃ -7 _a	PO	22 79

40

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを示す。完全な表の説明文については、実施例74を参照されたい。GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示し、GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示した。

【1142】

処理

実施例93に記載されるプロトコルを用いて試験を完了した。結果が以下の表103に示され、GalNAc共役体を含む2'-MOE修飾オリゴヌクレオチドと2'-OMe修飾オリゴヌクレオチドとが両方ともに、共役体を欠くそれぞれの親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及びBUNの測定結果は、これらの化合物がすべて良好な耐容性を示したことを示す。

50

【1143】

【表90】

表103

SRB-1 mRNA

ISIS 番号	投与量(mg/k g)	SRB-1 mRNA (%PBS)
PBS	該当なし	100
3533 82	5	116
	15	58
	45	27
7009 89	5	120
	15	92
	45	46
6669 04	1	98
	3	45
	10	17
7009 91	1	118
	3	63
	10	14

10

20

【1144】

実施例95：二環式ヌクレオシド及び5'-GalNAc共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

表104に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

【1145】

30

40

50

【表 9 1】

表 1 0 4

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc 3 クラス ター	CM	配 列 番号
4 4 0 7 6 2	$T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_d$ $s^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_k$	該当なし	該当 なし	2 2 5 0
6 6 6 9 0 5	$GalNAc_3-3_a-o, T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_d$ $s^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_k$	GalNAc ₃ -3 _a	PO	2 2 5 0
6 9 9 7 8 2	$GalNAc_3-7_a-o, T_{ks}^m C_{ks} A_{ds} G_{ds} T_d$ $s^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ks}^m C_k$	GalNAc ₃ -7 _a	PO	2 2 5 0
6 9 9 7 8 3	$GalNAc_3-3_a-o, T_{ls}^m C_{ls} A_{ds} G_{ds} T_d$ $s^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{ls}^m C_l$	GalNAc ₃ -3 _a	PO	2 2 5 0
6 5 3 6 2 1	$T_{ls}^m C_{ls} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_d$ $s^m C_{ds} T_{ds} T_{ls}^m C_{lo} A_{do}, -GalNAc_3-1_a$	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	2 2 5 1
4 3 9 8 7 9	$T_{gs}^m C_{gs} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_d G_{ds} A$ $ds^m C_{ds} T_{ds} T_{gs}^m C_g$	該当なし	該当 なし	2 2 5 0
6 9 9 7 8 9	$GalNAc_3-3_a-o, T_{gs}^m C_{gs} A_{ds} G_{ds} T_d$ $s^m C_{ds} A_{ds} T_d G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{gs}^m C_g$	GalNAc ₃ -3 _a	PO	2 2 5 0

下付き文字「g」は、フルオロ-HNAヌクレオシドを示し、下付き文字「l」は、2'-O-CH₂-4' 橋を含むロックドヌクレオシドを示す。他の省略形については、実施例 74 の表の説明文を参照されたい。GalNAc₃-1_a の構造は、先の実施例 9 に示し、GalNAc₃-3_a の構造は、先の実施例 39 に示し、GalNAc₃-7_a の構造は、先の実施例 48 に示した。

【1146】

処理

実施例 93 に記載されるプロトコルを用いて試験を完了した。結果が以下の表 1 0 5 に示され、GalNAc 共役体及びさまざまな二環式ヌクレオシド修飾を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠くが二環式ヌクレオシド修飾を含む親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。さらに、GalNAc 共役体及びフルオロ-HNA 修飾を含むオリゴヌクレオチドは、共役体を欠くがフルオロ-HNA 修飾を含む親よりも著しく強力であった。体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及び BUN の測定結果は、これらの化合物がすべて良好な耐容性であったことを示した。

【1147】

10

20

30

40

50

【表 9 2】

表 1 0 5

SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN、及び総ビリルビンレベル、ならびに体重

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA (%PBS)
PBS	該当なし	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0.1	105
	0.3	56
	1	18
699782	0.1	93
	0.3	63
	1	15
699783	0.1	105
	0.3	53
	1	12
653621	0.1	109
	0.3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0.1	82
	0.3	69
	1	26

【1148】

実施例 96 : GalNAc₃ 共役基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの血漿タンパク質結合

ApoC-III を標的とする表 70 に列記されるオリゴヌクレオチド及び Apo (a) を標的とする表 106 におけるオリゴヌクレオチドを限外濾過アッセイにおいて試験して、血漿タンパク質結合を評価した。

【1149】

【表 9 3】

表 106

Apo (a) を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc 3クラスター	C M	配列 番号
494 372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	22 81
693 401	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	22 81
681 251	GalNAc _{3-7a-o} ・T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc _{3-7a}	P O	22 81
681 257	GalNAc _{3-7a-o} ・T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc _{3-7a}	P O	22 81

表の説明文については、実施例 74 を参照されたい。GalNAc_{3-7a} の構造は、先の実施例 48 に示される。

【1150】

Ultrafree-MC 限外濾過ユニット (30,000 NMWL、低結合再生セルロース膜、Millipore, Bedford, MA) を 300 μL の 0.5% Tween 80 で事前に条件付け、2000 g で 10 分間遠心分離し、その後、H₂O 中の 300 μL の 300 μg/mL 対照オリゴヌクレオチド溶液で事前に条件付け、2000 g で 16 分間遠心分離した。これらの試験で用いる表 70 及び 106 の各試験オリゴヌクレオチドのフィルターへの非特異的結合を評価するために、300 μL の H₂O 中の 250 ng/mL 溶液オリゴヌクレオチド (pH 7.4) を事前に条件付けたフィルターに設置し、2000 g で 16 分間遠心分離した。ELISA アッセイによって濾過していない試料及び濾過した試料を分析して、オリゴヌクレオチド濃度を決定した。3つの複製物を用いて各試料の平均濃度を得た。濾過していない試料と比較した濾過した試料の平均濃度を用いて、血漿の不在下でフィルターによって回収されたオリゴヌクレオチドの割合 (% 回収) を決定する。

【1151】

薬物を使用していない健康なヒト志願者、カニクイザル、及び CD-1 マウス由来の K3-EDTA 中に収集された凍結全血漿試料を Bioreclamation LLC (Westbury, NY) から購入した。試験オリゴヌクレオチドを、2つの濃度 (5 μg/mL 及び 150 μg/mL) で血漿の 1.2 mL の一定分量に添加した。各スパイクした血漿試料の一定分量 (300 μL) を事前に条件付けられたフィルターユニット内に設置し、37 °C で 30 分間インキュベートした直後に 2000 g で 16 分間遠心分離した。ELISA によって、濾過してスパイクした血漿試料及び濾過していないスパイクした血漿試料の一定分量を分析して、各試料中のオリゴヌクレオチドの濃度を決定した。1つの濃度ごとに3つの複製物を用いて、各試料中の結合オリゴヌクレオチド及び非結合オリゴヌクレオチドの平均割合を決定した。濾過していない試料の濃度と比較した濾過した試料の平均濃度を用いて、血漿タンパク質に結合されていない血漿中のオリゴヌクレオチ

ドの割合（%非結合）を決定する。各オリゴヌクレオチドの%非結合を%回収で割ることによって、最終非結合オリゴヌクレオチド値を非特異的結合に対して補正する。最終%非結合値を100から差し引くことによって、最終%結合オリゴヌクレオチド値を決定する。各種の血漿において試験した2つの濃度のオリゴヌクレオチド（ $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $150\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の結果が表107に示される。結果は、GalNAc共役基が血漿タンパク質結合に大きな影響を与えないことを示す。さらに、完全PSヌクレオシド間連結部を有するオリゴヌクレオチドも混成PO/PS連結部を有するオリゴヌクレオチドも血漿タンパク質に結合し、完全PS連結部を有するオリゴヌクレオチドは、混合PO/PS連結部を有するオリゴヌクレオチドよりも若干高い程度に血漿タンパク質に結合する。

【1152】

【表94】

表107

血漿タンパク質に結合される修飾オリゴヌクレオチドの割合

ISI S番号	ヒト血漿		サル血漿		マウス血漿	
	$5\mu\text{g}/\text{mL}$	$150\mu\text{g}/\text{mL}$	$5\mu\text{g}/\text{mL}$	$150\mu\text{g}/\text{mL}$	$5\mu\text{g}/\text{mL}$	$150\mu\text{g}/\text{mL}$
304 801	99.2	98.0	99.8	99.5	98.1	97.2
663 083	97.8	90.9	99.3	99.3	96.5	93.0
674 450	96.2	97.0	98.6	94.4	94.6	89.3
494 372	94.1	89.3	98.9	97.5	97.2	93.6
693 401	93.6	89.9	96.7	92.0	94.6	90.2
681 251	95.4	93.9	99.1	98.2	97.8	96.1
681 257	93.4	90.5	97.6	93.7	95.6	92.7

【1153】

実施例97：GalNAc₃共役基を含むTTRを標的とする修飾オリゴヌクレオチド

GalNAc共役体を含む表108に示されるオリゴヌクレオチドを、TTRを標的とするように設計した。

【1154】

【表 95】

表 108

TTRを標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc 3 クラ スター	C M	配 列 番 号
666 941	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ·A _{do} T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} m C _{es} mC _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -3	A _d	2 2 7 3
666 942	T _{es} mC _{co} T _{eo} T _{eo} G _{co} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} mC _{es} mC _{es} mC _{co} A _{do} · -GalNAc ₃ -3 _a	Gal NAc ₃ -1	A _d	2 2 7 0
682 876	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ·T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} m C _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -3	P O	2 2 6 9
682 877	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} m C _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -7	P O	2 2 6 9
682 878	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ·T _{es} mC _{es} T _{es} T _e s G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} m C _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -10	P O	2 2 6 9
682 879	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ·T _{es} mC _{es} T _{es} T _e s G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} m C _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -13	P O	2 2 6 9
682 880	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·A _{do} T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} m C _{es} mC _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -7	A _d	2 2 7 3
682 881	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ·A _{do} T _{es} mC _{es} T _e s T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} m C _{es} mC _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -10	A _d	2 2 7 3
682 882	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ·A _{do} T _{es} mC _{es} T _e s T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} m C _{es} mC _{es} mC _e	Gal NAc ₃ -13	A _d	2 2 7 3
684 056	T _{es} mC _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} mC _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} mC _{es} mC _{es} mC _{co} A _{do} · -GalNAc ₃ -19 _a	Gal NAc ₃ -19	A _d	2 2 7 0

表 108 の説明文を実施例 74 で見つけることができる。GalNAc₃-1 の構造は、実施例 9 に示した。GalNAc₃-3_a の構造は、実施例 39 に示した。GalNAc₃-7_a の構造は、実施例 48 に示した。GalNAc₃-10_a の構造は、実施例 46 に示した。GalNAc₃-13_a の構造は、実施例 62 に示した。GalNAc₃-19_a の構造は、実施例 70 に示した。

【1155】

実施例 98：hPMB C アッセイにおける GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドの炎症誘発作用の評価

表 109 に列記されるオリゴヌクレオチドを、実施例 23 及び 24 に記載されるように

h P M B C アッセイにおいて炎症誘発作用について試験した（オリゴヌクレオチドの説明については、表 30、83、95、及び 108 を参照のこと）。I S I S 353512 は、正の対照として用いられる高レスポnderであり、他のオリゴヌクレオチドは、表 83、95、及び 108 に記載されるものである。1 人の志願ドナー由来の血液を用いて表 109 に示される結果を得た。結果は、混合 P O / P S ヌクレオシド間連結部を含むオリゴヌクレオチドが、完全 P S 連結部を有する同一のオリゴヌクレオチドと比較して、著しく低い炎症誘発応答をもたらしたことを示す。さらに、G a l N A c 共役基は、このアッセイにおいて大きく影響しなかった。

【1156】

【表 96】

表 109

ISIS 番号	E_{max}/EC_{50}	GalNAc ₃ クラスター	結合	CM
353512	3630	該当なし	PS	該当なし
420915	802	該当なし	PS	該当なし
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0.26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d
684057	1.03	GalNAc ₃ -19	PO/PS	A _d

【1157】

実施例 99：アジアロ糖タンパク質受容体に対する G a l N A c 共役体を含むオリゴヌクレオチドの結合親和性

アジアロ糖タンパク質受容体に対する表 110 に列記されるオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチドの説明については、表 76 を参照のこと）の結合親和性を、競合的受容体結合アッセイにおいて試験した。競合相手のリガンドである α 1-酸性糖タンパク質（A G P）を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5）中で 1 U ノイラミニダーゼ アガロースとともに 37℃ で 16 時間インキュベートし、シアル酸アッセイまたはサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）のいずれかで 90% を超える脱シアル化を確認した。A t s m a e t a l.（J L i p i d R e s. 1991 J a n; 32（1）：173-81 を参照のこと）の手順に従って、一塩化ヨウ素を用いて A G P をヨウ素化した。この方法において、脱シアル化 α 1-酸性糖タンパク質（d e - A G P）を、10 mM 塩化ヨウ素、N a 125 I、及び 0.25 M N a O H 中の 1 M グリシンに添加した。室温で 10 分間インキュベートした後、3 K D M W C O スピнкаラムを利用してこの混合物を 2 回濃縮することによって、125 I 標識 d e - A G P を遊離 125 I から分離した。このタンパク質を、A g i l e n t S E C - 3 カラム（7.8 × 300 mm）及び β -R A M カウンタを装備した H P L C システムにおいて標識効率及び純度について試験した。125 I 標識 d e - A G P 及び A S O を含有するさまざまな G a l N A c クラスターを利用した競合実験を以下のとおりに行なった。ヒト H e p G 2 細胞（10⁶ 細胞/mL）を、2 mL の適切な成長培地中の 6 ウェルプレートにプレーティングした。10% ウシ胎児血清（F B S）、2 mM L - グルタミン、及び 10 mM H E P E S を補充した M E M 培地を用いた。細胞を、それぞれ、5% 及び 10% C O₂ で、37℃ で 16 ~ 20 時間インキュベートした。実験前に細胞を F B S を有しない培地で洗浄した。細胞を、2% F B S を有する適切な成長培地を含有する 1 mL の競合混合物、10⁻⁸ M 125 I 標識 d e - A G P、及び 10⁻¹¹ ~ 10⁻⁵ M の範囲の濃度の A S O を含有する G a l N A c クラスターとともに、37℃ で 30 分間インキュベートした。10⁻² M G a l N A c 糖の存在下で非特異的結合を決定した。細胞を F B S を有しない培地で 2 回洗浄して、非結合 125 I 標識 d e - A G P 及び競合相手である G a l N A c A S O を除去した。1% β -メルカプトエタノールを含有する Q i a g e n の R L T 緩衝液を用いて、細胞を溶解した。10 分間の短時間凍結／解凍サイクル後に溶解物を丸底アッセイチューブに移し、 γ -カウンタでアッセイした。非特異的結合を差し引いた後に、125 I タンパク質カウ

ントを最も低いGalNAc-ASO濃度カウントの値で割った。非線形回帰アルゴリズムを用いた単一位競合結合等式に従って阻害曲線を当てはめて、結合親和性（ K_D ）を計算した。

【1158】

表110における結果を5つの異なる日に実行した実験から得た。上付き文字「a」の付いたオリゴヌクレオチドの結果は、2つの異なる日に実行した実験の平均である。結果は、5'末端にGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドがヒトHepG2細胞上のアジアロ糖タンパク質受容体に結合し、3'末端にGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドよりも1.5～16倍高い親和性を有することを示す。

【1159】

【表97】

表110

アジアロ糖タンパク質受容体結合アッセイの結果

ISIS番号	GalNAc共役体	GalNAc共役体が結合するオリゴヌクレオチド末端	K_D (nM)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3.7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7.6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6.0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7.4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11.6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60.8

【1160】

実施例100：生体内におけるApo（a）を標的とするGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

以下の表111aに列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1161】

【表98】

表111a

APO（a）を標的とする修飾ASO

ISIS番号	配列(5'～3')	GalNAc ₃ クラスター	CM	配列番号
681251	GalNAc ₃ -7 _a -o-T _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} G _{cs} T _{cs} ^m C _c	GalNAc ₃ -7a	PO	2281
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o-T _{cs} G _{cs} ^m C _{co} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{co} G _{co} T _{cs} ^m C _c	GalNAc ₃ -7a	PO	2281

GalNAc₃-7aの構造は、実施例48に示した。

【1162】

処理

ヒトApo（a）を発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、表111bに

列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量またはPBSを、週1回、合計6回の投与で、皮下注入した。各処理群は、3匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、血漿中のApo(a)タンパク質のベースラインレベル、ならびに第1の投与後72時間、1週間、及び2週間時点のレベルを決定した。第1の投与後3週間、4週間、5週間、及び6週間時点でさらに血液を採取する。ELISAを用いて血漿Apo(a)タンパク質レベルを測定した。表111bにおける結果は、ベースラインレベル(%BL)に対して正規化された各処理群の血漿Apo(a)タンパク質レベルの平均パーセントとして提示され、結果は、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドがApo(a)発現の強力な減少を示したことを示す。この強力な影響は、完全PSヌクレオシド間連結部を含むオリゴヌクレオチド及び混成PO及びPS連結部を含むオリゴヌクレオチドにおいて観察された。

10

【1163】

【表99】

表111b

Apo(a)血漿タンパク質レベル

ISIS番号	投与量(mg/kg)	72時間時点でのApo(a)(%BL)	1週間時点でのApo(a)(%BL)	3週間時点でのApo(a)(%BL)
PBS	該当なし	116	104	107
681251	0.3	97	108	93
	1.0	85	77	57
	3.0	54	49	11
	10.0	23	15	4
681257	0.3	114	138	104
	1.0	91	98	54
	3.0	69	40	6
	10.0	30	21	4

20

【1164】

実施例101：安定した部分を介して連結されたGalNAcクラスターを含むオリゴヌクレオチドによるアンチセンス阻害

表112に列記されるオリゴヌクレオチドを生体内におけるマウスAPOC-III発現の阻害について試験した。C57BL/6マウスのそれぞれに、表112に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。ISIS 440670で処理した各マウスは、2、6、20、または60mg/kgの投与を受けた。ISIS 680772または696847で処理した各マウスは、0.6、2、6、または20mg/kgを受けた。ISIS 696847のGalNAc共役基は、安定した部分（容易に切断可能なホスホジエステル含有結合の代わりにホスホロチオエート連結部）を介して連結されている。投与の72時間後に動物を殺した。リアルタイムPCRを用いて、肝臓におけるAPOC-III mRNAレベルを測定した。標準のプロトコルに従って、APOC-III mRNAレベルをシクロフィリンmRNAレベルに対して正規化した。結果は、生理食塩水対照群と比較した各処理群のAPOC-III mRNAレベルの平均パーセントとして表112に提示される。結果は、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドが、共役基を欠くオリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。さらに、切断可能部分を介してオリゴヌクレオチドに連結されたGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチド（ISIS 680772）は、安定した部分を介してオリゴヌクレオチドに連結されたGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチド（ISIS 696847）よりもさらに強力であった。

30

40

【1165】

50

【表 100】

表 112

マウスAPOC-IIIを標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列 (5' ~ 3')	CM	用量 (mg /kg)	APOC-III mRNA (% P BS)	配列 番号
44070	${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}$ ${}^mC_{es}A_{es}$	該当なし	2 6 20 60	92 86 59 37	22 75
68072	$GalNAc_3-7_{a-o}{}^mC_{es}A_{es}$ $G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}$ ${}^mC_{es}A_{es}$	PO	0.6 2 6 20	79 58 31 13	22 75
6847	$GalNAc_3-7_{a-s}{}^mC_{es}A_{es}$ $G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}$ $T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}$ ${}^mC_{es}A_{es}$	該当なし (PS)	0.6 2 6 20	83 73 40 28	22 75

GalNAc₃-7_aの構造は、実施例48に示した。

【1166】

実施例102：GalNAc共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの肝臓における分布

GalNAc共役体を含まないISIS 353382（表36を参照のこと）及びGalNAc共役体を含むISIS 655861（表36を参照のこと）の肝臓における分布を評価した。雄balb/cマウスに、ISIS 353382または655861を、表113に列記される投与量で1回、皮下注入した。2匹の動物からなった18mg/kgのISIS 655861群を除いて、各処理群は、3匹の動物からなった。投与の48時間後に動物を殺して、オリゴヌクレオチドの肝臓における分布を決定した。1細胞あたりのアンチセンスオリゴヌクレオチド分子の数を測定するために、ルテニウム（II）トリスービピリジン標識（MSD TAG、Meso Scale Discovery）を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを検出するために用いるオリゴヌクレオチドプローブに共役させた。表113に提示される結果は、1細胞あたり100万オリゴヌクレオチド分子を1単位として表した各処理群のオリゴヌクレオチドの平均濃度である。結果は、等価用量で、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドが、全肝臓及び肝細胞において、GalNAc共役体を含まないオリゴヌクレオチドよりも高い濃度で存在したことを示す。さらに、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、非実質肝臓細胞において、GalNAc共役体を含まないオリゴヌクレオチドよりも低い濃度で存在した。1細胞あたりの肝細胞及び非実質肝臓細胞におけるISIS 655861の濃度が同様であった一方で、肝臓は、約80体積%肝細胞であった。したがって、肝臓内に存在するISIS 655861オリゴヌクレオチドの大部分が肝細胞内に見られる一方で、肝臓内に存在するISIS 353382オリゴヌクレオチドの大部分は、非実質肝臓細胞内に見られた。

【1167】

10

20

30

40

50

【表 101】

表 113

I S I S 番号	投 与 量 (mg/ kg)	全肝臓中の濃度 (1 細胞あたりの分子× 10 ⁻⁶)	肝細胞中の濃度 (1 細胞あたりの分子× 10 ⁻⁶)	非実質肝臓細胞中の 濃度 (1細胞あたり の分子×10 ⁻⁶)
353 382	3	9.7	1.2	37.2
	10	17.3	4.5	34.0
	20	23.6	6.6	65.6
	30	29.1	11.7	80.0
	60	73.4	14.8	98.0
	90	89.6	18.5	119.9
655 861	0.5	2.6	2.9	3.2
	1	6.2	7.0	8.8
	3	19.1	25.1	28.5
	6	44.1	48.7	55.0
	18	76.6	82.3	77.1

10

【1168】

20

実施例 103 : GalNAc₃ 共役体を含む APOC-III を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

以下の表 114 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1169】

【表 102】

表 114

APOC-III を標的とする修飾 ASO

I S I S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc 3 クラスター	C M	配列番 号
304 801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _e sA _{es} T _e	該当なし	該 当 な し	224 8
663 084	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc 3-3 _a	A _d	226 4
679 241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _e sA _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc 3-19 _a	A _d	224 9

30

40

GalNAc₃-3_a の構造は、実施例 39 に示され、GalNAc₃-19_a は、実施例 70 に示される。

【1170】

処理

ヒト APOC-III を発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、表 114 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは PBS を 1 回皮下注入した。各処理群は、3 匹の動物からなった。投薬前に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 3、7、14

50

、21、28、35、及び42日間のレベルを決定した。実施例20に記載されるように、血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベルを測定した。表115における結果は、ベースラインレベルに対して正規化された各処理群の血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIレベルの平均パーセントとして提示される。実施例79の表71における結果と以下の表115における結果の比較は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部及びホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の両方を含むオリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のみを含む等価オリゴヌクレオチドよりも増加した作用持続時間を示したことを示す。

【1171】

【表103】

表115

トランスジェニックマウスにおける血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与 後の日数)	トリグリセリド (%ベースライ ン)	APOC-III タンパク質(% ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM
PBS	該当なし	3	96	101	該当なし	該当なし
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	該当なし	該当なし
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
		42	82	92		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ -19a	A _d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

【1172】

実施例104：5'-GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1173】

10

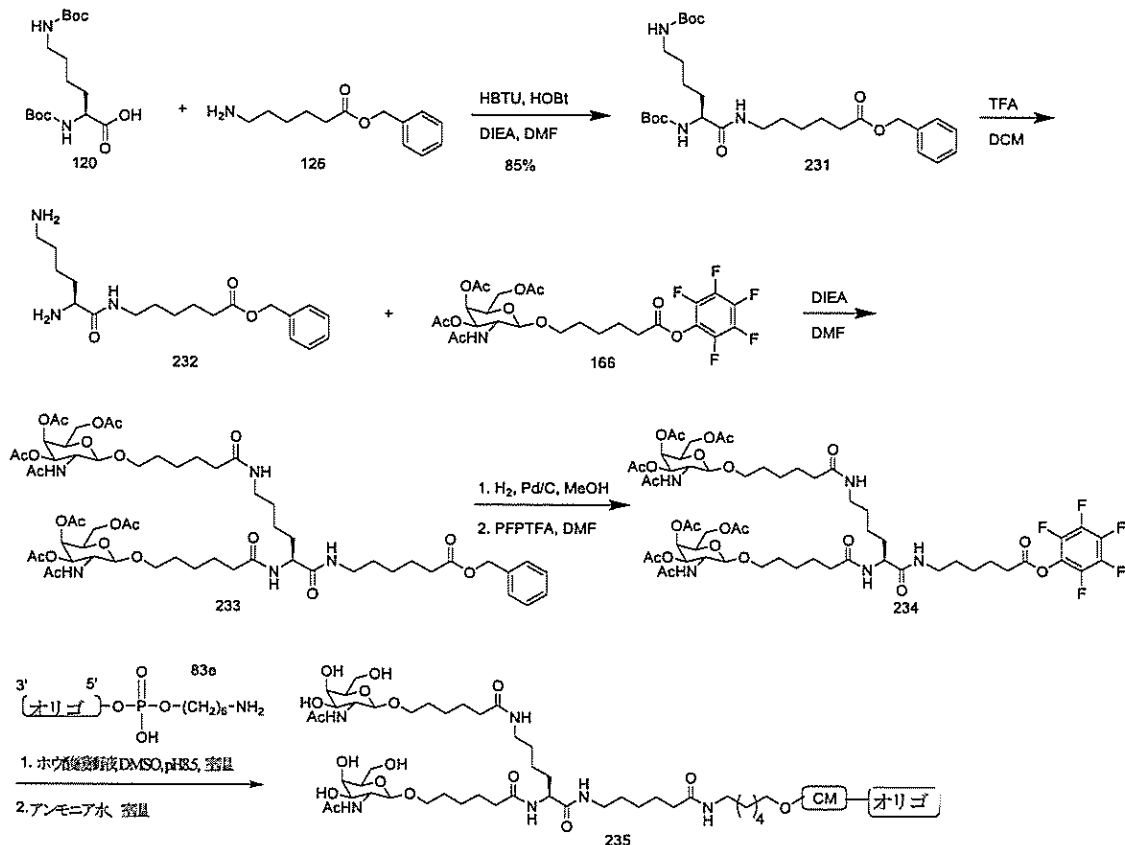
20

30

40

50

【化 2 4 0】

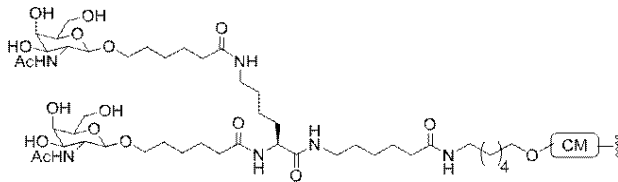


化合物 120 は市販されており、化合物 126 の合成は実施例 49 に記載されている。化合物 120 (1 g、2.89 mmol)、HBTU (0.39 g、2.89 mmol)、及び HOBT (1.64 g、4.33 mmol) を、DMF (10 mL) 中に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.75 mL、10.1 mmol) を添加した。約 5 分後、アミノヘキサン酸ベンジルエステル (1.36 g、3.46 mmol) をこの反応物に添加した。3 時間後、反応混合物を 100 mL の 1 M NaHSO₄ に注ぎ、2 × 50 mL 酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、40 mL 飽和 NaHCO₃ で 3 回、ブラインで 2 回洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。この生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (DCM:EA:Hex = 1:1:1) によって精製して、化合物 231 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。化合物 231 (1.34 g、2.438 mmol) をジクロロメタン (10 mL) 中に溶解し、トリフルオロ酢酸 (10 mL) を添加した。室温で 2 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮し、トルエン (3 × 10 mL) と共蒸発させた。残渣を減圧下で乾燥させて、トリフルオロ酢酸塩として化合物 232 を得た。化合物 166 の合成は、実施例 54 に記載される。化合物 166 (3.39 g、5.40 mmol) を DMF (3 mL) 中に溶解した。化合物 232 (1.3 g、2.25 mmol) の溶液を DMF (3 mL) 中に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (1.55 mL) を添加した。反応物を室温で 30 分間攪拌し、その後、水 (80 mL) に注ぎ、水層を EtOAc (2 × 100 mL) で抽出した。有機相を分離し、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3 × 80 mL)、1 M NaHSO₄ (3 × 80 mL)、及びブライン (2 × 80 mL) で洗浄し、その後、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、化合物 233 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。化合物 233 (0.59 g、0.48 mmol) をメタノール (2.2 mL) 及び酢酸エチル (2.2 mL) 中に溶解した。パラジウム炭素 (10 重量% Pd/C、湿性、0.07 g) を添加し、反応混合物を水素雰囲気下で 3 時間攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、濃縮して、カルボン酸を得た。カルボン酸 (1.32 g、1.15 mmol、クラス

ター遊離酸)をDMF(3.2mL)中に溶解した。これに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.3mL、1.73mmol)及びPFPTFA(0.30mL、1.73mmol)を添加した。室温で30分間攪拌した後、反応混合物を水(40mL)に注ぎ、EtOAc(2×50mL)で抽出した。上述のように標準の後処理を完了して、化合物234を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。実施例46に記載される一般的手順を用いて、オリゴヌクレオチド235を調製した。共役基GalNAc₂-24のGalNAc₂クラスター部分(GalNAc₂-24_a)をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₂-24(GalNAc₂-24_a-CM)の構造は、以下に示される：

【1174】

【化241】

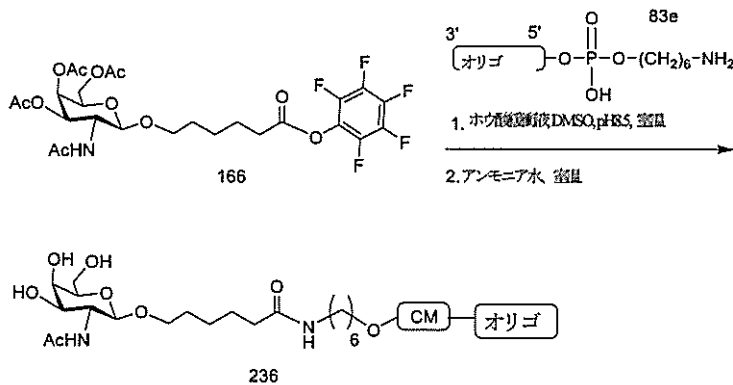


【1175】

実施例105：GalNAc₁-25共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1176】

【化242】



化合物166の合成は、実施例54に記載される。実施例46に記載される一般的手順を用いて、オリゴヌクレオチド236を調製した。

【1177】

あるいは、以下に示されるスキームを用いてオリゴヌクレオチド236を合成し、実施例10に記載される手順を用いて、化合物238を用いてオリゴヌクレオチド236を形成した。

【1178】

10

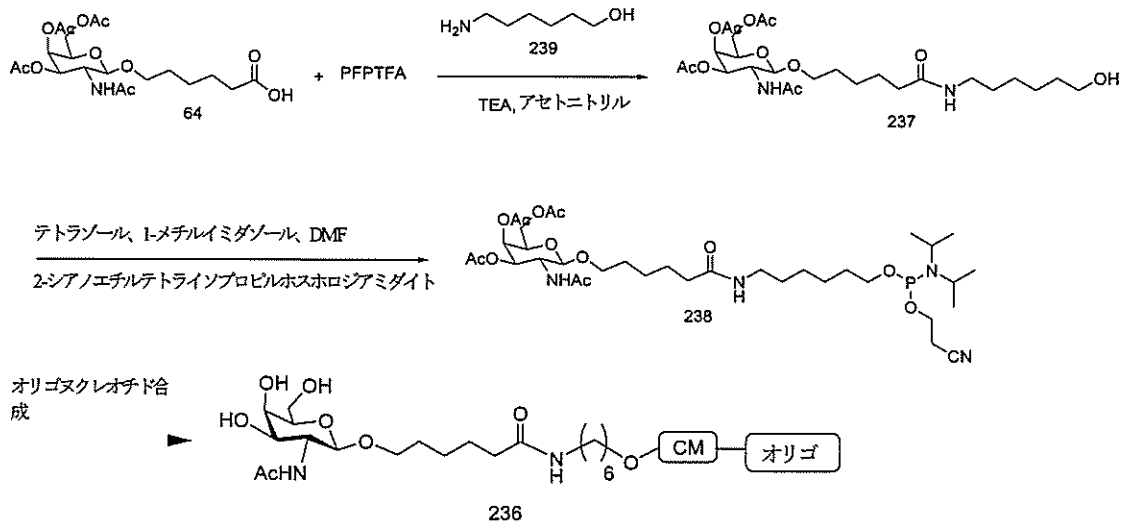
20

30

40

50

【化 2 4 3】



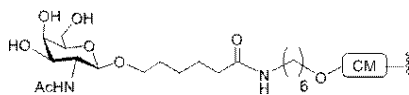
10

共役基 GalNAc_1-25 の GalNAc_1 クラスター部分 ($\text{GalNAc}_1-25\text{a}$) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。 GalNAc_1-25 ($\text{GalNAc}_1-25\text{a}-\text{CM}$) の構造は、以下に示される：

20

【1179】

【化 2 4 4】



【1180】

実施例 106：5'- GalNAc_2 または 5'- GalNAc_3 共役体を含む SRB-1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

表 116 及び 117 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。

30

処理

【1181】

6 週齢の雄 C57BL/6 マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、2、7、もしくは 20mg/kg の ISIS 番号 440762；または 0.2、0.6、2、6、もしくは 20mg/kg の ISIS 番号 686221、686222、もしくは 708561；または生理食塩水を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 72 時間後にマウスを殺した。リアルタイム PCR を用いて、肝臓における SRB-1 mRNA レベルを測定した。標準のプロトコルに従って、 SRB-1 mRNA レベルをシクロフィリン mRNA レベルに対して正規化した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、用量依存的様式で SRB-1 mRNA レベルを低下させ、ED₅₀ 結果が、表 116 及び 117 に提示される。以前の研究において、三価 GalNAc 共役オリゴヌクレオチドが二価 GalNAc 共役オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であり、これは、次いで、一価 GalNAc 共役オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことが示されたが (例えば、Khorev et al., Bioorg. & Med. Chem., Vol. 16, 5216-5231 (2008) を参照のこと)、表 116 及び 117 に示されるように、一価、二価、及び三価 GalNAc クラスターを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、同様の力価で SRB-1 mRNA レベルを低下させた。

40

【1182】

50

【表 104】

表 116

SRB-1 を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc クラスター	ED ₅₀ (mg/ kg)	配列 番号
440 762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	該当なし	4.7	22 50
686 221	GalNAc _{2-24a} -o-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc _{2-24a}	0.39	22 54
686 222	GalNAc _{3-13a} -o-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc _{3-13a}	0.41	22 54

10

表の説明文については、実施例93を参照されたい。GalNAc_{3-13a}の構造は、実施例62に示し、GalNAc_{2-24a}の構造は、実施例104に示した。

【1183】

20

【表 105】

表 117

SRB-1 を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc クラスター	ED ₅₀ (mg/ kg)	配列 番号
440 762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	該当なし	5	22 50
708 561	GalNAc _{1-25a} -o-T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc _{1-25a}	0.4	22 50

30

表の説明文については、実施例93を参照されたい。GalNAc_{1-25a}の構造は、実施例105に示した。

【1184】

実施例75に記載される手順を用いて、表116及び117における肝臓中のオリゴヌクレオチドの濃度も評価した。以下の表117a及び117bに示される結果は、肝臓組織のオリゴヌクレオチド (μg) / g 単位のUVによって測定された各処理群の平均総アンチセンスオリゴヌクレオチド組織レベルである。結果は、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドがGalNAc共役基を欠く同一の用量のオリゴヌクレオチドよりも著しく高いレベルで肝臓に蓄積したことを示す。さらに、それらのそれぞれの共役基に1、2、または3個のGalNAcリガンドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドはすべて同様のレベルで肝臓に蓄積した。上記のKhorev et al. の文献参照を考慮すると、これは意外な結果であり、上の表116及び117に示される活性データと一致する。

40

【1185】

50

【表 106】

表 117 a

GalNAc₂またはGalNAc₃共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓中の濃度

I S I S 番号	投与量 (m g / k g)	[アンチセンスオリゴヌク レオチド] (μ g / g)	GalNAc クラ スター	CM
4 4 0 7 6 2	2	2. 1	該当なし	該当なし
	7	13. 1		
	20	31. 1		
6 8 6 2 2 1	0. 2	0. 9	GalNAc ₂ -2 4 _a	A _d
	0. 6	2. 7		
	2	12. 0		
	6	26. 5		
6 8 6 2 2 2	0. 2	0. 5	GalNAc ₃ -1 3 _a	A _d
	0. 6	1. 6		
	2	11. 6		
	6	19. 8		

表 117 b

GalNAc₁共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓中の濃度

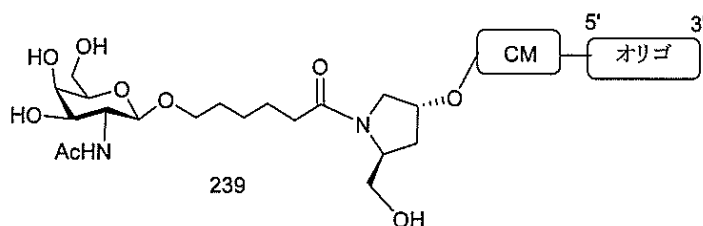
I S I S 番号	投与量 (m g / k g)	[アンチセンスオリゴヌク レオチド] (μ g / g)	GalNAc クラ スター	CM
4 4 0 7 6 2	2	2. 3	該当なし	該当なし
	7	8. 9		
	20	23. 7		
7 0 8 5 6 1	0. 2	0. 4	GalNAc ₁ -2 5 _a	PO
	0. 6	1. 1		
	2	5. 9		
	6	23. 7		
	20	53. 9		

【1186】

実施例 107: GalNAc₁-26またはGalNAc₁-27共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

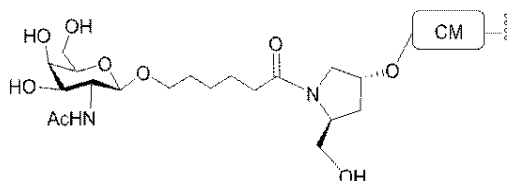
【1187】

【化 245】

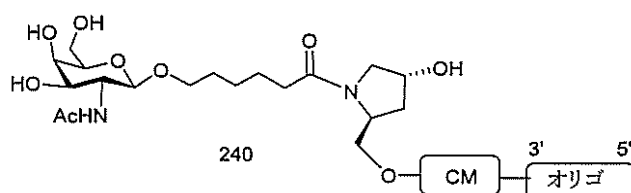


DMF中HBTU及びDIEAを用いて、オリゴヌクレオチド239を化合物47（実施例15を参照のこと）と酸64（実施例32を参照のこと）とのカップリングによって合成する。結果として生じたアミド含有化合物をホスフィチル化し、その後、実施例10に記載される手順を用いて、オリゴヌクレオチドの5'末端に付加する。共役基GalNAc₁-26のGalNAc₁クラスター部分（GalNAc₁-26_a）をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることが

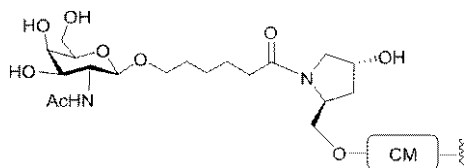
【化 2 4 6】



【化 2 4 7】



【化 2 4 8】



【 1 1 9 3 】

【表 107】

表 118

APO (a) を標的とする修飾 ASO

ISI S 番号	配列 (5' ~ 3')	GalNAc 3 クラス ター	CM	配列番 号
494 372	T _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} G _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	該当なし	該当 なし	228 1
681 251	GalNAc ₃ -7 _a -o' T _{cs} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _d sG _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} G _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	228 1
681 255	GalNAc ₃ -3 _a -o' T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _d sG _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -3 _a	PO	228 1
681 256	GalNAc ₃ -10 _a -o' T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _d sG _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -10 _a	PO	228 1
681 257	GalNAc ₃ -7 _a -o' T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _d sG _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	228 1
681 258	GalNAc ₃ -13 _a -o' T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _d sG _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _e	GalNAc ₃ -13 _a	PO	228 1
681 260	T _{cs} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{cs} T _{cs} ^m C _{eo} A _{do} ' -GalNAc ₃ -19	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	228 0

GalNAc₃-7_aの構造は、実施例 48 に示される。

【1194】

処理

ヒト Apo (a) を発現する雄トランスジェニックマウスのそれぞれに、表 119 に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量または PBS を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、血漿中の Apo (a) タンパク質のベースラインレベル及び第 1 の投与後の 1 週間時点のレベルを決定した。週 1 回約 8 週間、さらに血液を採取する。ELISA を用いて血漿 Apo (a) タンパク質レベルを測定した。表 119 における結果は、ベースラインレベル (%BL) に対して正規化された各処理群の血漿 Apo (a) タンパク質レベルの平均パーセントとして提示され、結果は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが Apo (a) タンパク質の発現を低下させたことを示す。さらに、GalNAc 共役基を含むオリゴヌクレオチドは、共役基を含まないオリゴヌクレオチドよりもさらに強力な Apo (a) 発現の減少を示した。

【1195】

10

20

30

40

50

【表 108】

表 119

Apo (a) 血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	1 週間時点での Apo (a) (% BL)
PBS	該当なし	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

10

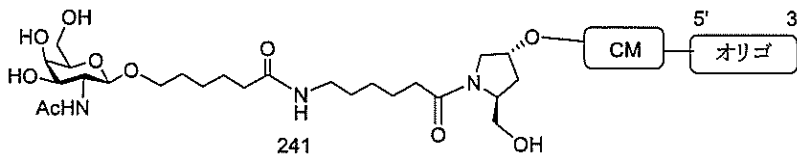
【1196】

実施例 109: GalNAc₁-28 または GalNAc₁-29 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1197】

【化 249】

20

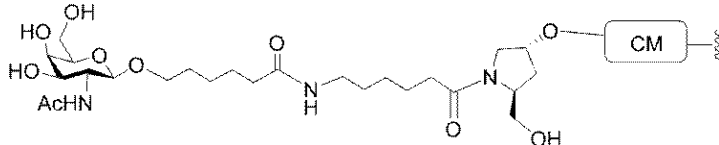


オリゴヌクレオチド 241 を実施例 71 に記載される手順と同様の手順を用いて合成して、ホスホラミダイト中間体を形成し、続いて、実施例 10 に記載される手順を用いてオリゴヌクレオチドを合成する。共役基 GalNAc₁-28 の GalNAc₁ クラスター部分 (GalNAc₁-28_a) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM) の構造は、以下に示される:

30

【1198】

【化 250】



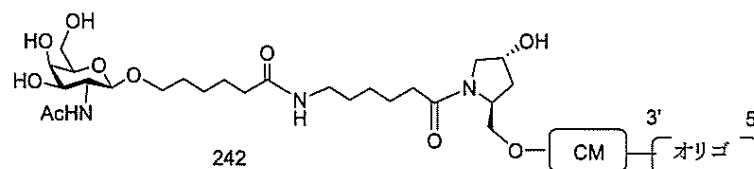
【1199】

GalNAc₁ 共役基をオリゴヌクレオチドの 3' 末端に付加するために、実施例 71 に記載される手順と同様の手順を用いてヒドロキシル中間体を形成し、その後、実施例 7 に記載される手順を用いてこれを固体支持体に付加する。その後、実施例 9 に記載される手順を用いてオリゴヌクレオチド合成を完了させて、オリゴヌクレオチド 242 を形成する。

40

【1200】

【化 251】

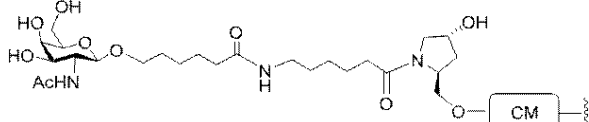


50

共役基 GalNAc_1-29 の GalNAc_1 クラスター部分 (GalNAc_1-29a) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。 GalNAc_1-29 ($\text{GalNAc}_1-29a\text{-CM}$) の構造は、以下に示される：

【1201】

【化252】



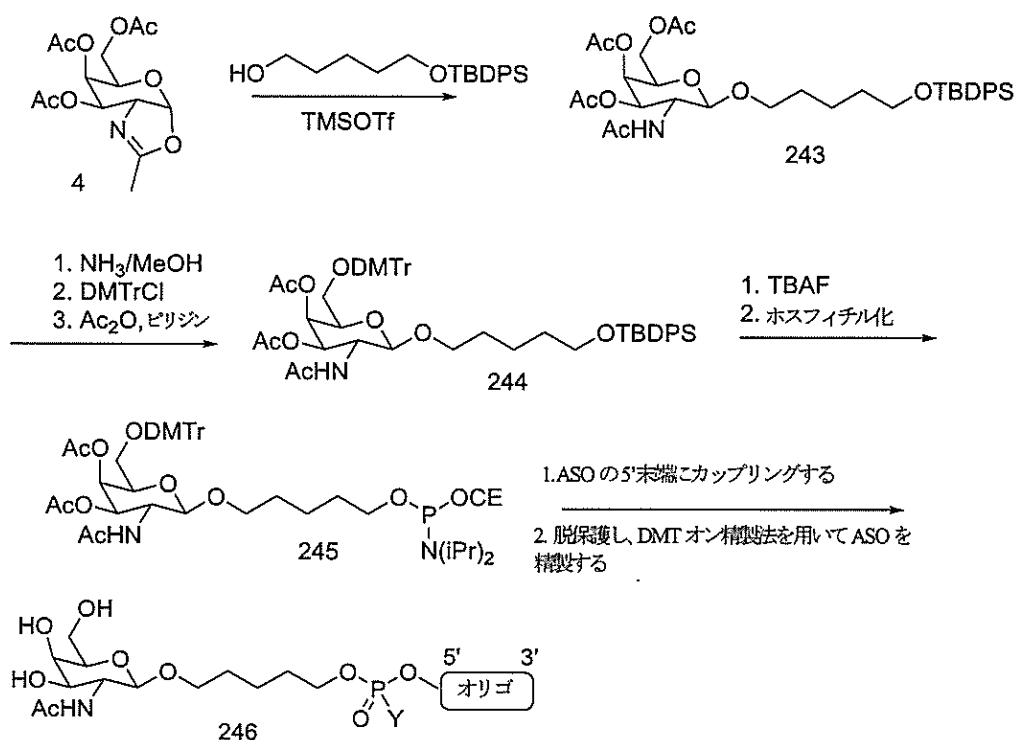
10

【1202】

実施例 110： GalNAc_1-30 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1203】

【化253】



20

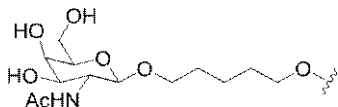
30

GalNAc_1-30 共役体を含むオリゴヌクレオチド 246 (式中、Y が、O、S、置換もしくは無置換 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニル、またはアルキニルから選択される) を上に示されるように合成する。共役基 GalNAc_1-30 の GalNAc_1 クラスター部分 (GalNAc_1-30a) を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、Y は、切断可能部分の一部である。ある特定の実施形態において、Y は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。 GalNAc_1-30a の構造は、以下に示される：

40

【1204】

【化254】



【1205】

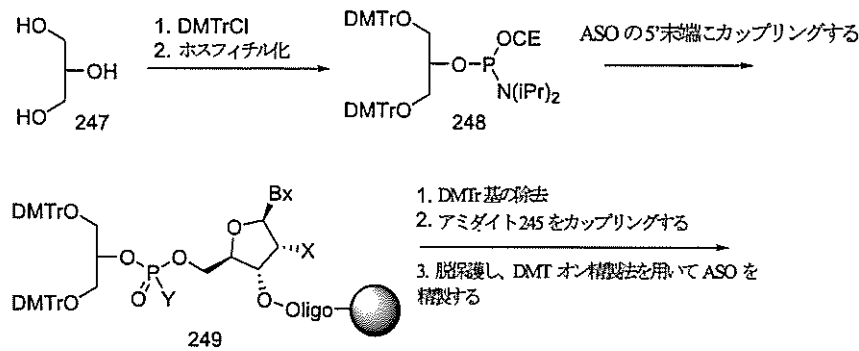
実施例 111： GalNAc_2-31 または GalNAc_2-32 共役体を含むオリゴヌ

50

クレオチドの合成

【1206】

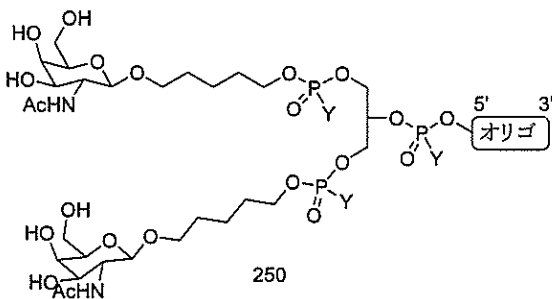
【化255】



10

【1207】

【化256】



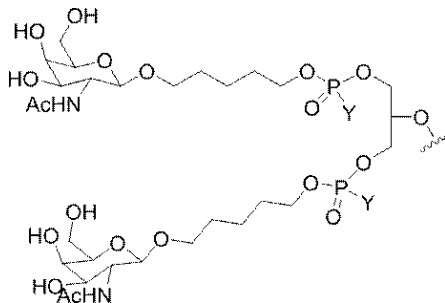
20

Ga l N A c 2-31 共役基を含むオリゴヌクレオチド250（式中、Yが、O、S、置換もしくは無置換C₁~C₁₀アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニル、またはアルキニルから選択される）を上に表示されるように合成する。共役基Ga l N A c 2-31のGa l N A c 2クラスター部分（Ga l N A c 2-31a）を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端に直接隣接したY含有基は、切断可能部分の一部である。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端に直接隣接したY含有基は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。Ga l N A c 2-31aの構造は、以下に示される：

30

【1208】

【化257】



40

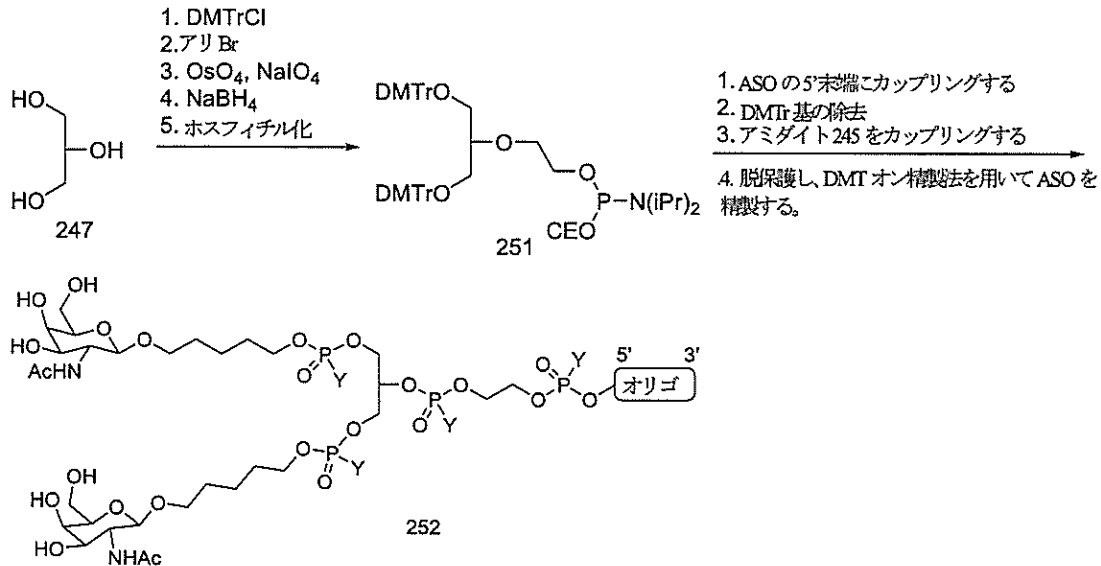
【1209】

Ga l N A c 2-32 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成は、以下に示される。

【1210】

50

【化 2 5 8】



10

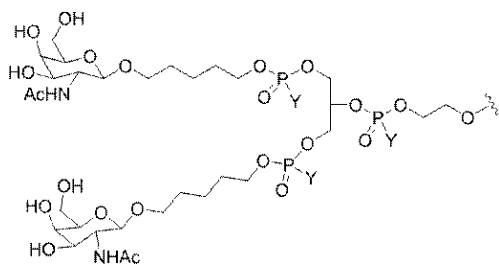
【1 2 1 1】

G a l N A c 2 - 3 2 共役基を含むオリゴヌクレオチド 2 5 2 (式中、Y が、O、S、置換もしくは無置換 C₁ ~ C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニル、またはアルキニルから選択される) を上に示されるように合成する。共役基 G a l N A c 2 - 3 2 の G a l N A c 2 クラスター部分 (G a l N A c 2 - 3 2 a) を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端に直接隣接した Y 含有基は、切断可能部分の一部である。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端に直接隣接した Y 含有基は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。G a l N A c 2 - 3 2 a の構造は、以下に示される：

20

【1 2 1 2】

【化 2 5 9】



30

【1 2 1 3】

実施例 1 1 2 : G a l N A c 1 共役体を含む修飾オリゴヌクレオチド

S R B - 1 を標的とする表 1 2 0 のオリゴヌクレオチドを G a l N A c 1 共役基で合成して、G a l N A c リガンドを含有する共役基を含むオリゴヌクレオチドの力価をさらに試験した。

40

【1 2 1 4】

50

【表 109-1】

表 120

ISI S番号	配列 (5' ~ 3')	Gal NAc クラス ター	CM	配列番号
711 461	GalNAc ₁ -25 _{a-o} ·A _{do} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 5 _a	A _d	2258
711 462	GalNAc ₁ -25 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 5 _a	PO	2256
711 463	GalNAc ₁ -25 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 5 _a	PO	2256
711 465	GalNAc ₁ -26 _{a-o} ·A _{do} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 6 _a	A _d	2258
711 466	GalNAc ₁ -26 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 6 _a	PO	2256
711 467	GalNAc ₁ -26 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 6 _a	PO	2256
711 468	GalNAc ₁ -28 _{a-o} ·A _{do} G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 8 _a	A _d	2258
711 469	GalNAc ₁ -28 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _{cs} ^m C _{cs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{cs} ^m C _{cs} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 8 _a	PO	2256
711 470	GalNAc ₁ -28 _{a-o} ·G _{cs} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{cs} T _{cs} T _e	Gal NAc 1-2 8 _a	PO	2256

【1215】

10

20

30

40

50

【表 109-2】

713 844	$G_{es} \ mC_{es} \ T_{es} \ T_{es} \ mC_{es} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{es} \ mC_{es} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo'}-GalNAc_1-27_a$	Gal NAc 1-2 7 _a	PO	2256
713 845	$G_{es} \ mC_{eo} \ T_{eo} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo'}-GalNAc_1-27_a$	Gal NAc 1-2 7 _a	PO	2256
713 846	$G_{es} \ mC_{eo} \ T_{eo} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo} \ A_{do'}-GalNAc_1-27_a$	Gal NAc 1-2 7 _a	A _d	2257
713 847	$G_{es} \ mC_{es} \ T_{es} \ T_{es} \ mC_{es} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{es} \ mC_{es} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo'}-GalNAc_1-29_a$	Gal NAc 1-2 9 _a	PO	2256
713 848	$G_{es} \ mC_{eo} \ T_{eo} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo'}-GalNAc_1-29_a$	Gal NAc 1-2 9 _a	PO	2256
713 849	$G_{es} \ mC_{es} \ T_{es} \ T_{es} \ mC_{es} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{es} \ mC_{es} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo} \ A_{do'}-GalNAc_1-29_a$	Gal NAc 1-2 9 _a	A _d	2257
713 850	$G_{es} \ mC_{eo} \ T_{eo} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ A_{ds} \ G_{ds} \ T_{ds} \ mC_{ds} \ A_{ds} \ T_{ds} \ G_{ds} \ A_{ds}$ $mC_{ds} \ T_{ds} \ T_{eo} \ mC_{eo} \ mC_{es} \ T_{es}$ $T_{eo} \ A_{do'}-GalNAc_1-29_a$	Gal NAc 1-2 9 _a	A _d	2257

10

20

30

【1216】

実施例 113: GalNAc クラスターを含むカリクレイン B、血漿（フレッチャー因子）1 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

表 121 のオリゴヌクレオチドは、ヒトカリクレイン B、血漿（フレッチャー因子）1 またはプレカリクレイン（PKK）を標的とするように設計した。

【1217】

40

50

【表 110】

表 121

配列 (5' ~ 3')	配列番号
Ga1NAc ₃ -3-T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -3-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} A _{eo} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -7-T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -7-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} A _{eo} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -10-T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -10-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} A _{eo} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -13-T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
Ga1NAc ₃ -13-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} A _{eo} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _d sT _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e	570
T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} ^m C _{es} A _e -Ga1NAc ₃ -19	570
T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} A _{eo} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e -Ga1NAc ₃ -19	570
Ga1NAc ₃ -7 _{a-o} -T _{es} G _{es} ^m C _{eo} A _{eo} A _{es} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} ^m C _{es} A _e	570

10

20

【1218】

実施例 114: 2'-MOE糖修飾を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる Hep aRG (商標) 細胞中のヒトPKKのアンチセンス阻害

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PKKを標的とするように設計し、PKK mRNAに対する効果について *in vitro* 試験を実施した。Hep aRG (商標) 細胞は、ヒト肝前駆細胞株由来の分化された肝細胞であり、初代ヒト肝細胞の特性を保持しており (Lubberstedt M. et al., J. Pharmacol. Toxicol. Methods 2011 63: 59-68)、スクリーン中で使用した。

【1219】

以下の表に示すキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-10-5 MOE ギャップマーとして設計された。これらのギャップマーは20ヌクレシオド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドと3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは、2'-O-メトキシエチル修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5-メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書で配列番号1として設計したヒトPKK mRNA (GENBANK寄託番号N

30

40

50

M__000892.3) もしくは本明細書で配列番号10として設計したヒトPKKゲノム配列(ヌクレオチド111693001から111730000まで切り捨てられたGENBANK寄託番号NT__016354.19)のいずれかを標的とする。「該当なし」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定の遺伝子配列を標的としないことを示す。

【1220】

ウェルあたり20,000細胞の密度で培養されたHepaRG(商標)細胞は、エレクトロポレーションを用いて3,000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約24時間の処理時間経過後に、RNAを細胞から単離し、PKK mRNAレベルを、定量的リアルタイムPCRにより測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3454(配列番号20として本明細書で設計した順方向配列CCAAAAAAGGTGCACCAAGTAACA、配列番号21として本明細書で設計した逆方向配列CCTCCGGGACTGTACTTTAATAGG、配列番号22として本明細書で設計したプローブ配列CACGCAAACATTTTCAACAAGGCAGAGTACC)を使用してmRNAレベルを測定した。PKK mRNAレベルは、RIBOGREEN(登録商標)によって測定される総RNA含量に従って調整した。同様の培養条件を有していた一連の実験で、アンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を実施した。各実験の結果は、以下に示す別のテーブルで表す。結果は、未処理の対照細胞と比較して、PKKの阻害パーセントとして表す。

【1221】

【表111-1】

表122

ISIS 番号	配列番号1 開始部位	配列番号1 終止部位	配列	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列 番号
530929	1	20	AACGGTCTTCAAGCTGTCT	59	3393	3412	30
530930	6	25	AAATGAACGGTCTTCAAGCT	17	3398	3417	31
530931	11	30	CTTAAAAATGAACGGTCTTC	29	3403	3422	32
530932	16	35	TGTCACCTAAAAATGAACGG	52	3408	3427	33
530933	31	50	TGGAGGTGAGTCTCTTGTC	76	3423	3442	34
530934	36	55	CTTCTGGAGGTGAGTCTCT	54	3428	3447	35

【1222】

【表 1 1 1 - 2】

530935	68	87	GCTTGAATAAAATCATTCTG	0	該当なし	該当なし	36
530936	73	92	TGCTTGCTTGAATAAAATCA	27	4072	4091	37
530937	78	97	TAAGTTGCTTGCTTGAATAA	0	4077	4096	38
530938	88	107	GGAAATGAAATAAGTTGCTT	11	4087	4106	39
530939	93	112	AACAAGGAAATGAAATAAGT	0	4092	4111	40
530940	98	117	TAGCAAACAAGGAAATGAAA	7	4097	4116	41
530941	103	122	AACTGTAGCAAACAAGGAAA	22	4102	4121	42
530942	108	127	CAGGAACTGTAGCAAACAA	22	4107	4126	43
530943	113	132	ATCCACAGGAACTGTAGCA	56	該当なし	該当なし	44
530944	118	137	CAGACATCCACAGGAACTG	0	該当なし	該当なし	45
530945	157	176	ATCCCCACCTCTGAAGAAGG	0	8029	8048	46
530946	160	179	TACATCCCCACCTCTGAAGA	0	8032	8051	47
530947	165	184	GAAGCTACATCCCCACCTCT	27	8037	8056	48
530948	170	189	ACATGGAAGCTACATCCCCA	35	8042	8061	49
530949	175	194	GGTGATCATGGAAGCTACAT	31	8047	8066	50
530950	221	240	ACCTGGGTGGAATGTGCAC	47	8093	8112	51
530951	226	245	CAAACACCTTGGGTGGAATG	49	8098	8117	52
530952	234	253	CTGAATAGCAAACACCTTGG	38	8106	8125	53
530953	239	258	GAAAACTGAATAGCAAACAC	7	8111	8130	54
530954	244	263	TGGAAGAAACTGAATAGCA	47	8116	8135	55
530955	278	297	CAAACCTTTTCTCCATGTCA	55	該当なし	該当なし	56
530956	300	319	ACACTATCTTTCAAGAAGCA	57	9834	9853	57
530957	386	405	GGCAAGCACTTATTTGATGA	56	該当なし	該当なし	58
530958	432	451	TTAAATGACTCCTCTCAT	60	12688	12707	59
530959	456	475	TCAACACTGTAACCTTAGA	60	12712	12731	60
530960	461	480	ATTCTTCAACACTGCTAACC	58	12717	12736	61
530961	466	485	TTGGCATTCTTCAACACTGC	88	12722	12741	62
530962	472	491	CCTTTTTGGCATTCTTCAA	64	12728	12747	63
530963	479	498	TGGTGACCTTTTTTGGCAT	78	12735	12754	64
530964	628	647	CTTCAGTGAGAATCCAGATT	44	14199	14218	65
530965	637	656	GGCACAGGGCTTCAGTGAGA	73	14208	14227	66
530966	649	668	AATTTCTGAAAGGGCACAGG	58	14220	14239	67
530967	654	673	CAACCAATTTCTGAAAGGGC	69	該当なし	該当なし	68
530968	680	699	CAAGATGCTGGAAGATGTTC	18	26128	26147	69
530969	846	865	GTGCCACTTTCAGATGTTTT	0	27110	27129	70
530970	851	870	TTGGTGTGCCACTTTCAGAT	74	27115	27134	71
530971	856	875	GGAACCTGGTGTGCCACTTT	85	27120	27139	72
530972	861	880	GTAGAGGAAGTGGTGTGCC	42	27125	27144	73
530973	866	885	GAGGAGTAGAGGAAGTGGT	52	27130	27149	74
530974	871	890	TTCTTGAGGAGTAGAGGAAC	18	27135	27154	75
530975	876	895	GTGTTTTCTTGAGGAGTAGA	41	27140	27159	76
530976	881	900	ATATGGTGTTCCTTGAGGA	26	27145	27164	77

【1 2 2 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1 1 - 3】

530977	886	905	TCCAGATATGGTGTTCCTT	55	27150	27169	78
530978	891	910	CTATATCCAGATATGGTGT	0	27155	27174	79
530979	901	920	GGTTAAAAGGCTATATCCAG	35	27165	27184	80
530980	906	925	TTGCAGGTAAAAGGCTATA	29	27170	27189	81
530981	911	930	TTCTTTTGCAGGTAAAAGG	0	27175	27194	82
530982	916	935	TAAAGTTCTTTTGCAGGTTA	0	27180	27199	83
530983	931	950	ATGGCAGGGTTCAGGTAAAG	9	該当なし	該当なし	84
530984	936	955	TTAGAAATGGCAGGGTTCAGG	25	該当なし	該当なし	85
530985	941	960	AAATTTTAGAATGGCAGGGT	32	27363	27382	86
530986	946	965	CGGGTAAATTTTAGAATGGC	62	27368	27387	87
530987	951	970	ACTCCCGGGTAAATTTTAGA	0	27373	27392	88
530988	961	980	TCCAAAGTCAACTCCCGGGT	76	27383	27402	89
530989	966	985	TCTCTCCAAAGTCAACTCC	28	27388	27407	90
530990	971	990	ATTCTTCTCCTCCAAAGTCA	32	27393	27412	91
530991	976	995	ATTCAATTCTTCTCCTCCAA	43	27398	27417	92
530992	981	1000	GTCACATTCAATTCTTCTCC	70	27403	27422	93
530993	1005	1024	CAAACATTCCTCTTAAAC	30	27427	27446	94
530994	1010	1029	CTTGCAAACATTCCTCT	50	27432	27451	95
530995	1015	1034	AGTCTCTTGCAAACATTCA	49	27437	27456	96
530996	1038	1057	TGACAGCGAATCATCTTTGT	51	27460	27479	97
530997	1043	1062	AAACTGACAGCGAATCATC	39	27465	27484	98
530998	1048	1067	AGTGAAAACTGACAGCGAA	0	27470	27489	99
530999	1071	1090	CAGTCTTCTGGGAGTAAAGA	31	27493	27512	100
531000	1098	1117	AAGAAACACTTACACTTCTC	1	該当なし	該当なし	101
531001	1108	1127	AGATAATCTTAAGAAACACT	44	27629	27648	102
531002	1155	1174	GAGCTCCCTTGTTGCCATA	85	27676	27695	103
531003	1160	1179	AACCAGAGCTCCCTTGTGTC	49	27681	27700	104
531004	1165	1184	AGAGTAACCAGAGCTCCCTT	76	27686	27705	105
531005	1170	1189	CTCAAAGAGTAACCAGAGCT	76	27691	27710	106
531006	1216	1235	GCTTGTTTTGTTGTGCAGA	49	27892	27911	107

【1 2 2 4】

【表 1 1 2 - 1】

表 1 2 3

ISIS 番号	配列 番号 1 開 始部 位	配列 番号 1 終 止部 位	配列	% 阻害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
482586	1608	1627	ACCCAACAGTTGGTATAAAT	0	31914	31933	108
486847	1563	1582	AGGCATATTGGTTTTTGGA	78	31869	31888	109
531007	46	65	AACACAATTGCTTCTTGAG	51	3438	3457	110
531008	675	694	TGCTGGAAGATGTCATGTG	51	26123	26142	111
531009	1239	1258	TTGTTCCTCCAACAATGCG	65	27915	27934	112
531010	1244	1263	AAGAGTTGTTCCTCCAACA	52	27920	27939	113

【 1 2 2 5 】

【表 1 1 2 - 2】

531011	1249	1268	CCAAGAAGAGTTTGTTCCTC	0	27925	27944	114
531012	1254	1273	TCTCCCAAGAAGAGTTTGT	48	27930	27949	115
531013	1264	1283	CCAGGGCCACTCTCCCAAG	56	27940	27959	116
531014	1287	1306	AGCTTCACCTGCAGGCTCAC	0	27963	27982	117
531015	1324	1343	TATGAGTGACCCTCCACACA	52	28000	28019	118
531016	1329	1348	TGTCCTATGAGTGACCCTCC	39	28005	28024	119
531017	1334	1353	ACTGGTGTCTATGAGTGAC	31	28010	28029	120
531018	1339	1358	GACCCACTGGTGTCTATGA	54	28015	28034	121
531019	1344	1363	GTGAGGACCCACTGGTGTCC	28	28020	28039	122
531020	1369	1388	AAGCCCATCAAAGCAGTGGG	0	該当なし	該当なし	123
531021	1420	1439	GTCTGACAGATTTAAAATGC	50	30498	30517	124
531022	1425	1444	GTAATGTCTGACAGATTAA	74	30503	30522	125
531023	1430	1449	CTTTTGAATGTCTGACAGA	71	30508	30527	126
531024	1452	1471	TTTATTGTGAGAAAGGTGT	69	30530	30549	127
531025	1457	1476	TCTCTTTTATTGTGAGAAA	34	30535	30554	128
531026	1501	1520	ATCATGATTCCCTTCTGAGA	73	30579	30598	129
531027	1530	1549	AAAGGAGCCTGGAGTTTAT	0	30608	30627	130
531028	1535	1554	AATTCAAAGGAGCCTGGAGT	56	30613	30632	131
531029	1540	1559	AGTGTAATTCAAAGGAGCCT	59	30618	30637	132
531030	1545	1564	AATTCAGTGTAATTCAAAGG	24	該当なし	該当なし	133
531031	1550	1569	TTTGGAATTCAGTGTAATTC	59	該当なし	該当なし	134
531032	1555	1574	TGGTTTTTGGGAATTCAGTGT	67	該当なし	該当なし	135
531033	1557	1576	ATTGGTTTTTGGGAATTCAGT	53	該当なし	該当なし	136
531034	1560	1579	CATATTGGTTTTTGGGAATTC	36	31866	31885	137
531035	1565	1584	GTAGGCATATTGGTTTTTGG	46	31871	31890	138
531036	1581	1600	GTGTCACCTTTGGAAGGTAG	71	31887	31906	139
531037	1604	1623	AACAGTTGGTATAAATTGTG	35	31910	31929	140
531038	1605	1624	CAACAGTTGGTATAAATTGT	22	31911	31930	141
531039	1609	1628	TACCCAACAGTTGGTATAAA	36	31915	31934	142
531040	1632	1651	TCCTTCGAGAAGCCCATCC	27	31938	31957	143
531041	1677	1696	AAAGGAATATTACCTTTTG	68	33121	33140	144
531042	1682	1701	TTACCAAAGGAATATTACC	11	33126	33145	145
531043	1687	1706	ATTGTGTTACCAAAGGAATAT	27	33131	33150	146
531044	1697	1716	GGCATTCTTCATTGTACC	68	33141	33160	147
531045	1702	1721	TTTCTGGCATTCTTCATTG	37	33146	33165	148
531046	1709	1728	GATATCTTTTCTGGCATTCT	54	33153	33172	149
531047	1714	1733	ATCTTGATATCTTTTCTGGC	68	33158	33177	150

【 1 2 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 2 - 3】

531048	1719	1738	TTATAATCTTGATATCTTTT	42	33163	33182	151
531049	1724	1743	TTATTTTATAATCTTGATAT	2	33168	33187	152
531050	1729	1748	TTGGGTTATTTTATAATCTT	18	33173	33192	153
531051	1734	1753	ATCCGTTGGGTTATTTTATA	51	33178	33197	154
531052	1739	1758	AGACCATCCGTTGGGTTATT	60	33183	33202	155
531053	1744	1763	AGCACAGACCATCCGTTGGG	49	33188	33207	156
531054	1754	1773	CTTTATAGCCAGCAGACACC	48	33198	33217	157
531055	1759	1778	CCCTTCTTTATAGCCAGCAC	68	33203	33222	158
531056	1764	1783	TTCCCCCTTCTTTATAGCC	45	33208	33227	159
531057	1769	1788	CATCTTTCCCCCTTCTTTA	48	33213	33232	160
531058	1779	1798	CCCTTACAAGCATCTTTTCC	60	該当なし	該当なし	161
531059	1820	1839	ACATTCCATTGTGTTTGCAA	55	33919	33938	162
531060	1841	1860	TGGTGATGCCCACCAAACGC	35	33940	33959	163
531061	1872	1891	TGCTCCCTGCGGGCACAGCC	52	33971	33990	164
531062	1877	1896	CAGGTTGCTCCCTGCGGGCA	39	33976	33995	165
531063	1882	1901	GACACCAGGTTGCTCCCTGC	51	33981	34000	166
531064	1887	1906	GTGTAGACACCAGGTTGCTC	56	33986	34005	167
531065	1892	1911	CTTTGGTGTAGACACCAGGT	57	33991	34010	168
531066	1897	1916	AGCGACTTTGGTGTAGACAC	67	33996	34015	169
531067	1902	1921	TACTCAGCGACTTTGGTGTA	31	34001	34020	170
531068	1907	1926	CCATGTACTCAGCGACTTTG	59	34006	34025	171
531069	1912	1931	CCAGTCCATGTACTCAGCGA	56	34011	34030	172
531070	1930	1949	CTGTGTTTTCTCTAAAATCC	68	34029	34048	173
531071	1935	1954	CTGCTCTGTGTTTTCTCTAA	73	34034	34053	174
531072	2026	2045	GCTCAGAATTGACTTGAAC	64	34125	34144	175
531073	2031	2050	CCCAGGCTCAGAATTGACT	51	34130	34149	176
531074	2049	2068	CTTTGCAGATGAGGACCCCC	67	34148	34167	177
531075	2054	2073	CCATGCTTTGCAGATGAGGA	64	34153	34172	178
531076	2059	2078	ACTCTCCATGCTTTGCAGAT	68	34158	34177	179
531077	2064	2083	ATGCCACTCTCCATGCTTTG	51	34163	34182	180
531078	2111	2130	AGCAGCTCTGAGTGCACTGT	77	34210	34229	181
531079	2116	2135	TCCTCAGCAGCTCTGAGTGC	58	34215	34234	182
531080	2121	2140	CATTGTCTCAGCAGCTCTG	55	34220	34239	183
531081	該当なし	該当なし	TGGTTTTTGAATTCTGAAA	14	31861	31880	184
531082	該当なし	該当なし	ATATTGGTTTTTGAATTCT	31	31865	31884	185

【1 2 2 7】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 1】

表 1 2 4

ISIS 番号	配 列 番 号 1 開 始 部 位	配 列 番 号 1 終 止 部 位	配列	%阻害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531083	該 当 な し	該 当 な し	TGTACTAGTTTCCTATAACT	60	14738	14757	186
					14809	14828	
					14880	14899	
					14939	14958	
					15071	15090	
					15214	15233	
					15286	15305	
					15345	15364	
					15477	15496	
					15549	15568	
					15607	15626	
					15679	15698	
					15809	15828	
					15881	15900	
					15939	15958	
531084	該 当 な し	該 当 な し	ATAGGGACACAACCAAGGAA	25	16296	16315	187
531085	該 当 な し	該 当 な し	AGGCACAGAGCCAGCACCCA	9	16495	16514	188
531086	該 当 な し	該 当 な し	CCTGCCTCCTGGCAGCCTTC	48	16696	16715	189

【 1 2 2 8】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 2】

531087	該 当 な し	該 当 な し	CCAGGTGTGGACAGCAGCTG	52	16821	16840	190
531088	該 当 な し	該 当 な し	GGTTTTGTTGTAAAATTAG	27	17159	17178	191
531089	該 当 な し	該 当 な し	AAAACACCATTAAATCCATT	45	17306	17325	192
531090	該 当 な し	該 当 な し	ACAGAAACCATGATGTTGCT	59	17644	17663	193
531091	該 当 な し	該 当 な し	TCAGCCCAATGTCCTAACCT	35	17793	17812	194
531092	該 当 な し	該 当 な し	CCTTCACTGACTCTCTTTTC	24	17922	17941	195
531093	該 当 な し	該 当 な し	TTCTCCTGGCTCAGAAGCTC	60	18053	18072	196
					23315	23334	
531094	該 当 な し	該 当 な し	GAATGTCAGGCCTCTGGGCC	48	18181	18200	197
531095	該 当 な し	該 当 な し	CTAACAACCCACAATATCA	20	18390	18409	198
531096	該 当 な し	該 当 な し	CCCAATTCTTAGTCCTTTAA	45	18523	18542	199

【1 2 2 9】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 3】

531097	該 当 な し	該 当 な し	ACCAAGCTCAGCCTCCAAC	41	18648	18667	200
531098	該 当 な し	該 当 な し	TTATTAGTCAAATCACCCAA	19	18773	18792	201
531099	該 当 な し	該 当 な し	TGGATGGGTAGAGGCCTTTC	64	18898	18917	202
531100	該 当 な し	該 当 な し	CCCCCTCCCTTCCCTACACA	0	19023	19042	203
531101	該 当 な し	該 当 な し	ATGTAAGTTACAAGCCACTA	37	19153	19172	204
531102	該 当 な し	該 当 な し	TGCCTCTTTAATAAAAACTC	42	19484	19503	205
531103	該 当 な し	該 当 な し	ACTCATTGCCTTAACCTCAGG	40	19636	19655	206
531104	該 当 な し	該 当 な し	ACTTGACCTTACTGTTTGTAG	20	19886	19905	207
531105	該 当 な し	該 当 な し	CTCCTCCCCAGGCTGCTCCT	16	22092	22111	208
531106	該 当 な し	該 当 な し	AAGATCTAGATAATTCTTGT	31	22332	22351	209

【1 2 3 0】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 4】

531107	該 当 な し	該 当 な し	TCAACTCACACCTGACCTAA	30	22457	22476	210
531108	該 当 な し	該 当 な し	TGAACCCAAAACCTCTGGCAC	50	22771	22790	211
531109	該 当 な し	該 当 な し	AGCCCAAGGAACATCTCACC	52	22959	22978	212
531110	該 当 な し	該 当 な し	GCCTGTTTGGTGGTCTCTTC	86	23110	23129	213
531111	該 当 な し	該 当 な し	CTTCTCCTGGCTCAGAAGCT	68	18054	18073	214
					23316	23335	
531112	該 当 な し	該 当 な し	ATGTATGATTCTAAGAACTT	14	23479	23498	215
531113	該 当 な し	該 当 な し	AACAGACACATTATTTATAT	0	23604	23623	216
531114	該 当 な し	該 当 な し	AGAGTCAAGTCCACAGACAT	40	24246	24265	217
531115	該 当 な し	該 当 な し	TCCTAAATAGGAACAAAGTA	0	24372	24391	218
531116	該 当 な し	該 当 な し	TTGTTAAGGTTGTAGAGAGA	23	24688	24707	219

【1 2 3 1】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 5】

531117	該 当 な し	該 当 な し	ACCCAATTATTTTAATGGC	62	24876	24895	220
531118	該 当 な し	該 当 な し	GCCTAAATGTAAGAGCTAAA	26	25157	25176	221
531119	該 当 な し	該 当 な し	TAAACTCTTACATTATAGA	0	25293	25312	222
531120	該 当 な し	該 当 な し	AAATAAAAGCACTCAGACTG	0	25418	25437	223
531121	該 当 な し	該 当 な し	TTGGTCTACAGATTCAATGC	72	25550	25569	224
531122	該 当 な し	該 当 な し	TAACAAAAATGCCTTGCGCC	33	25710	25729	225
531123	該 当 な し	該 当 な し	TCCCAGCTCCAGTCACCACC	74	25866	25885	226
531124	該 当 な し	該 当 な し	GTACTAAACATCCTAAGTGA	2	25992	26011	227
531125	該 当 な し	該 当 な し	ACTCGCCTTTGTGACTCGAT	23	26264	26283	228
531126	該 当 な し	該 当 な し	TTTTGAATCTTCATTCAAAG	0	26551	26570	229

【1 2 3 2】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 6】

531127	該 当 な し	該 当 な し	CAGAGCCTTGATCAGAATAA	12	26676	26695	230
531128	該 当 な し	該 当 な し	AAGTTCCACCTTCTAACTGG	18	26831	26850	231
531129	該 当 な し	該 当 な し	AGCAGCTCACACCCAAAAAG	0	27005	27024	232
531130	該 当 な し	該 当 な し	TTCTGTGTCAATTATAAACA	0	27344	27363	233
531131	該 当 な し	該 当 な し	TAGAAAGAGTAAGCCTTCAC	0	27587	27606	234
531132	該 当 な し	該 当 な し	AGTGAGGTTACTCACCAGAG	0	27732	27751	235
531133	該 当 な し	該 当 な し	TTTTGTTGTGCAGACTGAAA	19	27886	27905	236
531134	該 当 な し	該 当 な し	TTACCCATCAAAGCAGTGGG	6	28045	28064	237
531135	該 当 な し	該 当 な し	AATGTTGTGAATACCATCCC	16	28174	28193	238
531136	該 当 な し	該 当 な し	TAACATTTCTATGGCCTGA	6	28670	28689	239

【1 2 3 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 7】

531137	該 当 な し	該 当 な し	TGTCTACTATTTGACCAATA	19	28795	28814	240
531138	該 当 な し	該 当 な し	TTTAAATGTGTCACTTAATC	0	28987	29006	241
531139	該 当 な し	該 当 な し	TCCTAAACAAAAATACTT	0	29156	29175	242
531140	該 当 な し	該 当 な し	TCTTCCAGGCCAACCCCTT	22	29321	29340	243
531141	該 当 な し	該 当 な し	TGCAAGGCATGTGTGCACAA	47	29532	29551	244
531142	該 当 な し	該 当 な し	TGTTTAAATATCTCTATAC	8	30008	30027	245
531143	該 当 な し	該 当 な し	CATGGAAAAATTAAGCTCAT	0	30133	30152	246
531144	該 当 な し	該 当 な し	TGAAGATTCTATTTAACAAA	0	30266	30285	247
531145	該 当 な し	該 当 な し	GCCTAGGAGAGAAAAATAAA	0	30445	30464	248
531146	該 当 な し	該 当 な し	CCAGTGTAATTCAAAGGAGC	40	30620	30639	249

【 1 2 3 4】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 8】

531147	該 当 な し	該 当 な し	CCATTATTTCCATCACCTGC	18	30871	30890	250
531148	該 当 な し	該 当 な し	TACCCAAATTATACCTGGAA	8	31015	31034	251
531149	該 当 な し	該 当 な し	AGAGGTAAAGCAACTTGCCC	45	31429	31448	252
531150	該 当 な し	該 当 な し	TCCTTAATAGTCATAGCAGG	48	31558	31577	253
531151	該 当 な し	該 当 な し	TCACCACCATTTTTCACATG	44	31683	31702	254
531152	該 当 な し	該 当 な し	GTTATGGATATAGACTTTAA	0	31808	31827	255
531153	該 当 な し	該 当 な し	CTAGAAGCAATATTTAAAGC	0	31974	31993	256
531154	該 当 な し	該 当 な し	ATGAAGTAAGATGCTTAAAA	16	32162	32181	257
531155	該 当 な し	該 当 な し	CTTCTTGCTCAGATTACCA	79	32464	32483	258
531156	該 当 な し	該 当 な し	TCTGAAAAGCCCTCCGAGCT	0	32589	32608	259

【 1 2 3 5】

10

20

30

40

50

【表 1 1 3 - 9】

531157	該 当 な し	該 当 な し	AAGTGAATCAGAGCAGTGTA	46	32961	32980	260
531158	該 当 な し	該 当 な し	ACCTTACAAGCATCTTTTCC	41	33223	33242	261
531159	該 当 な し	該 当 な し	ATTTGTTAAAAGTTGCTTAT	0	33368	33387	262
531160	該 当 な し	該 当 な し	TGATATCATCATCCCAATGA	13	33510	33529	263

【 1 2 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 1】

表 1 2 5

ISIS 番号	配 列 番 号 1 開 始 部 位	配 列 番 号 1 終 止 部 位	配列	%阻害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531083	該 当 な し	該 当 な し	TGTACTAGTTTCCTATAACT	68	14738	14757	264
					14809	14828	
					14880	14899	
					14939	14958	
					15071	15090	
					15214	15233	
					15286	15305	
					15345	15364	
					15477	15496	
					15549	15568	
					15607	15626	
					15679	15698	
					15809	15828	
					15881	15900	
					15939	15958	
531161	該 当 な し	該 当 な し	CAGACACCTTCTTCACAAGG	40	898	917	264
531162	該 当 な し	該 当 な し	AATTTCCAGATGTATTAGT	43	1054	1073	265
531163	該 当 な し	該 当 な し	TCAGCAGAAATCATGTAGGC	60	1181	1200	266

【1 2 3 7】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 2】

531164	該 当 な し	該 当 な し	TTAAATATAAGAGATCCTC	38	1609	1628	267
531165	該 当 な し	該 当 な し	GTAATAAAAGGAATGATAAA	0	1825	1844	268
531166	該 当 な し	該 当 な し	AGACAGTAAACAAAATCAGG	12	2046	2065	269
531167	該 当 な し	該 当 な し	CAAGAAACCACCAAAGGAAG	37	2176	2195	270
531168	該 当 な し	該 当 な し	ACCCCAACAGACAGCCCACC	55	2314	2333	271
531169	該 当 な し	該 当 な し	TGGGCTCACCCAGTGGACC	54	2580	2599	272
531170	該 当 な し	該 当 な し	GCCTGGCCCCAAGACTCTA	54	2743	2762	273
531171	該 当 な し	該 当 な し	AGGCCTGCCACAGGCCAGAC	40	2873	2892	274
531172	該 当 な し	該 当 な し	TTCAAGCCTGGGCAGCACAG	71	3004	3023	275
531173	該 当 な し	該 当 な し	AAAATAACTTCACTAGAGCT	22	3131	3150	276

【1 2 3 8】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 3】

531174	該 当 な し	該 当 な し	TGTAAGTATATTA ACTATT	10	3256	3275	277
531175	該 当 な し	該 当 な し	TACTCAGGAAATTAGAATAT	25	3550	3569	278
531176	該 当 な し	該 当 な し	TTATGAAACCTCTTGATTG	0	3753	3772	279
531177	該 当 な し	該 当 な し	TTCTTGTAATGTCTGAATT	61	3971	3990	280
531178	該 当 な し	該 当 な し	ACCACAGGAACTGTAGCAA	72	4111	4130	281
531179	該 当 な し	該 当 な し	GATTGGACCCAGACACTATA	57	4506	4525	282
531180	該 当 な し	該 当 な し	CCTCTTAAGTCACCATAGAC	45	4785	4804	283
531181	該 当 な し	該 当 な し	GGTTGAGGGACAGACACAGG	36	4940	4959	284
531182	該 当 な し	該 当 な し	ATAATCATGATTTATTTTGC	34	5099	5118	285
531183	該 当 な し	該 当 な し	CATAAGAATGTGCACACAAA	39	5382	5401	286

【1 2 3 9】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 4】

531184	該 当 な し	該 当 な し	ACTCTTATTAGCTGGTAGAA	74	5538	5557	287
531185	該 当 な し	該 当 な し	GGACCAAACTGAGAGGCAG	63	5663	5682	288
531186	該 当 な し	該 当 な し	CCATTACTCTCAAGCTCCAC	75	5890	5909	289
531187	該 当 な し	該 当 な し	ATCTATTGGTTCAGGAGCCA	72	6015	6034	290
531188	該 当 な し	該 当 な し	GTAAAACAAC TAGAAGCCA	67	6146	6165	291
531189	該 当 な し	該 当 な し	AGGTGTTCTTGCTTATCCTC	63	6484	6503	292
531190	該 当 な し	該 当 な し	GCAGTCACTCCTCTCCAGC	59	6659	6678	293
531191	該 当 な し	該 当 な し	AAGTGTATTGCCTAGATTTC	37	6784	6803	294
531192	該 当 な し	該 当 な し	GAGTGCCATCTTCTCTGCAC	61	6968	6987	295
531193	該 当 な し	該 当 な し	TTATTCCCAGCTCTAAAATA	23	7274	7293	296

【 1 2 4 0】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 5】

531194	該 当 な し	該 当 な し	CTCACAATTCTGTAAGGGAA	64	7596	7615	297
531195	該 当 な し	該 当 な し	ATAAAATATATTAAGGCAAC	61	7846	7865	298
531196	該 当 な し	該 当 な し	TTGAGTCAGACATCCTGTGA	38	7996	8015	299
531197	該 当 な し	該 当 な し	TACCTTTTCTCCATGTCATT	42	8148	8167	300
531198	該 当 な し	該 当 な し	GGGATTTTGCTGAAGCTGGT	73	8273	8292	301
531199	該 当 な し	該 当 な し	CTTTGAATAGAAAATGACTA	1	8415	8434	302
531200	該 当 な し	該 当 な し	CAAAATCACAAGTTCTAGAT	51	8617	8636	303
531201	該 当 な し	該 当 な し	TTTCCAATACTTTTACAAAT	52	8760	8779	304
531202	該 当 な し	該 当 な し	ATTAATAAGCATCTCTCTGA	31	9109	9128	305
531203	該 当 な し	該 当 な し	TGACTATCCAATTCTAGTT	67	9253	9272	306

【1 2 4 1】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 6】

531204	該 当 な し	該 当 な し	CTGTAGTCTGCACTTAATG	60	9418	9437	307
531205	該 当 な し	該 当 な し	ACATTTTTTAAGTACAGGAA	0	9602	9621	308
531206	該 当 な し	該 当 な し	GAAATGTCTAGCATTTTCTA	28	9755	9774	309
531207	該 当 な し	該 当 な し	CCACTTATTTGATGACCACA	64	9915	9934	310
531208	該 当 な し	該 当 な し	TCCAGAATACTGCCCCATCT	23	10050	10069	311
531209	該 当 な し	該 当 な し	TGGATTCATTTTCTGCAAAT	81	10175	10194	312
531210	該 当 な し	該 当 な し	AGACATTGTCAAATGTCCCC	60	10322	10341	313
531211	該 当 な し	該 当 な し	TTGATGTCAGCACTGTTGAC	77	10480	10499	314
531212	該 当 な し	該 当 な し	ACATCAGTAGCTTCAGATGT	56	10618	10637	315
531213	該 当 な し	該 当 な し	CAAAATTAATTGTGCATAAT	13	10820	10839	316

【1 2 4 2】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 7】

531214	該 当 な し	該 当 な し	TTTTCTTTAAATTTGCTA	37	11120	11139	317
531215	該 当 な し	該 当 な し	TAGAGATTTTATGTACTTGG	63	11245	11264	318
531216	該 当 な し	該 当 な し	AAACACAGGAATTTGCAGAC	33	11408	11427	319
531217	該 当 な し	該 当 な し	GTGGAATAAACATAATCTA	47	11579	11598	320
531218	該 当 な し	該 当 な し	GATAATTCTTTTCACAGACA	72	12028	12047	321
531219	該 当 な し	該 当 な し	CTTCTCTATCTCCCAGTGTT	61	12227	12246	322
531220	該 当 な し	該 当 な し	CAATACAGGTAAATTCACG	56	12374	12393	323
531221	該 当 な し	該 当 な し	AAGGGATTTAAAATTTTAT	0	12507	12526	324
531222	該 当 な し	該 当 な し	GGCAAGCTGTACAAGAAAAA	19	12642	12661	325
531223	該 当 な し	該 当 な し	TGTACTCACCGGTACTCTGC	58	12805	12824	326

【1 2 4 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 8】

531224	該 当 な し	該 当 な し	AAGAGAATGCTCAGAAATGG	25	13435	13454	327
531225	該 当 な し	該 当 な し	ACACTTGTACCCATACATC	45	13560	13579	328
531226	該 当 な し	該 当 な し	GACAGTAGAGACTGGGAAGG	12	13708	13727	329
531227	該 当 な し	該 当 な し	TACCAATTTCTGAAAGGGCA	72	14224	14243	330
531228	該 当 な し	該 当 な し	CAGAGTAACTCCCATCTC	33	14387	14406	331
531229	該 当 な し	該 当 な し	CTTCAAAGCCAGCAGTGTA	69	14514	14533	332
531230	該 当 な し	該 当 な し	CTTACTGGGCTAAAATCAAG	46	14639	14658	333

【 1 2 4 4】

10

20

30

40

50

【表 1 1 4 - 9】

531231	該 当 な し	該 当 な し	TATCACTGTACTAGTTTCCT	94	14744	14763	334
					14815	14834	
					14886	14905	
					14945	14964	
					15005	15024	
					15077	15096	
					15220	15239	
					15292	15311	
					15351	15370	
					15411	15430	
					15483	15502	
					15555	15574	
					15613	15632	
					15685	15704	
					15815	15834	
					15887	15906	
					15945	15964	
531232	該 当 な し	該 当 な し	CTGTACTAGTTTCCTATAAC	85	14739	14758	335
					14810	14829	
					14881	14900	
					14940	14959	
					15000	15019	
					15072	15091	
					15215	15234	
					15287	15306	
					15346	15365	
					15406	15425	
					15478	15497	
					15550	15569	
					15608	15627	
					15680	15699	
					15810	15829	
					15882	15901	
					15940	15959	

10

20

30

40

【 1 2 4 5】

50

【表 1 1 4 - 1 0】

531233	該 当 な し	該 当 な し	ACTGTACTAGTTTCCTATAA	86	14740	14759	336
					14811	14830	
					14882	14901	
					14941	14960	
					15001	15020	
					15073	15092	
					15216	15235	
					15288	15307	
					15347	15366	
					15407	15426	
					15479	15498	
					15551	15570	
					15609	15628	
					15681	15700	
					15811	15830	
					15883	15902	
					15941	15960	
531234	該 当 な し	該 当 な し	CACTGTACTAGTTTCCTATA	86	14741	14760	337
					14812	14831	
					14883	14902	
					14942	14961	
					15002	15021	
					15074	15093	
					15217	15236	
					15289	15308	
					15348	15367	
					15408	15427	
					15480	15499	
					15552	15571	
					15610	15629	
					15682	15701	
					15812	15831	
					15884	15903	
					15942	15961	

10

20

30

40

【 1 2 4 6 】

50

【表 1 1 4 - 1 1】

531235	該 当 な し	該 当 な し	TCACTGTACTAGTTTCCTAT	86	14742	14761	338
					14813	14832	
					14884	14903	
					14943	14962	
					15003	15022	
					15075	15094	
					15218	15237	
					15290	15309	
					15349	15368	
					15409	15428	
					15481	15500	
					15553	15572	
					15611	15630	
					15683	15702	
					15813	15832	
					15885	15904	
					15943	15962	
531236	該 当 な し	該 当 な し	ATCACTGTACTAGTTTCCTA	87	14743	14762	339
					14814	14833	
					14885	14904	
					14944	14963	
					15004	15023	
					15076	15095	
					15219	15238	
					15291	15310	
					15350	15369	
					15410	15429	
					15482	15501	
					15554	15573	
					15612	15631	
					15684	15703	
					15814	15833	
					15886	15905	
					15944	15963	
531237	該 当 な し	該 当 な し	GTGGAATGTCATGGCAATTT	56	16399	16418	340

【1 2 4 7】

実施例 1 1 5：2'-MOE糖修飾を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる H e p a R G（商標）細胞中のヒト P K K のアンチセンス阻害

追加のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、P K K 核酸を標的とするように設計し、P K K mRNA に対する効果について *i n v i t r o* 試験を実施した。

【1 2 4 8】

以下の表のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'-10-5 MOEギャップマー、4-9-4 MOEギャップマー、4-10-4 MOEギャップマー、4-10-3 MOEギャップマー、3-10-4 MOEギャップマー、または3-10-3 MOEギャッ

プマーとして設計した。5-10-5 MOEギャップマーは、20ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。4-9-4 MOEギャップマーは、17ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは9個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ4個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。4-10-4 MOEギャップマーは、18ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ4個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。4-10-3 MOEギャップマーは、17ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ4個と3個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。3-10-4 MOEギャップマーは、17ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側にウイングセグメントが隣接しており、3'側にそれぞれ4個と3個のヌクレオシドを含む。3-10-3 MOEギャップマーは、16ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌレドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ3個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドと3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5'-メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、配列番号1または配列10のいずれかを標的とする。「該当なし」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定の遺伝子配列を標的としないことを示す。

【1249】

ウェルあたり20,000個の細胞密度の培養されたHepaRG（商標）は、5,000 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドを有するエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。約24時間処理を行った後、RNAを細胞から単離し、PKK mRNAレベルと定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3454を使用してmRNAレベルを測定した。PKK mRNAレベルをRIBOGREEN（登録商標）によって測定する総RNA含量に従って調整した。同様の培養条件を有する一連の実験でアンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を行った。各実験の結果は、以下に示す別個の表に表す。結果は、未処理の対照細胞に対するPKKの阻害率（%）として表す。

【1250】

10

20

30

40

50

【表 1 1 5 - 1】

表 1 2 6

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	98	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546131	4	23	ATGAACGGTCTTCAAGCTGT	5-10-5	75	3396	3415	341
547269	5	24	AATGAACGGTCTTCAAGCTG	5-10-5	56	3397	3416	342
547270	7	26	AAAAATGAACGGTCTTCAAGC	5-10-5	68	3399	3418	343
547271	10	29	TTAAAAATGAACGGTCTTCA	5-10-5	60	3402	3421	344
547272	13	32	CACTTAAAAATGAACGGTCT	5-10-5	82	3405	3424	345
547273	25	44	TGAGTCTCTTGTCACTTAAA	5-10-5	93	3417	3436	346
547274	29	48	GAGGTGAGTCTTGTCACT	5-10-5	70	3421	3440	347
546136	30	49	GGAGGTGAGTCTTGTCTCAC	5-10-5	86	3422	3441	348
547275	32	51	TTGGAGGTGAGTCTTGTCTC	5-10-5	87	3424	3443	349
546137	40	59	ATTGCTTCTTGGAGGTGAGT	5-10-5	76	3432	3451	350
547276	42	61	CAATTGCTTCTTGGAGGTGA	5-10-5	93	3434	3453	351
547277	44	63	CACAATTGCTTCTTGGAGGT	5-10-5	75	3436	3455	352
547278	45	64	ACACAATTGCTTCTTGGAGG	5-10-5	70	3437	3456	353
546138	47	66	AAACACAATTGCTTCTTGGGA	5-10-5	69	3439	3458	354
547279	48	67	AAAACACAATTGCTTCTTGG	5-10-5	69	3440	3459	355
547280	49	68	GAAAACACAATTGCTTCTTG	5-10-5	47	3441	3460	356
547281	70	89	TTGCTTGAATAAAATCATT	5-10-5	41	4069	4088	357
546140	72	91	GCTTGCTTGAATAAAATCAT	5-10-5	60	4071	4090	358

【1 2 5 1】

10

20

30

40

50

【表 1 1 5 - 2】

547282	74	93	TTGCTTGCTTGAATAAAATC	5-10-5	53	4073	4092	359
547283	76	95	AGTTGCTTGCTTGAATAAAA	5-10-5	67	4075	4094	360
546141	82	101	GAAATAAGTTGCTTGCTTGA	5-10-5	56	4081	4100	361
547284	86	105	AAATGAAATAAGTTGCTTGC	5-10-5	26	4085	4104	362
547285	102	121	ACTGTAGCAACAAGGAAAT	5-10-5	51	4101	4120	363
546143	106	125	GGAAACTGTAGCAACAAGG	5-10-5	46	4105	4124	364
546144	110	129	CACAGGAAACTGTAGCAAAC	5-10-5	75	4109	4128	365
547286	117	136	AGACATCCACAGGAACTGT	5-10-5	68	該当なし	該当なし	366
547287	120	139	GTCAGACATCCACAGGAAAC	5-10-5	69	該当なし	該当なし	367
546146	123	142	TGAGTCAGACATCCACAGGA	5-10-5	72	該当なし	該当なし	368
547288	131	150	CATAGAGTTGAGTCAGACAT	5-10-5	80	8003	8022	369
546147	132	151	TCATAGAGTTGAGTCAGACA	5-10-5	76	8004	8023	370
547289	133	152	TTCATAGAGTTGAGTCAGAC	5-10-5	74	8005	8024	371
546148	137	156	CGTTTTCATAGAGTTGAGTC	5-10-5	68	8009	8028	372
546149	155	174	CCCCACCTCTGAAGAAGGCG	5-10-5	83	8027	8046	373
546150	158	177	CATCCCCACCTCTGAAGAAG	5-10-5	58	8030	8049	374
547290	163	182	AGCTACATCCCCACCTCTGA	5-10-5	76	8035	8054	375
546151	166	185	GGAAGCTACATCCCCACCTC	5-10-5	76	8038	8057	376
547291	168	187	ATGGAAGCTACATCCCCACC	5-10-5	74	8040	8059	377
547292	171	190	TACATGGAAGCTACATCCCC	5-10-5	60	8043	8062	378
546152	172	191	GTACATGGAAGCTACATCCC	5-10-5	73	8044	8063	379
546153	176	195	GGGTGTACATGGAAGCTACA	5-10-5	76	8048	8067	380
546154	195	214	TGGCAGTATTGGGCATTGG	5-10-5	85	8067	8086	381
547293	199	218	CATCTGGCAGTATTGGGCAT	5-10-5	92	8071	8090	382
547294	201	220	CTCATCTGGCAGTATTGGGC	5-10-5	85	8073	8092	383
546155	202	221	CCTCATCTGGCAGTATTGGG	5-10-5	47	8074	8093	384
547295	203	222	ACCTCATCTGGCAGTATTGG	5-10-5	88	8075	8094	385
547296	206	225	TGCACCTCATCTGGCAGTAT	5-10-5	72	8078	8097	386
546156	211	230	GAATGTGCACCTCATCTGGC	5-10-5	81	8083	8102	387
547297	213	232	TGGAATGTGCACCTCATCTG	5-10-5	84	8085	8104	388
546157	216	235	GGGTGGAATGTGCACCTCAT	5-10-5	85	8088	8107	389
547298	218	237	TTGGGTGGAATGTGCACCTC	5-10-5	90	8090	8109	390
546158	219	238	CTTGGGTGGAATGTGCACCT	5-10-5	95	8091	8110	391
546159	229	248	TAGCAACACCTTGGGTGGA	5-10-5	76	8101	8120	392
546160	235	254	ACTGAATAGCAACACCTTG	5-10-5	78	8107	8126	393
547299	237	256	AAACTGAATAGCAACACCT	5-10-5	76	8109	8128	394
546163	250	269	ACTTGCTGGAAGAAAACCTGA	5-10-5	42	8122	8141	395
547300	252	271	GAACTTGCTGGAAGAAAACCT	5-10-5	37	8124	8143	396
546164	257	276	TGATTGAACTTGCTGGAAGA	5-10-5	33	8129	8148	397

【 1 2 5 2】

10

20

30

40

50

【表 1 1 5 - 3】

546165	260	279	CATTGATTGAACTTGCTGGA	5-10-5	71	8132	8151	398
547301	261	280	TCATTGATTGAACTTGCTGG	5-10-5	80	8133	8152	399
546166	263	282	TGTCATTGATTGAACTTGCT	5-10-5	70	8135	8154	400
547302	266	285	CCATGTCATTGATTGAACTT	5-10-5	58	8138	8157	401
546167	268	287	CTCCATGTCATTGATTGAAC	5-10-5	73	8140	8159	402
547303	270	289	TTCTCCATGTCATTGATTGA	5-10-5	72	8142	8161	403
547304	273	292	CTTTTCTCCATGTCATTGAT	5-10-5	71	8145	8164	404
547305	280	299	ACCAAACCTTTTCTCCATGT	5-10-5	47	該当なし	該当なし	405
546170	283	302	GCAACCAAACCTTTTCTCCA	5-10-5	54	該当なし	該当なし	406
547306	284	303	AGCAACCAAACCTTTTCTCC	5-10-5	62	該当なし	該当なし	407
547307	286	305	GAAGCAACCAAACCTTTTCT	5-10-5	58	該当なし	該当なし	408
547308	290	309	TCAAGAAGCAACCAAACCTT	5-10-5	66	該当なし	該当なし	409
547309	293	312	CTTTCAAGAAGCAACCAAAC	5-10-5	71	9827	9846	410
547310	295	314	ATCTTTCAAGAAGCAACCAA	5-10-5	81	9829	9848	411
546171	297	316	CTATCTTTCAAGAAGCAACC	5-10-5	81	9831	9850	412
547311	299	318	CACTATCTTTCAAGAAGCAA	5-10-5	71	9833	9852	413
546172	301	320	AACACTATCTTTCAAGAAGC	5-10-5	81	9835	9854	414
547312	325	344	ATGTACTTTTGGCAGGGTTC	5-10-5	46	9859	9878	415
546173	327	346	CGATGTACTTTTGGCAGGGT	5-10-5	84	9861	9880	416
547313	330	349	GTTGATGTACTTTTGGCAG	5-10-5	73	9864	9883	417

【1 2 5 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 1】

表 1 2 7

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	86	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546174	333	352	CCTGTTTCGATGTACTTTTGG	5-10-5	74	9867	9886	418
547314	336	355	GCACCTGTTTCGATGTACTTT	5-10-5	73	9870	9889	419
546175	338	357	CTGCACCTGTTTCGATGTACT	5-10-5	78	9872	9891	420
547315	340	359	AACTGCACCTGTTTCGATGTA	5-10-5	50	9874	9893	421
547316	342	361	GAAACTGCACCTGTTTCGATG	5-10-5	75	9876	9895	422
547317	344	363	CAGAACTGCACCTGTTTCGA	5-10-5	75	9878	9897	423
547318	345	364	CCAGAACTGCACCTGTTTCG	5-10-5	74	9879	9898	424
546177	348	367	TGTCCAGAACTGCACCTGT	5-10-5	75	9882	9901	425
547319	351	370	GAATGTCCAGAACTGCACC	5-10-5	62	9885	9904	426
547320	353	372	AGGAATGTCCAGAACTGCA	5-10-5	73	9887	9906	427
547321	356	375	TCAAGGAATGTCCAGAACT	5-10-5	53	9890	9909	428
547322	358	377	CTTCAAGGAATGTCCAGAAA	5-10-5	65	9892	9911	429
547323	361	380	TTGCTTCAAGGAATGTCCAG	5-10-5	56	9895	9914	430
547324	363	382	CATTGCTTCAAGGAATGTCC	5-10-5	76	9897	9916	431
547325	368	387	GACCACATTGCTTCAAGGAA	5-10-5	67	9902	9921	432
546181	369	388	TGACCACATTGCTTCAAGGA	5-10-5	75	9903	9922	433
547326	370	389	ATGACCACATTGCTTCAAGG	5-10-5	48	9904	9923	434
547327	373	392	TTGATGACCACATTGCTTCA	5-10-5	45	9907	9926	435

【 1 2 5 4】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 2】

547328	375	394	ATTTGATGACCACATTGCTT	5-10-5	40	9909	9928	436
547329	377	396	TTATTTGATGACCACATTGC	5-10-5	24	9911	9930	437
547330	378	397	CTTATTTGATGACCACATTG	5-10-5	60	9912	9931	438
546183	380	399	CACTTATTTGATGACCACAT	5-10-5	69	9914	9933	439
547331	382	401	AGCACTTATTTGATGACCAC	5-10-5	47	該当なし	該当なし	440
546184	384	403	CAAGCACTTATTTGATGACC	5-10-5	65	該当なし	該当なし	441
547332	390	409	CGATGGCAAGCACTTATTTG	5-10-5	44	該当なし	該当なし	442
547333	395	414	TGTCTCGATGGCAAGCACTT	5-10-5	76	該当なし	該当なし	443
546186	396	415	ATGTCTCGATGGCAAGCACT	5-10-5	84	該当なし	該当なし	444
547334	397	416	AATGTCTCGATGGCAAGCAC	5-10-5	74	該当なし	該当なし	445
547335	402	421	TTATAAATGTCTCGATGGCA	5-10-5	93	12658	12677	446
547336	403	422	TTTATAAATGTCTCGATGGC	5-10-5	81	12659	12678	447
546188	407	426	CTCCTTTATAAATGTCTCGA	5-10-5	95	12663	12682	448
547337	409	428	AACTCCTTTATAAATGTCTC	5-10-5	84	12665	12684	449
547338	411	430	TCAACTCCTTTATAAATGTC	5-10-5	71	12667	12686	450
547339	413	432	TATCAACTCCTTTATAAATG	5-10-5	42	12669	12688	451
546190	419	438	CTCTCATATCAACTCCTTTA	5-10-5	92	12675	12694	452
547340	422	441	CTCCTCTCATATCAACTCCT	5-10-5	93	12678	12697	453
547341	424	443	GACTCCTCTCATATCAACTC	5-10-5	87	12680	12699	454
546192	428	447	AATTGACTCCTCTCATATCA	5-10-5	51	12684	12703	455
547342	433	452	ATTAAATGACTCCTCTCA	5-10-5	66	12689	12708	456
546193	434	453	CATTAATGACTCCTCTC	5-10-5	57	12690	12709	457
547343	436	455	CACATTAATGACTCCTC	5-10-5	78	12692	12711	458
547344	438	457	GACACATTAATGACTCC	5-10-5	80	12694	12713	459
547345	439	458	AGACACATTAATGACTC	5-10-5	80	12695	12714	460
547346	444	463	ACCTTAGACACATTAAT	5-10-5	57	12700	12719	461
546195	448	467	GCTAACCTTAGACACATTA	5-10-5	83	12704	12723	462
547347	451	470	ACTGCTAACCTTAGACACAT	5-10-5	82	12707	12726	463
546196	452	471	CACTGCTAACCTTAGACACA	5-10-5	83	12708	12727	464
547348	453	472	ACACTGCTAACCTTAGACAC	5-10-5	83	12709	12728	465
547349	458	477	CTTCAACTGCTAACCTTA	5-10-5	88	12714	12733	466
546198	459	478	TCTTCAACTGCTAACCTT	5-10-5	85	12715	12734	467
547350	464	483	GGCATTCTTCAACTGCTA	5-10-5	96	12720	12739	468
546199	465	484	TGGCATTCTTCAACTGCT	5-10-5	97	12721	12740	469
547351	467	486	TTTGGCATTCTTCAACTG	5-10-5	92	12723	12742	470
546200	500	519	AAAAGTGGCAGCGAATGTTA	5-10-5	91	12756	12775	471
547352	541	560	CCGGTACTCTGCCTTGTGAA	5-10-5	94	12797	12816	472
547354	547	566	ATTGTTCCGGTACTCTGCCT	5-10-5	89	該当なし	該当なし	473
546203	548	567	AATTGTTCCGGTACTCTGCC	5-10-5	76	該当なし	該当なし	474

【 1 2 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 3】

547355	549	568	CAATTGTTCCGGTACTCTGC	5-10-5	77	該当なし	該当なし	475
546204	555	574	AATAGGCAATTGTTCCGGTA	5-10-5	91	該当なし	該当なし	476
547356	556	575	TAATAGGCAATTGTTCCGGT	5-10-5	83	該当なし	該当なし	477
547357	559	578	CTTTAATAGGCAATTGTTCC	5-10-5	78	14130	14149	478
546205	562	581	GTACTTTAATAGGCAATTGT	5-10-5	83	14133	14152	479
547359	569	588	CGGGACTGTACTTTAATAGG	5-10-5	81	14140	14159	480
546208	605	624	CGTTACTCAGCACCTTTATA	5-10-5	92	14176	14195	481
546209	629	648	GCTTCAGTGAGAATCCAGAT	5-10-5	73	14200	14219	482
546210	651	670	CCAATTTCTGAAAGGGCACA	5-10-5	79	14222	14241	483
547360	653	672	AACCAATTTCTGAAAGGGCA	5-10-5	88	該当なし	該当なし	484
547361	655	674	GCAACCAATTTCTGAAAGGG	5-10-5	46	該当なし	該当なし	485
546211	656	675	GGCAACCAATTTCTGAAAGG	5-10-5	42	該当なし	該当なし	486
546212	678	697	AGATGCTGGAAGATGTTTCAT	5-10-5	48	26126	26145	487
547362	701	720	CAACATCCACATCTGAGAAC	5-10-5	47	26149	26168	488
547363	703	722	GGCAACATCCACATCTGAGA	5-10-5	84	26151	26170	489
546213	707	726	CCCTGGCAACATCCACATCT	5-10-5	82	26155	26174	490

10

20

【 1 2 5 6】

30

40

50

【表 1 1 6 - 4】

表 1 2 8

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	88	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547364	710	729	GAACCCTGGCAACATCCACA	5-10-5	92	26158	26177	491
546214	712	731	GAGAACCCTGGCAACATCCA	5-10-5	88	26160	26179	492
547365	713	732	TGAGAACCCTGGCAACATCC	5-10-5	81	26161	26180	493
547366	717	736	GGAGTGAGAACCCTGGCAAC	5-10-5	86	26165	26184	494
546216	719	738	CTGGAGTGAGAACCCTGGCA	5-10-5	93	26167	26186	495
547367	721	740	ATCTGGAGTGAGAACCCTGG	5-10-5	76	26169	26188	496
547368	723	742	GCATCTGGAGTGAGAACCCT	5-10-5	89	26171	26190	497
547369	725	744	AAGCATCTGGAGTGAGAACC	5-10-5	76	26173	26192	498
547370	728	747	CAAAAGCATCTGGAGTGAGA	5-10-5	73	26176	26195	499
546217	730	749	CACAAAAGCATCTGGAGTGA	5-10-5	83	26178	26197	500
546218	740	759	TGGTCCGACACACAAAAGCA	5-10-5	71	26188	26207	501
547371	741	760	ATGGTCCGACACACAAAAGC	5-10-5	66	26189	26208	502
547372	742	761	GATGGTCCGACACACAAAAG	5-10-5	32	26190	26209	503
547373	745	764	GCAGATGGTCCGACACACAA	5-10-5	90	26193	26212	504
546220	750	769	TAGGTGCAGATGGTCCGACA	5-10-5	71	26198	26217	505
547374	752	771	GATAGGTGCAGATGGTCCGA	5-10-5	81	26200	26219	506
547375	754	773	GTGATAGGTGCAGATGGTCC	5-10-5	72	26202	26221	507

【 1 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 7】

546222	756	775	GGGTGATAGGTGCAGATGGT	5-10-5	12	26204	26223	508
547376	778	797	GAATGTAAAGAAGAGGCAGT	5-10-5	43	26226	26245	509
546224	780	799	TAGAAATGTAAAGAAGAGGCA	5-10-5	65	26228	26247	510
547377	788	807	CATTTGTATAGAATGTAAAG	5-10-5	6	26236	26255	511
547378	790	809	TACATTTGTATAGAATGTAA	5-10-5	0	26238	26257	512
546226	793	812	CCATACATTTGTATAGAATG	5-10-5	37	26241	26260	513
547379	802	821	CTCGATTTTCCATACATTTG	5-10-5	37	26250	26269	514
547380	805	824	TGACTCGATTTTCCATACAT	5-10-5	42	26253	26272	515
546228	806	825	GTGACTCGATTTTCCATACA	5-10-5	60	26254	26273	516
547381	807	826	TGTGACTCGATTTTCCATAC	5-10-5	49	26255	26274	517
547382	810	829	CTTGTGACTCGATTTTCCA	5-10-5	62	26258	26277	518
547383	812	831	TTCTTTGTGACTCGATTTTC	5-10-5	37	該当なし	該当なし	519
546229	816	835	ACATTTCTTTGTGACTCGAT	5-10-5	19	該当なし	該当なし	520
547384	818	837	AAACATTTCTTTGTGACTCG	5-10-5	50	該当なし	該当なし	521
547385	847	866	TGTGCCACTTTCAGATGTTT	5-10-5	80	27111	27130	522
546230	848	867	GTGTGCCACTTTCAGATGTT	5-10-5	70	27112	27131	523
546231	852	871	CTTGGTGTGCCACTTTCAGA	5-10-5	79	27116	27135	524
547386	853	872	ACTTGGTGTGCCACTTTCAG	5-10-5	78	27117	27136	525
546232	857	876	AGGAACTTGGTGTGCCACTT	5-10-5	86	27121	27140	526
547387	878	897	TGGTGTTTTCTTGAGGAGTA	5-10-5	73	27142	27161	527
546233	879	898	ATGGTGTTTTCTTGAGGAGT	5-10-5	69	27143	27162	528
547388	880	899	TATGGTGTTTTCTTGAGGAG	5-10-5	55	27144	27163	529
547389	884	903	CAGATATGGTGTTTTCTTGA	5-10-5	61	27148	27167	530
546234	885	904	CCAGATATGGTGTTTTCTTG	5-10-5	69	27149	27168	531
547390	887	906	ATCCAGATATGGTGTTTTCT	5-10-5	63	27151	27170	532
547391	889	908	ATATCCAGATATGGTGTTTT	5-10-5	32	27153	27172	533
546235	893	912	GGCTATATCCAGATATGGTG	5-10-5	77	27157	27176	534
547392	895	914	AAGGCTATATCCAGATATGG	5-10-5	81	27159	27178	535
546236	900	919	GTTAAAAGGCTATATCCAGA	5-10-5	50	27164	27183	536
546237	903	922	CAGGTAAAAGGCTATATCC	5-10-5	64	27167	27186	537
547393	905	924	TGCAGGTAAAAGGCTATAT	5-10-5	73	27169	27188	538
547394	907	926	TTTGCAGGTAAAAGGCTAT	5-10-5	29	27171	27190	539
546238	909	928	CTTTGCAGGTAAAAGGCT	5-10-5	63	27173	27192	540
546239	912	931	GTTCTTTTGCAGGTAAAAG	5-10-5	47	27176	27195	541
547395	914	933	AAGTTCTTTTGCAGGTAAA	5-10-5	15	27178	27197	542
546240	917	936	GTAAAGTTCTTTGCAGGTT	5-10-5	23	27181	27200	543
546241	920	939	CAGGTAAAGTTCTTTGCAG	5-10-5	69	27184	27203	544
547396	921	940	TCAGGTAAAGTTCTTTGCA	5-10-5	49	該当なし	該当なし	545
547397	923	942	GTTCAAGTAAAGTTCTTTTG	5-10-5	27	該当なし	該当なし	546

【1 2 5 8】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 8】

546242	925	944	GGGTTTCAGGTAAAGTTCTTT	5-10-5	8	該当なし	該当なし	547
547398	927	946	CAGGGTTCAGGTAAAGTTCT	5-10-5	16	該当なし	該当なし	548
547399	928	947	GCAGGGTTCAGGTAAAGTTC	5-10-5	10	該当なし	該当なし	549
547400	930	949	TGGCAGGGTTCAGGTAAAGT	5-10-5	0	該当なし	該当なし	550
547401	933	952	GAATGGCAGGGTTCAGGTAA	5-10-5	22	該当なし	該当なし	551
546243	934	953	AGAATGGCAGGGTTCAGGTA	5-10-5	16	該当なし	該当なし	552
547402	937	956	TTTGAATGGCAGGGTTCAG	5-10-5	59	該当なし	該当なし	553
547403	939	958	ATTTTAGAATGGCAGGGTTC	5-10-5	10	27361	27380	554
546244	942	961	TAAATTTTAGAATGGCAGGG	5-10-5	27	27364	27383	555
547404	956	975	AGTCAACTCCCGGGTAAATT	5-10-5	64	27378	27397	556
547405	959	978	CAAAGTCAACTCCCGGGTAA	5-10-5	47	27381	27400	557
546247	960	979	CCAAAGTCAACTCCCGGGTA	5-10-5	90	27382	27401	558
546248	963	982	CCTCCAAAGTCAACTCCCGG	5-10-5	86	27385	27404	559
547406	965	984	CTCCTCCAAAGTCAACTCCC	5-10-5	81	27387	27406	560
546249	968	987	CTTCTCCTCCAAAGTCAACT	5-10-5	68	27390	27409	561
547407	975	994	TTCAATTCTTCTCCTCCAAA	5-10-5	59	27397	27416	562
546250	977	996	CATTCAATTCTTCTCCTCCA	5-10-5	65	27399	27418	563
547408	980	999	TCACATTCAATTCTTCTCCT	5-10-5	84	27402	27421	564
547409	982	1001	AGTCACATTCAATTCTTCTC	5-10-5	67	27404	27423	565
546251	1007	1026	GGCAAACATTCACTCCTTTA	5-10-5	92	27429	27448	566

【1 2 5 9】

10

20

30

40

50

【表 1 1 7 - 1】

表 1 2 9

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	95	14744	14763	344
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546252	1011	1030	TCTTGGCAAACATTCACTCC	5-10-5	73	27433	27452	567
546253	1014	1033	GTCTCTTGGCAAACATTCAC	5-10-5	98	27436	27455	568
547410	1017	1036	CAAGTCTCTTGGCAAACATT	5-10-5	88	27439	27458	569
546254	1019	1038	TGCAAGTCTCTTGGCAAACA	5-10-5	95	27441	27460	570
546255	1024	1043	CTTTGTGCAAGTCTCTTGGC	5-10-5	92	27446	27465	571
547411	1027	1046	CATCTTTGTGCAAGTCTCTT	5-10-5	79	27449	27468	572
546256	1028	1047	TCATCTTTGTGCAAGTCTCT	5-10-5	83	27450	27469	573
547412	1029	1048	ATCATCTTTGTGCAAGTCTC	5-10-5	73	27451	27470	574
546258	1036	1055	ACAGCGAATCATCTTTGTGC	5-10-5	74	27458	27477	575
546259	1040	1059	ACTGACAGCGAATCATCTTT	5-10-5	86	27462	27481	576
546260	1045	1064	GAAAACTGACAGCGAATCA	5-10-5	84	27467	27486	577
547413	1047	1066	GTGAAAACTGACAGCGAAT	5-10-5	94	27469	27488	578
546263	1061	1080	GGAGTAAAGAATAAGTGAAA	5-10-5	0	27483	27502	579
547414	1063	1082	TGGGAGTAAAGAATAAGTGA	5-10-5	76	27485	27504	580
547415	1065	1084	TCTGGGAGTAAAGAATAAGT	5-10-5	71	27487	27506	581
546265	1069	1088	GTCTTCTGGGAGTAAAGAAT	5-10-5	65	27491	27510	582
546266	1072	1091	ACAGTCTTCTGGGAGTAAAG	5-10-5	63	27494	27513	583

【 1 2 6 0】

10

20

30

40

50

【表 1 1 7 - 2】

547416	1075	1094	CTTACAGTCTTCTGGGAGTA	5-10-5	79	27497	27516	584
546267	1076	1095	CCTTACAGTCTTCTGGGAGT	5-10-5	72	27498	27517	585
547417	1077	1096	TCCTTACAGTCTTCTGGGAG	5-10-5	68	27499	27518	586
546268	1079	1098	CTTCCTTACAGTCTTCTGGG	5-10-5	93	27501	27520	587
547418	1092	1111	CACTTACACTTCTCTTCCTT	5-10-5	0	該当なし	該当なし	588
546270	1093	1112	ACACTTACACTTCTCTTCCT	5-10-5	32	該当なし	該当なし	589
546271	1097	1116	AGAAACACTTACACTTCTCT	5-10-5	60	該当なし	該当なし	590
547419	1101	1120	CTTAAGAAACACTTACACTT	5-10-5	51	該当なし	該当なし	591
547420	1112	1131	CCATAGATAATCTTAAGAAA	5-10-5	8	27633	27652	592
547421	1115	1134	CATCCATAGATAATCTTAAG	5-10-5	69	27636	27655	593
547422	1117	1136	ACCATCCATAGATAATCTTA	5-10-5	70	27638	27657	594
546275	1119	1138	GAACCATCCATAGATAATCT	5-10-5	87	27640	27659	595
546276	1123	1142	TGGAGAACCATCCATAGATA	5-10-5	74	27644	27663	596
546277	1146	1165	TGTGTCCCATACGCAATCCT	5-10-5	90	27667	27686	597
547423	1150	1169	CCCTTGTGTCCCATACGCAA	5-10-5	95	27671	27690	598
546279	1153	1172	GCTCCCTGTGTCCCATACG	5-10-5	82	27674	27693	599
547424	1156	1175	AGAGCTCCCTTGTGTCCCAT	5-10-5	90	27677	27696	600
546280	1158	1177	CCAGAGCTCCCTTGTGTCCC	5-10-5	86	27679	27698	601
547425	1161	1180	TAACCAGAGCTCCCTTGTGT	5-10-5	85	27682	27701	602
546281	1162	1181	GTAACCAGAGCTCCCTTGTG	5-10-5	85	27683	27702	603
547426	1164	1183	GAGTAACCAGAGCTCCCTTG	5-10-5	92	27685	27704	604
547427	1166	1185	AAGAGTAACCAGAGCTCCCT	5-10-5	79	27687	27706	605
547428	1169	1188	TCAAAGAGTAACCAGAGCTC	5-10-5	78	27690	27709	606
546283	1171	1190	TCTCAAAGAGTAACCAGAGC	5-10-5	88	27692	27711	607
547429	1173	1192	AATCTCAAAGAGTAACCAGA	5-10-5	81	27694	27713	608
547430	1174	1193	CAATCTCAAAGAGTAACCAG	5-10-5	70	27695	27714	609
546284	1176	1195	CACAATCTCAAAGAGTAACC	5-10-5	89	27697	27716	610
546285	1180	1199	GTTACACAATCTCAAAGAGT	5-10-5	76	27701	27720	611
547431	1184	1203	CAGTGTTACACAATCTCAAA	5-10-5	67	27705	27724	612
547432	1186	1205	CCCAGTGTTACACAATCTCA	5-10-5	90	27707	27726	613
547433	1189	1208	GTCCCCAGTGTTACACAATC	5-10-5	63	27710	27729	614
546287	1192	1211	GTTGTCCCAGTGTTACACA	5-10-5	82	27713	27732	615
546288	1240	1259	GTTTGTTCTCCAACAATGC	5-10-5	78	27916	27935	616
547434	1243	1262	AGAGTTTGTTCCTCCAACAA	5-10-5	54	27919	27938	617
547435	1248	1267	CAAGAAGAGTTTGTTCCTCC	5-10-5	85	27924	27943	618
546290	1251	1270	CCCCAAGAAGAGTTTGTTC	5-10-5	86	27927	27946	619
547436	1253	1272	CTCCCCAAGAAGAGTTTGTT	5-10-5	0	27929	27948	620
547437	1255	1274	CTCTCCCCAAGAAGAGTTTG	5-10-5	50	27931	27950	621
547438	1261	1280	GGGCCACTCTCCCCAAGAAG	5-10-5	82	27937	27956	622

【1 2 6 1】

10

20

30

40

50

【表 1 1 7 - 3】

546291	1263	1282	CAGGGCCACTCTCCCCAAGA	5-10-5	81	27939	27958	623
547439	1298	1317	TCTGAGCTGTCAGCTTCACC	5-10-5	85	27974	27993	624
546293	1301	1320	GCCTCTGAGCTGTCAGCTTC	5-10-5	64	27977	27996	625
547440	1327	1346	TCCTATGAGTGACCCTCCAC	5-10-5	67	28003	28022	626
546294	1328	1347	GTCTATGAGTGACCCTCCA	5-10-5	72	28004	28023	627
547441	1331	1350	GGTGTCTATGAGTGACCCT	5-10-5	62	28007	28026	628
547442	1332	1351	TGGTGTCTATGAGTGACCC	5-10-5	42	28008	28027	629
547443	1336	1355	CCACTGGTGTCTATGAGTG	5-10-5	70	28012	28031	630
546295	1337	1356	CCCACTGGTGTCTATGAGT	5-10-5	67	28013	28032	631
546296	1370	1389	GAAGCCCATCAAAGCAGTGG	5-10-5	27	該当なし	該当なし	632
546297	1397	1416	TATAGATGCGCCAAACATCC	5-10-5	82	30475	30494	633
547444	1398	1417	CTATAGATGCGCCAAACATC	5-10-5	71	30476	30495	634
547445	1402	1421	GCCACTATAGATGCGCCAAA	5-10-5	97	30480	30499	635
546299	1404	1423	ATGCCACTATAGATGCGCCA	5-10-5	84	30482	30501	636
546300	1424	1443	TAATGTCTGACAGATTTAAA	5-10-5	58	30502	30521	637
546301	1427	1446	TTGTAATGTCTGACAGATTT	5-10-5	93	30505	30524	638
546302	1444	1463	TGAGAAAGGTGTATCTTTTG	5-10-5	87	30522	30541	639
547446	1447	1466	TTGTGAGAAAGGTGTATCTT	5-10-5	84	30525	30544	640
546303	1448	1467	TTTGTGAGAAAGGTGTATCT	5-10-5	77	30526	30545	641
547447	1449	1468	ATTTGTGAGAAAGGTGTATC	5-10-5	80	30527	30546	642

10

20

【 1 2 6 2】

30

40

50

【表 1 1 8 - 1】

表 1 3 0

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	96	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547448	1451	1470	TTATTTGTGAGAAAGGTGTA	5-10-5	75	30529	30548	643
547449	1453	1472	TTTTATTTGTGAGAAAGGTG	5-10-5	71	30531	30550	644
546304	1454	1473	CTTTATTTGTGAGAAAGGT	5-10-5	94	30532	30551	645
547450	1456	1475	CTCTTTTATTTGTGAGAAAG	5-10-5	71	30534	30553	646
547451	1471	1490	TTGGTGAATAAATCTCTT	5-10-5	75	30549	30568	647
546306	1472	1491	TTTGGTGAATAAATCTCT	5-10-5	65	30550	30569	648
547452	1474	1493	GTTTGGTGAATAAATCT	5-10-5	47	30552	30571	649
546307	1478	1497	TATAGTTTGGTGAATAATA	5-10-5	12	30556	30575	650
546308	1482	1501	ACTTTATAGTTTGGTGAAT	5-10-5	57	30560	30579	651
546309	1492	1511	CCCTTCTGAGACTTTATAGT	5-10-5	88	30570	30589	652
546310	1496	1515	GATTCCTTCTGAGACTTTA	5-10-5	78	30574	30593	653
546311	1499	1518	CATGATTCCCTTCTGAGACT	5-10-5	79	30577	30596	654
547453	1500	1519	TCATGATTCCCTTCTGAGAC	5-10-5	81	30578	30597	655
547454	1502	1521	TATCATGATTCCCTTCTGAG	5-10-5	92	30580	30599	656
547455	1503	1522	ATATCATGATTCCCTTCTGA	5-10-5	88	30581	30600	657
547456	1506	1525	GCGATATCATGATTCCCTTC	5-10-5	89	30584	30603	658
546313	1507	1526	GGCGATATCATGATTCCCTT	5-10-5	60	30585	30604	659

【 1 2 6 3】

10

20

30

40

50

【表 1 1 8 - 2】

547457	1509	1528	AAGGCGATATCATGATCC	5-10-5	89	30587	30606	660
547458	1513	1532	TATCAAGGCGATATCATGAT	5-10-5	84	30591	30610	661
547459	1519	1538	GAGTTTATCAAGGCGATAT	5-10-5	28	30597	30616	662
547460	1522	1541	CTGGAGTTTATCAAGGCGA	5-10-5	72	30600	30619	663
546316	1524	1543	GCCTGGAGTTTATCAAGGC	5-10-5	51	30602	30621	664
546317	1528	1547	AGGAGCCTGGAGTTTATCA	5-10-5	12	30606	30625	665
546318	1534	1553	ATTCAAAGGAGCCTGGAGTT	5-10-5	47	30612	30631	666
547461	1537	1556	GTAATTCAAAGGAGCCTGGA	5-10-5	49	30615	30634	667
547462	1539	1558	GTGTAATTCAAAGGAGCCTG	5-10-5	59	30617	30636	668
546319	1541	1560	CAGTGTAATTCAAAGGAGCC	5-10-5	50	30619	30638	669
547463	1564	1583	TAGGCATATTGGTTTTGGA	5-10-5	74	31870	31889	670
546320	1566	1585	GGTAGGCATATTGGTTTTG	5-10-5	72	31872	31891	671
546321	1569	1588	GAAGGTAGGCATATTGGTTT	5-10-5	53	31875	31894	672
546322	1584	1603	CTTGTGTACCTTTGGAAGG	5-10-5	74	31890	31909	673
547464	1585	1604	GCTTGTGTACCTTTGGAAG	5-10-5	95	31891	31910	674
546323	1587	1606	GTGCTTGTGTACCTTTGGA	5-10-5	94	31893	31912	675
547465	1592	1611	AAATTGTGCTTGTGTACCT	5-10-5	88	31898	31917	676
547466	1596	1615	GTATAAATTGTGCTTGTGTC	5-10-5	82	31902	31921	677
546324	1597	1616	GGTATAAATTGTGCTTGTGT	5-10-5	73	31903	31922	678
547467	1598	1617	TGGTATAAATTGTGCTTGTG	5-10-5	80	31904	31923	679
547468	1600	1619	GTTGGTATAAATTGTGCTTG	5-10-5	61	31906	31925	680
546325	1602	1621	CAGTTGGTATAAATTGTGCT	5-10-5	74	31908	31927	681
546326	1607	1626	CCCAACAGTTGGTATAAATT	5-10-5	62	31913	31932	682
547469	1610	1629	TTACCCAACAGTTGGTATAA	5-10-5	67	31916	31935	683
546327	1612	1631	GGTTACCCAACAGTTGGTAT	5-10-5	95	31918	31937	684
546328	1624	1643	GAAGCCCCATCCGGTTACCC	5-10-5	84	31930	31949	685
547470	1628	1647	TCGAGAAGCCCCATCCGGTT	5-10-5	70	31934	31953	686
546329	1631	1650	CCTTCGAGAAGCCCCATCCG	5-10-5	18	31937	31956	687
546330	1636	1655	TTTCTCCTTCGAGAAGCCCC	5-10-5	55	31942	31961	688
547471	1638	1657	CCTTTCTCCTTCGAGAAGCC	5-10-5	58	31944	31963	689
547472	1641	1660	TCACCTTTCTCCTTCGAGAA	5-10-5	44	該当なし	該当なし	690
546331	1642	1661	TTCACCTTTCTCCTTCGAGA	5-10-5	59	該当なし	該当なし	691
547473	1649	1668	TTTGGATTTCACCTTTCTCC	5-10-5	5	該当なし	該当なし	692
547474	1659	1678	TGTAGAATATTTGGATTTC	5-10-5	51	33103	33122	693
547475	1686	1705	TTTGTACCAAAGGAATATT	5-10-5	44	33130	33149	694
547476	1688	1707	CATTTGTTACCAAAGGAATA	5-10-5	75	33132	33151	695
546336	1689	1708	TCATTTGTTACCAAAGGAAT	5-10-5	66	33133	33152	696
547477	1692	1711	TCTTCATTTGTTACCAAAGG	5-10-5	74	33136	33155	697
547478	1695	1714	CATTCTTCATTTGTTACCAA	5-10-5	85	33139	33158	698

【 1 2 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 8 - 3】

546339	1712	1731	CTTGATATCTTTCTGGCAT	5-10-5	65	33156	33175	699
546340	1716	1735	TAATCTTGATATCTTTCTG	5-10-5	30	33160	33179	700
547479	1718	1737	TATAATCTTGATATCTTTTC	5-10-5	48	33162	33181	701
547480	1756	1775	TTCTTTATAGCCAGCACAGA	5-10-5	60	33200	33219	702
547481	1758	1777	CCTTCTTTATAGCCAGCACA	5-10-5	71	33202	33221	703
547482	1760	1779	CCCCTTCTTTATAGCCAGCA	5-10-5	90	33204	33223	704
546343	1761	1780	CCCCCTTCTTTATAGCCAGC	5-10-5	97	33205	33224	705
547483	1762	1781	TCCCCCTTCTTTATAGCCAG	5-10-5	71	33206	33225	706
546345	1773	1792	CAAGCATCTTTCCCCCTTC	5-10-5	86	33217	33236	707
546346	1796	1815	AGGGACCACCTGAATCTCCC	5-10-5	83	33895	33914	708
547484	1799	1818	CTAAGGGACCACCTGAATCT	5-10-5	69	33898	33917	709
546347	1800	1819	ACTAAGGGACCACCTGAATC	5-10-5	28	33899	33918	710
547485	1803	1822	CAAACCTAAGGGACCACCTGA	5-10-5	49	33902	33921	711
546348	1804	1823	GCAAACCTAAGGGACCACCTG	5-10-5	79	33903	33922	712
547486	1805	1824	TGCAAACCTAAGGGACCACCT	5-10-5	89	33904	33923	713
546349	1810	1829	GTGTTTGCAAACCTAAGGGAC	5-10-5	48	33909	33928	714
547487	1811	1830	TGTGTTTGCAAACCTAAGGGA	5-10-5	72	33910	33929	715
546350	1868	1887	CCCTGCGGGCACAGCCTTCA	5-10-5	88	33967	33986	716
546351	1873	1892	TTGCTCCCTGCGGGCACAGC	5-10-5	82	33972	33991	717
546352	1880	1899	CACCAGGTTGCTCCCTGCGG	5-10-5	75	33979	33998	718
547488	1881	1900	ACACCAGGTTGCTCCCTGCG	5-10-5	71	33980	33999	719

【 1 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 9 - 1】

表 1 3 1

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	72	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547448	1451	1470	TTATTTGTGAGAAAGGTGTA	5-10-5	83	30529	30548	643
547449	1453	1472	TTTTATTTGTGAGAAAGGTG	5-10-5	73	30531	30550	644
546304	1454	1473	CTTTATTTGTGAGAAAGGT	5-10-5	86	30532	30551	645
547450	1456	1475	CTCTTTTATTTGTGAGAAAG	5-10-5	67	30534	30553	646
547451	1471	1490	TTGGTGAATAAATCTCTT	5-10-5	64	30549	30568	647
546306	1472	1491	TTGGTGAATAAATCTCT	5-10-5	71	30550	30569	648
547452	1474	1493	GTTTTGGTGAATAAATCT	5-10-5	62	30552	30571	649
546307	1478	1497	TATAGTTTTGGTGAATAA	5-10-5	0	30556	30575	650
546308	1482	1501	ACTTTATAGTTTTGGTGAAT	5-10-5	43	30560	30579	651
546309	1492	1511	CCCTTCTGAGACTTTATAGT	5-10-5	81	30570	30589	652
546310	1496	1515	GATTCCCTTCTGAGACTTTA	5-10-5	67	30574	30593	653
546311	1499	1518	CATGATTCCCTTCTGAGACT	5-10-5	76	30577	30596	654
547453	1500	1519	TCATGATTCCCTTCTGAGAC	5-10-5	81	30578	30597	655
547454	1502	1521	TATCATGATTCCCTTCTGAG	5-10-5	78	30580	30599	656
547455	1503	1522	ATATCATGATTCCCTTCTGA	5-10-5	66	30581	30600	657
547456	1506	1525	GCGATATCATGATTCCCTTC	5-10-5	96	30584	30603	658
546313	1507	1526	GGCGATATCATGATTCCCTT	5-10-5	75	30585	30604	659

【 1 2 6 6】

10

20

30

40

50

【表 1 1 9 - 2】

547457	1509	1528	AAGGCGATATCATGATTCCC	5-10-5	92	30587	30606	660
547458	1513	1532	TATCAAGGCGATATCATGAT	5-10-5	64	30591	30610	661
547459	1519	1538	GAGTTTTATCAAGGCGATAT	5-10-5	51	30597	30616	662
547460	1522	1541	CTGGAGTTTTATCAAGGCGA	5-10-5	75	30600	30619	663
546316	1524	1543	GCCTGGAGTTTTATCAAGGC	5-10-5	60	30602	30621	664
546317	1528	1547	AGGAGCCTGGAGTTTTATCA	5-10-5	31	30606	30625	665
546318	1534	1553	ATTCAAAGGAGCCTGGAGTT	5-10-5	46	30612	30631	666
547461	1537	1556	GTAATTCAAAGGAGCCTGGA	5-10-5	55	30615	30634	667
547462	1539	1558	GTGTAATTCAAAGGAGCCTG	5-10-5	54	30617	30636	668
546319	1541	1560	CAGTGTAATTCAAAGGAGCC	5-10-5	61	30619	30638	669
547463	1564	1583	TAGGCATATTGGTTTTTGA	5-10-5	84	31870	31889	670
546320	1566	1585	GGTAGGCATATTGGTTTTTG	5-10-5	69	31872	31891	671
546321	1569	1588	GAAGGTAGGCATATTGGTTT	5-10-5	56	31875	31894	672
546322	1584	1603	CTTGTGTACCTTTGGAAGG	5-10-5	68	31890	31909	673
547464	1585	1604	GCTTGTGTACCTTTGGAAG	5-10-5	84	31891	31910	674
546323	1587	1606	GTGCTTGTGTACCTTTGGA	5-10-5	80	31893	31912	675
547465	1592	1611	AAATTGTGCTTGTGTACCT	5-10-5	85	31898	31917	676
547466	1596	1615	GTATAAATTGTGCTTGTGTC	5-10-5	43	31902	31921	677
546324	1597	1616	GGTATAAATTGTGCTTGTGT	5-10-5	82	31903	31922	678
547467	1598	1617	TGGTATAAATTGTGCTTGTG	5-10-5	65	31904	31923	679
547468	1600	1619	GTTGGTATAAATTGTGCTTG	5-10-5	46	31906	31925	680
546325	1602	1621	CAGTTGGTATAAATTGTGCT	5-10-5	79	31908	31927	681
546326	1607	1626	CCCAACAGTTGGTATAAATT	5-10-5	64	31913	31932	682
547469	1610	1629	TTACCCAACAGTTGGTATAA	5-10-5	50	31916	31935	683
546327	1612	1631	GGTTACCCAACAGTTGGTAT	5-10-5	84	31918	31937	684
546328	1624	1643	GAAGCCCCATCCGGTTACCC	5-10-5	81	31930	31949	685
547470	1628	1647	TCGAGAAGCCCCATCCGGTT	5-10-5	68	31934	31953	686
546329	1631	1650	CCTTCGAGAAGCCCCATCCG	5-10-5	8	31937	31956	687
546330	1636	1655	TTTCTCCTTCGAGAAGCCCC	5-10-5	67	31942	31961	688
547471	1638	1657	CCTTCTCCTTCGAGAAGCC	5-10-5	43	31944	31963	689
547472	1641	1660	TCACCTTTCTCCTTCGAGAA	5-10-5	42	該当なし	該当なし	690
546331	1642	1661	TTCACCTTTCTCCTTCGAGA	5-10-5	44	該当なし	該当なし	691
547473	1649	1668	TTTGGATTTCACCTTTCTCC	5-10-5	26	該当なし	該当なし	692
547474	1659	1678	TGTAGAATATTTGGATTTC	5-10-5	34	33103	33122	693
547475	1686	1705	TTTGTACCAAAGGAATATT	5-10-5	42	33130	33149	694
547476	1688	1707	CATTGTGTACCAAAGGAATA	5-10-5	71	33132	33151	695
546336	1689	1708	TCATTGTGTACCAAAGGAAT	5-10-5	73	33133	33152	696
547477	1692	1711	TCTTCATTGTGTACCAAAGG	5-10-5	68	33136	33155	697
547478	1695	1714	CATTCTTCATTGTGTACCAA	5-10-5	55	33139	33158	698

【1 2 6 7】

10

20

30

40

50

【表 1 1 9 - 3】

546339	1712	1731	CTTGATATCTTTTCTGGCAT	5-10-5	64	33156	33175	699
546340	1716	1735	TAATCTTGATATCTTTTCTG	5-10-5	56	33160	33179	700
547479	1718	1737	TATAATCTTGATATCTTTTC	5-10-5	9	33162	33181	701
547480	1756	1775	TTCTTTATAGCCAGCACAGA	5-10-5	49	33200	33219	702
547481	1758	1777	CCTTCTTTATAGCCAGCACA	5-10-5	77	33202	33221	703
547482	1760	1779	CCCCCTTCTTTATAGCCAGCA	5-10-5	65	33204	33223	704
546343	1761	1780	CCCCCTTCTTTATAGCCAGC	5-10-5	91	33205	33224	705
547483	1762	1781	TCCCCCTTCTTTATAGCCAG	5-10-5	77	33206	33225	706
546345	1773	1792	CAAGCATCTTTTCCCCCTTC	5-10-5	80	33217	33236	707
546346	1796	1815	AGGGACCACCTGAATCTCCC	5-10-5	70	33895	33914	708
547484	1799	1818	CTAAGGGACCACCTGAATCT	5-10-5	64	33898	33917	709
546347	1800	1819	ACTAAGGGACCACCTGAATC	5-10-5	22	33899	33918	710
547485	1803	1822	CAAACCTAAGGGACCACCTGA	5-10-5	66	33902	33921	711
546348	1804	1823	GCAAACCTAAGGGACCACCTG	5-10-5	76	33903	33922	712
547486	1805	1824	TGCAAACCTAAGGGACCACCT	5-10-5	78	33904	33923	713
546349	1810	1829	GTGTTTGCAAACCTAAGGGAC	5-10-5	35	33909	33928	714
547487	1811	1830	TGTGTTTGCAAACCTAAGGGA	5-10-5	61	33910	33929	715
546350	1868	1887	CCCTGCGGGCACAGCCTTCA	5-10-5	74	33967	33986	716
546351	1873	1892	TTGCTCCCTGCGGGCACAGC	5-10-5	60	33972	33991	717
546352	1880	1899	CACCAGGTTGCTCCCTGCGG	5-10-5	74	33979	33998	718
547488	1881	1900	ACACCAGGTTGCTCCCTGCG	5-10-5	72	33980	33999	719

10

20

【1 2 6 8】

30

40

50

【表 1 2 0 - 1】

表 1 3 2

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止 部位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547489	1883	1902	AGACACCAGGTTGCTCCCTG	5-10-5	34	33982	34001	720
547490	1885	1904	GTAGACACCAGGTTGCTCCC	5-10-5	55	33984	34003	721
546353	1900	1919	CTCAGCGACTTTGGTGTAGA	5-10-5	55	33999	34018	722
546354	1903	1922	GTAATCAGCGACTTTGGTGT	5-10-5	47	34002	34021	723
547491	1906	1925	CATGTACTCAGCGACTTTGG	5-10-5	47	34005	34024	724
547492	1911	1930	CAGTCCATGTACTCAGCGAC	5-10-5	62	34010	34029	725
546356	1913	1932	TCCAGTCCATGTACTCAGCG	5-10-5	60	34012	34031	726
546357	1947	1966	GCTTTTCCATCACTGCTCTG	5-10-5	79	34046	34065	727
546358	1951	1970	CTGAGCTTTTCCATCACTGC	5-10-5	83	34050	34069	728
547493	1952	1971	TCTGAGCTTTTCCATCACTG	5-10-5	72	34051	34070	729
546359	1955	1974	GCATCTGAGCTTTTCCATCA	5-10-5	79	34054	34073	730
546360	1958	1977	ACTGCATCTGAGCTTTTCCA	5-10-5	13	34057	34076	731
547494	1963	1982	TGGTGAATGCATCTGAGCTT	5-10-5	70	34062	34081	732
547495	1965	1984	GCTGGTGAATGCATCTGAGC	5-10-5	61	34064	34083	733
547496	1967	1986	ATGCTGGTGAATGCATCTGA	5-10-5	80	34066	34085	734
546362	1969	1988	TCATGCTGGTGAATGCATCT	5-10-5	71	34068	34087	735

【 1 2 6 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 0 - 2】

546363	1973	1992	CTTCTCATGCTGGTGA	5-10-5	81	34072	34091	736
547497	1977	1996	ACTGCTTCTCATGCTGA	5-10-5	68	34076	34095	737
546364	1979	1998	GGACTGCTTCTCATGCTG	5-10-5	61	34078	34097	738
547498	1981	2000	CTGGACTGCTTCTCATGCTG	5-10-5	44	34080	34099	739
547499	1983	2002	CTCTGGACTGCTTCTCATGC	5-10-5	65	34082	34101	740
546365	1986	2005	AGACTCTGGACTGCTTCTCA	5-10-5	64	34085	34104	741
547500	1989	2008	CCTAGACTCTGGACTGCTTC	5-10-5	65	34088	34107	742
546366	1991	2010	TGCCTAGACTCTGGACTGCT	5-10-5	79	34090	34109	743
547501	1993	2012	ATTGCCTAGACTCTGGACTG	5-10-5	55	34092	34111	744
546367	1997	2016	AAAAATTGCCTAGACTCTGG	5-10-5	61	34096	34115	745
546368	2003	2022	GGTTGTAAAAATTGCCTAGA	5-10-5	44	34102	34121	746
547502	2006	2025	TCAGGTTGTAAAAATTGCCT	5-10-5	64	34105	34124	747
546369	2007	2026	CTCAGGTTGTAAAAATTGCC	5-10-5	51	34106	34125	748
547503	2008	2027	ACTCAGGTTGTAAAAATTGC	5-10-5	66	34107	34126	749
547504	2010	2029	GAACCTCAGGTTGTAAAAATT	5-10-5	37	34109	34128	750
546370	2014	2033	ACTTGAACCTCAGGTTGTAAA	5-10-5	34	34113	34132	751
547505	2015	2034	GACTTGAACCTCAGGTTGTAA	5-10-5	69	34114	34133	752
546372	2021	2040	GAATTGACTTGAACCTCAGG	5-10-5	49	34120	34139	753
546373	2025	2044	CTCAGAATTGACTTGAACCT	5-10-5	59	34124	34143	754
547506	2028	2047	AGGCTCAGAATTGACTTGA	5-10-5	78	34127	34146	755
547507	2029	2048	CAGGCTCAGAATTGACTTG	5-10-5	56	34128	34147	756
546374	2030	2049	CCAGGCTCAGAATTGACTT	5-10-5	50	34129	34148	757
547508	2032	2051	CCCCAGGCTCAGAATTGAC	5-10-5	69	34131	34150	758
547509	2034	2053	CCCCCAGGCTCAGAATTG	5-10-5	58	34133	34152	759
546375	2036	2055	GACCCCCAGGCTCAGAATT	5-10-5	48	34135	34154	760
547510	2041	2060	ATGAGGACCCCCAGGCTCA	5-10-5	40	34140	34159	761
547511	2042	2061	GATGAGGACCCCCAGGCTC	5-10-5	53	34141	34160	762
547512	2045	2064	GCAGATGAGGACCCCCAGG	5-10-5	74	34144	34163	763
547513	2046	2065	TGCAGATGAGGACCCCCAG	5-10-5	72	34145	34164	764
546378	2048	2067	TTTGCAGATGAGGACCCCC	5-10-5	79	34147	34166	765
546379	2056	2075	CTCCATGCTTTGCAGATGAG	5-10-5	69	34155	34174	766
546380	2062	2081	GCCACTCTCCATGCTTTGCA	5-10-5	81	34161	34180	767
547514	2066	2085	AGATGCCACTCTCCATGCTT	5-10-5	85	34165	34184	768
546381	2068	2087	GAAGATGCCACTCTCCATGC	5-10-5	73	34167	34186	769
547515	2069	2088	AGAAGATGCCACTCTCCATG	5-10-5	58	34168	34187	770
546382	2072	2091	CAAAGAAGATGCCACTCTCC	5-10-5	58	34171	34190	771
547516	2076	2095	GATGCAAAGAAGATGCCACT	5-10-5	48	34175	34194	772
546383	2077	2096	GGATGCAAAGAAGATGCCAC	5-10-5	57	34176	34195	773
547517	2079	2098	TAGGATGCAAAGAAGATGCC	5-10-5	57	34178	34197	774

【1 2 7 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 0 - 3】

547518	2083	2102	TCCTTAGGATGCAAAGAAGA	5-10-5	51	34182	34201	775
546384	2085	2104	CGTCCTTAGGATGCAAAGAA	5-10-5	81	34184	34203	776
546385	2120	2139	ATTGTCCTCAGCAGCTCTGA	5-10-5	67	34219	34238	777
547519	2126	2145	CCAGACATTGTCCTCAGCAG	5-10-5	76	34225	34244	778
546386	2128	2147	AGCCAGACATTGTCCTCAGC	5-10-5	78	34227	34246	779
547520	2130	2149	TCAGCCAGACATTGTCCTCA	5-10-5	76	34229	34248	780
547521	2132	2151	CTTCAGCCAGACATTGTCCT	5-10-5	58	34231	34250	781
546387	2138	2157	AGCGGGCTTCAGCCAGACAT	5-10-5	77	34237	34256	782
547522	2141	2160	GAAAGCGGGCTTCAGCCAGA	5-10-5	73	34240	34259	783
546388	2143	2162	CTGAAAGCGGGCTTCAGCCA	5-10-5	71	34242	34261	784
546389	2147	2166	CGTGCTGAAAGCGGGCTTCA	5-10-5	71	34246	34265	785
546390	2165	2184	GTCAGCCCCTGGTTACGGCG	5-10-5	70	34264	34283	786
547523	2167	2186	TTGTCAGCCCCTGGTTACGG	5-10-5	69	34266	34285	787
547524	2169	2188	CATTGTCAGCCCCTGGTTAC	5-10-5	58	34268	34287	788
546391	2170	2189	GCATTGTCAGCCCCTGGTTA	5-10-5	54	34269	34288	789
547525	2174	2193	CCTCGCATTGTCAGCCCCTG	5-10-5	78	34273	34292	790
546392	2176	2195	GACCTCGCATTGTCAGCCCC	5-10-5	72	34275	34294	791
547526	2178	2197	GCGACCTCGCATTGTCAGCC	5-10-5	59	34277	34296	792
547527	2185	2204	CTCAGTTGCGACCTCGCATT	5-10-5	58	34284	34303	793
546393	2186	2205	TCTCAGTTGCGACCTCGCAT	5-10-5	77	34285	34304	794
546394	2196	2215	GTCATGGAGATCTCAGTTGC	5-10-5	71	34295	34314	795
547528	2200	2219	CACAGTCATGGAGATCTCAG	5-10-5	78	34299	34318	796

【1 2 7 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 1】

表 1 3 3

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546403	該当なし	該当なし	CCATGAACATCCTATCCGTG	5-10-5	83	3282	3301	797
546406	該当なし	該当なし	TGTCCTGTCAACATATTCCA	5-10-5	80	3299	3318	798
546409	該当なし	該当なし	GGGTTTCTGCCAACAGTTTC	5-10-5	77	3326	3345	799
546410	該当なし	該当なし	GACTTTGGGTTTCTGCCAAC	5-10-5	83	3332	3351	800
546411	該当なし	該当なし	ATATTGACTTTGGGTTTCTG	5-10-5	56	3337	3356	801
546412	該当なし	該当なし	GGCTTCAATATTGACTTTGG	5-10-5	84	3344	3363	802
546416	該当なし	該当なし	CTGCAGGCAATATTTTGCTT	5-10-5	62	3364	3383	803
546418	該当なし	該当なし	ATGTGGCACTGCAGGCAATA	5-10-5	72	3372	3391	804
546419	該当なし	該当なし	TTCTAATGTGGCACTGCAGG	5-10-5	65	3377	3396	805
546421	該当なし	該当なし	TCAAGCTGTTCTAATGTGGC	5-10-5	71	3385	3404	806
546422	該当なし	該当なし	ACGGTCTTCAAGCTGTTCTA	5-10-5	72	3392	3411	807
546425	該当なし	該当なし	GGTCAATCTGACTAGTGAAT	5-10-5	69	2284	2303	808
546426	該当なし	該当なし	TCTCTGGTCAATCTGACTAG	5-10-5	49	2289	2308	809
546429	該当なし	該当なし	GCCCACCAACAATCTCTGGT	5-10-5	84	2301	2320	810
546432	該当なし	該当なし	GACCCCAACAGACAGCCAC	5-10-5	62	2315	2334	811
546444	該当なし	該当なし	CCAGAATCATGCCTTGTGGG	5-10-5	61	4765	4784	812
546447	該当なし	該当なし	GTCACCATAGACCCAGAATC	5-10-5	68	4777	4796	813

【1 2 7 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 2】

546450	該当なし	該当なし	GTGGCCCTCTTAAGTCACCA	5-10-5	73	4790	4809	814
546453	該当なし	該当なし	CTCATTGTTGTGTGGCCCTC	5-10-5	82	4801	4820	815
546459	該当なし	該当なし	GTAGCCATACATCTGAGGAA	5-10-5	46	4830	4849	816
546461	該当なし	該当なし	ATGTTTATTGTAGCCATACA	5-10-5	53	4839	4858	817
546492	該当なし	該当なし	CTCGCCTTTGTGACTCGATT	5-10-5	61	26263	26282	818
546493	該当なし	該当なし	CATACTCGCCTTTGTGACTC	5-10-5	35	26267	26286	819
546494	該当なし	該当なし	GCATACTCGCCTTTGTGACT	5-10-5	67	26268	26287	820
546495	該当なし	該当なし	TGCATACTCGCCTTTGTGAC	5-10-5	65	26269	26288	821
546395	2209	2228	TTCACAACACACAGTCATGG	5-10-5	72	34308	34327	822
546397	2233	2252	TTTTTTGATCTTTCACCATT	5-10-5	55	該当なし	該当なし	823
546496	該当なし	該当なし	ATGCATACTCGCCTTTGTGA	5-10-5	54	26270	26289	824
						26301	26320	
546497	該当なし	該当なし	CATGCATACTCGCCTTTGTG	5-10-5	56	26271	26290	825
						26302	26321	
546498	該当なし	該当なし	CCATGCATACTCGCCTTTGT	5-10-5	65	26272	26291	826
						26303	26322	
547529	2203	2222	ACACACAGTCATGGAGATCT	5-10-5	49	34302	34321	827
547530	2206	2225	ACAACACACAGTCATGGAGA	5-10-5	63	34305	34324	828
547531	2213	2232	TTATTTCAACACACAGTC	5-10-5	69	34312	34331	829
546499	該当なし	該当なし	TCCATGCATACTCGCCTTTG	5-10-5	20	26273	26292	830
546500	該当なし	該当なし	TTCCATGCATACTCGCCTTT	5-10-5	46	26274	26293	831
546501	該当なし	該当なし	TTCCATGCATACTCGCCTT	5-10-5	53	26275	26294	832
546502	該当なし	該当なし	GATTTTCCATGCATACTCGC	5-10-5	37	26278	26297	833
546503	該当なし	該当なし	GTGATGCGATTTTCCATGCA	5-10-5	53	26285	26304	834
546508	該当なし	該当なし	GCAGCAAGTGCTCCCATGC	5-10-5	43	26317	26336	835
546511	該当なし	該当なし	GTGATGAAAGTACAGCAGCA	5-10-5	50	26331	26350	836
546683	該当なし	該当なし	TCCTATCCGTGTTTACGCTGT	5-10-5	69	3273	3292	837
546684	該当なし	該当なし	TACTCTCTACATACTCAGGA	5-10-5	71	3561	3580	838
546687	該当なし	該当なし	TGAGACCTCCAGACTACTGT	5-10-5	76	3847	3866	839
546690	該当なし	該当なし	CTCTGCTGGTTTTAGACCAC	5-10-5	44	4027	4046	840
546695	該当なし	該当なし	GGGACAATCTCCACCCCGA	5-10-5	36	4225	4244	841
546698	該当なし	該当なし	TGCAGAGTGTCATCTGCGAA	5-10-5	59	4387	4406	842
546700	該当なし	該当なし	TGGTTCCCTAGCGGTCCAGA	5-10-5	78	4561	4580	843
546705	該当なし	該当なし	CCCCTGTAGTTGGCTGTGGT	5-10-5	66	5046	5065	844
546707	該当なし	該当なし	GCAAGTCAAAGAGTGCCAC	5-10-5	73	5283	5302	845
546710	該当なし	該当なし	GAAGCCTGTTAGAGTTGGCC	5-10-5	73	5576	5595	846
546719	該当なし	該当なし	CCCCCATGTCCATGGACTTT	5-10-5	55	6329	6348	847
547532	該当なし	該当なし	CTGCCAACAGTTTCAACTTT	5-10-5	65	3320	3339	848
547533	該当なし	該当なし	TTTTGCTTGCTTCAATATT	5-10-5	23	3352	3371	849

【1 2 7 3】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 3】

547534	該当なし	該当なし	ATCTGACTAGTGAATGGCTT	5-10-5	72	2279	2298	850
547535	該当なし	該当なし	AGACAGCCCACCAACAATCT	5-10-5	28	2306	2325	851
547536	該当なし	該当なし	TGCATAGACCCCAACAGACA	5-10-5	48	2321	2340	852
547537	該当なし	該当なし	CCTGTGCATAGACCCCAACA	5-10-5	65	2325	2344	853
547538	該当なし	該当なし	CCAGCAGAAATCCTGTGCAT	5-10-5	77	2336	2355	854
547539	該当なし	該当なし	AGAACTCCAGCAGAAATCCT	5-10-5	43	2342	2361	855
547540	該当なし	該当なし	TTGTGTGGCCCTCTTAAGTC	5-10-5	44	4794	4813	856
547541	該当なし	該当なし	TATAGATGTTTATTGTAGCC	5-10-5	36	4844	4863	857
547542	該当なし	該当なし	ATACTCGCCTTTGTGACTCG	5-10-5	35	26266	26285	858
547543	該当なし	該当なし	TTTTCCATGCATACTCGCCT	5-10-5	54	26276	26295	859
547544	該当なし	該当なし	TCGCCTTTGTGATGCGATTT	5-10-5	15	26293	26312	860
547545	該当なし	該当なし	ATACTCGCCTTTGTGATGCG	5-10-5	43	26297	26316	861
547546	該当なし	該当なし	CATACTCGCCTTTGTGATGC	5-10-5	11	26298	26317	862
547547	該当なし	該当なし	GCATACTCGCCTTTGTGATG	5-10-5	42	26299	26318	863
547548	該当なし	該当なし	TGCATACTCGCCTTTGTGAT	5-10-5	61	26300	26319	864
547549	該当なし	該当なし	CCCATGCATACTCGCCTTTG	5-10-5	36	26304	26323	865
547550	該当なし	該当なし	CCCCATGCATACTCGCCTTT	5-10-5	53	26305	26324	866
547551	該当なし	該当なし	TCCCCATGCATACTCGCCTT	5-10-5	38	26306	26325	867
547552	該当なし	該当なし	CTCCCCATGCATACTCGCCT	5-10-5	53	26307	26326	868
547553	該当なし	該当なし	TGCTCCCCATGCATACTCGC	5-10-5	64	26309	26328	869
547554	該当なし	該当なし	GCTCTGATTGGGTCACCACA	5-10-5	50	5743	5762	870
547555	該当なし	該当なし	TGTCTCCTTCCACTTGCTCC	5-10-5	58	5923	5942	871
547556	該当なし	該当なし	GCCATTTTATCCCTGAGATT	5-10-5	55	6130	6149	872
547557	該当なし	該当なし	CTGTGCTGTATTTGGAGCC	5-10-5	59	6413	6432	873

【1 2 7 4】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 1】

表 1 3 4

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	85	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546732	該当なし	該当なし	GGATTGGCCCTGAGCCCA	5-10-5	14	6933	6952	874
546735	該当なし	該当なし	CAACCTGTCCATTCCCTGGG	5-10-5	46	7082	7101	875
546739	該当なし	該当なし	ATTCGGGTGCTTTACTGGCT	5-10-5	89	7228	7247	876
546746	該当なし	該当なし	TCCTGTTGCCTGACATGCTA	5-10-5	65	7694	7713	877
546747	該当なし	該当なし	CTCCCACTGACTGACTACTC	5-10-5	64	7904	7923	878
546749	該当なし	該当なし	GCTGGTCCTGAACCCCGTG	5-10-5	53	8259	8278	879
546753	該当なし	該当なし	CTGGTCACTATAGGCCCA	5-10-5	91	8655	8674	880
546756	該当なし	該当なし	ATAAGCATCTCTCTGACCTA	5-10-5	47	9105	9124	881
546763	該当なし	該当なし	GCTTCCCAATACTTGCTGG	5-10-5	84	9695	9714	882
546765	該当なし	該当なし	GTGTCCAGAATACTGCCCA	5-10-5	82	10053	10072	883
546770	該当なし	該当なし	GTGGACGACTGCCCTGTGCC	5-10-5	74	10435	10454	884
546773	該当なし	該当なし	TCTCTAGCATCCTAGTCCTC	5-10-5	67	10586	10605	885
546780	該当なし	該当なし	ATACTGGCTAAGTCAGGCCC	5-10-5	83	10982	11001	886
546784	該当なし	該当なし	GGCAGGGAGGTGGATTATTC	5-10-5	58	11440	11459	887
546789	該当なし	該当なし	GCTTCTCTATCTCCAGTGT	5-10-5	79	12228	12247	888
546791	該当なし	該当なし	GATGCATGCAGCAATACAGG	5-10-5	52	12385	12404	889

【 1 2 7 5】

【表 1 2 2 - 2】

546795	該当なし	該当なし	GTCTCGATGGCAAGCTGTAC	5-10-5	72	12650	12669	890
546796	該当なし	該当なし	GTACTCACC GG TACTCTGCC	5-10-5	82	12804	12823	891
546799	該当なし	該当なし	ATGAAGGGCGAGGCGCAGTG	5-10-5	5	13258	13277	892
546803	該当なし	該当なし	CCCCATACATCTATGCAAAT	5-10-5	40	13551	13570	893
546804	該当なし	該当なし	ACATGACTCCAGTGATGGAT	5-10-5	57	13632	13651	894
546808	該当なし	該当なし	AAAATGACACCAAAATTCGC	5-10-5	0	13841	13860	895
546811	該当なし	該当なし	TGGACATCCTTCCCTCGCA	5-10-5	49	13967	13986	896
546817	該当なし	該当なし	GCTCTGAGCCTTCGCCTCT	5-10-5	77	14472	14491	897
546822	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACTGCT	5-10-5	32	14735	14754	898
546823	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAACTGC	5-10-5	44	14736	14755	899
546824	該当なし	該当なし	GTACTAGTTTCCTATAACTG	5-10-5	79	14737	14756	900
546825	該当なし	該当なし	GTATCACTGTACTAGTTTC	5-10-5	96	14745	14764	901
						14816	14835	
						14887	14906	
						14946	14965	
						15006	15025	
						15078	15097	
						15221	15240	
						15293	15312	
						15352	15371	
						15412	15431	
						15484	15503	
						15556	15575	
						15614	15633	
						15686	15705	
546826	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTACTAGTTTC	5-10-5	90	14746	14765	902
						14817	14836	
						14888	14907	
						14947	14966	
						15007	15026	
						15079	15098	
						15222	15241	
						15294	15313	
						15353	15372	
						15413	15432	
						15485	15504	
						15557	15576	
						15615	15634	
						15687	15706	
546827	該当なし	該当なし	CAGTATCACTGTACTAGTTT	5-10-5	98	15817	15836	903
						15889	15908	
546827	該当なし	該当なし	CAGTATCACTGTACTAGTTT	5-10-5	98	15947	15966	903
						14747	14766	

【1 2 7 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 3】

						14818	14837	
						14889	14908	
						14948	14967	
						15008	15027	
						15080	15099	
						15152	15171	
						15223	15242	
						15295	15314	
						15354	15373	
						15414	15433	
						15486	15505	
						15558	15577	
						15616	15635	
						15688	15707	
						15818	15837	
						15890	15909	
						15948	15967	
						14748	14767	
						14819	14838	
						14890	14909	
						14949	14968	
						15009	15028	
						15081	15100	
						15153	15172	
						15224	15243	
546828	該当なし	該当なし	ACAGTATCACTGTACTAGTT	5-10-5	95	15296	15315	904
						15355	15374	
						15415	15434	
						15487	15506	
						15559	15578	
						15617	15636	
						15689	15708	
						15819	15838	
						15891	15910	
						15949	15968	
						14749	14768	
						14820	14839	
						14891	14910	
						14950	14969	
						15010	15029	
546829	該当なし	該当なし	AACAGTATCACTGTACTAGT	5-10-5	94	15082	15101	905
						15154	15173	
						15225	15244	
						15297	15316	
						15356	15375	
						15416	15435	

【1 2 7 7】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 4】

						15488	15507	
						15560	15579	
						15618	15637	
						15690	15709	
						15820	15839	
						15892	15911	
						15950	15969	
546830	該当なし	該当なし	TAACAGTATCACTGTACTAG	5-10-5	78	14750	14769	906
						14821	14840	
						14892	14911	
						14951	14970	
						15011	15030	
						15083	15102	
						15155	15174	
						15226	15245	
						15298	15317	
						15357	15376	
						15417	15436	
						15489	15508	
						15561	15580	
						15619	15638	
						15691	15710	
						15821	15840	
						15893	15912	
						15951	15970	
546831	該当なし	該当なし	TCTAACAGTATCACTGTACT	5-10-5	79	14752	14771	907
						14823	14842	
						14894	14913	
						15013	15032	
						15085	15104	
						15228	15247	
						15300	15319	
						15419	15438	
						15491	15510	
						15621	15640	
						15823	15842	
						15953	15972	
546832	該当なし	該当なし	CTCTAACAGTATCACTGTAC	5-10-5	88	14753	14772	908
						14824	14843	
						14895	14914	
						15014	15033	
						15086	15105	
						15229	15248	
						15301	15320	
						15420	15439	
						15492	15511	

【1 2 7 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 5】

						15622	15641	
						15824	15843	
						15954	15973	
546833	該当なし	該当なし	ACTCTAACAGTATCACTGTA	5-10-5	90	14754	14773	909
						14825	14844	
						14896	14915	
						15015	15034	
						15087	15106	
						15230	15249	
						15302	15321	
						15421	15440	
						15493	15512	
						15623	15642	
						15825	15844	
						15955	15974	
546834	該当なし	該当なし	AACTCTAACAGTATCACTGT	5-10-5	86	14755	14774	910
						14826	14845	
						14897	14916	
						15016	15035	
						15088	15107	
						15231	15250	
						15303	15322	
						15422	15441	
						15494	15513	
						15624	15643	
						15826	15845	
						15956	15975	
546835	該当なし	該当なし	TAACTCTAACAGTATCACTG	5-10-5	86	14756	14775	911
						14827	14846	
						14898	14917	
						15017	15036	
						15089	15108	
						15232	15251	
						15304	15323	
						15423	15442	
						15495	15514	
						15625	15644	
						15827	15846	
						15957	15976	
546836	該当なし	該当なし	ATAACTCTAACAGTATCACT	5-10-5	30	14757	14776	912
						14828	14847	
						14899	14918	
						15018	15037	
						15090	15109	
						15233	15252	
						15305	15324	

10

20

30

40

【1 2 7 9】

50

【表 1 2 2 - 6】

						15424	15443	
						15496	15515	
						15626	15645	
						15828	15847	
						15958	15977	
546837	該当なし	該当なし	TATAACTCTAACAGTATCAC	5-10-5	0	14758	14777	913
						14829	14848	
						14900	14919	
						15019	15038	
						15091	15110	
						15234	15253	
						15306	15325	
						15425	15444	
						15497	15516	
						15627	15646	
						15829	15848	
						15959	15978	
546838	該当なし	該当なし	CTATAACTCTAACAGTATCA	5-10-5	43	14759	14778	914
						14830	14849	
						14901	14920	
						15020	15039	
						15092	15111	
						15235	15254	
						15307	15326	
						15426	15445	
						15498	15517	
						15628	15647	
						15830	15849	
						15960	15979	
546839	該当なし	該当なし	CCTATAACTCTAACAGTATC	5-10-5	47	14760	14779	915
						14831	14850	
						14902	14921	
						15021	15040	
						15093	15112	
						15236	15255	
						15308	15327	
						15427	15446	
						15499	15518	
						15629	15648	
						15831	15850	
						15961	15980	
546840	該当なし	該当なし	CTGTCCTATAACTCTAACAG	5-10-5	53	14764	14783	916
						14835	14854	
546841	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATAACTCTAAC	5-10-5	38	14766	14785	917
						14837	14856	
546842	該当なし	該当なし	TCACTGTCCTATAACTCTAA	5-10-5	54	14767	14786	918

【1 2 8 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 7】

						14838	14857	
546843	該当なし	該当なし	TATCACTGTCTATAACTCT	5-10-5	52	14769	14788	919
						14840	14859	
546844	該当なし	該当なし	GTCCTATATCACTGTCTAT	5-10-5	75	14775	14794	920
						14846	14865	
						15180	15199	
						15716	15735	
546845	該当なし	該当なし	TGTCCTATATCACTGTCTA	5-10-5	75	14776	14795	921
						14847	14866	
						15181	15200	
						15717	15736	
546846	該当なし	該当なし	CTGTCCTATATCACTGTCT	5-10-5	95	14777	14796	922
						14848	14867	
						15182	15201	
						15718	15737	
546847	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATATCACTGTCC	5-10-5	88	14778	14797	923
						14849	14868	
						15183	15202	
						15719	15738	
546848	該当なし	該当なし	TCACTGTCTATATCACTGT	5-10-5	86	14780	14799	924
						14851	14870	
						14976	14995	
						15185	15204	
						15257	15276	
						15382	15401	
						15520	15539	
						15650	15669	
						15721	15740	
						15852	15871	
						15982	16001	
547558	該当なし	該当なし	CCCCAGTTCCTATGCAAGG	5-10-5	52	6640	6659	925
547559	該当なし	該当なし	GAGCACAGATCTCTCAAGT	5-10-5	69	6822	6841	926
547560	該当なし	該当なし	GACGGTCACCCAGCCCTGAC	5-10-5	42	7459	7478	927
547561	該当なし	該当なし	AAGGGAATTAGAGGCAGGC	5-10-5	57	7583	7602	928
547562	該当なし	該当なし	CTTCTTGAGACAATCCCTT	5-10-5	59	8463	8482	929
547563	該当なし	該当なし	GTGGGATCAGAGAATGACTA	5-10-5	48	9267	9286	930
547564	該当なし	該当なし	CCCTCTGTCTTAGATGTCCA	5-10-5	94	9390	9409	931
547565	該当なし	該当なし	CTTATCAGTCCCAGTCATGT	5-10-5	63	10698	10717	932
547566	該当なし	該当なし	AAGAGTTGGGATGCGACTCT	5-10-5	76	11335	11354	933
547567	該当なし	該当なし	TCCACTCCTAAGAAGTATGG	5-10-5	60	11546	11565	934
547568	該当なし	該当なし	GCACCCCTTTTCATTGAGATT	5-10-5	70	12070	12089	935
547569	該当なし	該当なし	ACTACCATTGCGTTGGTAG	5-10-5	9	12571	12590	936
547570	該当なし	該当なし	AAGCCCTGTTTGGTTTTAG	5-10-5	18	12900	12919	937
547571	該当なし	該当なし	AAATGACACCAAAATTGAGT	5-10-5	14	13744	13763	938
547572	該当なし	該当なし	AAATGACACCAAAATTCGCT	5-10-5	40	13840	13859	939
547573	該当なし	該当なし	TAAGCAAGGCCTATGTGTGG	5-10-5	2	13880	13899	940

【1 2 8 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 8】

547574	該当なし	該当なし	ACACGCACAGGTCCCAGGGC	5-10-5	51	14314	14333	941
547575	該当なし	該当なし	GGGAAACTCTTTCCTCGCCC	5-10-5	89	14583	14602	942
547576	該当なし	該当なし	CTAGTTTCCTATAACTGCTG	5-10-5	29	14734	14753	943
547577	該当なし	該当なし	CTAACAGTATCACTGTACTA	5-10-5	79	14751	14770	944
						14822	14841	
						14893	14912	
						15012	15031	
						15084	15103	
						15227	15246	
						15299	15318	
						15418	15437	
						15490	15509	
						15620	15639	
547578	該当なし	該当なし	GTCCTATAACTCTAACAGTA	5-10-5	30	14762	14781	945
						14833	14852	
547579	該当なし	該当なし	TGTCCTATAACTCTAACAGT	5-10-5	0	14763	14782	946
						14834	14853	
547580	該当なし	該当なし	ATCACTGTCCTATAACTCTA	5-10-5	61	14768	14787	947
						14839	14858	
547581	該当なし	該当なし	ATATCACTGTCCTATAACTC	5-10-5	60	14770	14789	948
						14841	14860	
547582	該当なし	該当なし	TATATCACTGTCCTATAACT	5-10-5	22	14771	14790	949
						14842	14861	
						15176	15195	
						15712	15731	
547583	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATATCACTGTC	5-10-5	80	16160	16179	950
						14779	14798	
						14850	14869	
						15184	15203	
						15720	15739	

【1 2 8 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1】

表 1 3 5

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止 部位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	85	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546849	該当なし	該当なし	ATCACTGTCCCTATATCACTG	5-10-5	93	14781	14800	951
						14852	14871	
						14977	14996	
						15186	15205	
						15258	15277	
						15383	15402	
						15521	15540	
						15651	15670	
						15722	15741	
						15853	15872	
						15983	16002	

【 1 2 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 2】

546850	該当なし	該当なし	TATCACTGTCCTATATCACT	5-10-5	80	14782	14801	952
						14853	14872	
						14978	14997	
						15116	15135	
						15187	15206	
						15259	15278	
						15384	15403	
						15522	15541	
						15652	15671	
						15723	15742	
						15854	15873	
						15984	16003	
546851	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTCCTATATCA	5-10-5	81	14784	14803	953
						14980	14999	
						15118	15137	
						15386	15405	
						15524	15543	
						15986	16005	
546852	該当なし	該当なし	CAGTATCACTGTCCTATATC	5-10-5	94	14785	14804	954
						14981	15000	
						15119	15138	
						15387	15406	
						15525	15544	
						15987	16006	
546853	該当なし	該当なし	ACAGTATCACTGTCCTATAT	5-10-5	86	14786	14805	955
						14982	15001	
						15120	15139	
						15388	15407	
						15526	15545	
						15988	16007	
546854	該当なし	該当なし	TAACAGTATCACTGTCCTAT	5-10-5	90	14788	14807	956
						14984	15003	
						15050	15069	
						15122	15141	
						15390	15409	
						15456	15475	
						15528	15547	
						15990	16009	

【1 2 8 4】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 3】

546855	該当なし	該当なし	ATAACAGTATCACTGTCCTA	5-10-5	87	14789	14808	957
						14985	15004	
						15051	15070	
						15123	15142	
						15391	15410	
						15457	15476	
						15529	15548	
						15991	16010	
546856	該当なし	該当なし	AACTATAACAGTATCACTGT	5-10-5	54	14793	14812	958
						15055	15074	
						15127	15146	
						15160	15179	
						15461	15480	
						15533	15552	
						15566	15585	
						15696	15715	
546857	該当なし	該当なし	TATAACTATAACAGTATCAC	5-10-5	7	15898	15917	959
						15995	16014	
						14796	14815	
						15058	15077	
						15130	15149	
						15163	15182	
						15464	15483	
						15536	15555	
546858	該当なし	該当なし	CTATAACTATAACAGTATCA	5-10-5	21	15569	15588	960
						15699	15718	
						15770	15789	
						15998	16017	
						14797	14816	
						15059	15078	
						15131	15150	
						15164	15183	
						15465	15484	
						15537	15556	
						15570	15589	
						15700	15719	
						15771	15790	
						15999	16018	

【 1 2 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 4】

546859	該当なし	該当なし	TTTCCTATAACTATAACAGT	5-10-5	7	14801	14820	961
						15063	15082	
						15469	15488	
						15541	15560	
546860	該当なし	該当なし	CTAGTTTCCTATAACTATAA	5-10-5	36	14805	14824	962
						14876	14895	
						14935	14954	
						15067	15086	
						15210	15229	
						15282	15301	
						15341	15360	
						15473	15492	
						15545	15564	
						15603	15622	
						15675	15694	
						15746	15765	
546861	該当なし	該当なし	TAACAATATCACTGTCCTAT	5-10-5	68	15805	15824	963
						15877	15896	
						15935	15954	
						14859	14878	
						15193	15212	
						15265	15284	
						15586	15605	
						15658	15677	
						15729	15748	
						15860	15879	
						16086	16105	
						16183	16202	
						16234	16253	

【1 2 8 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 5】

546862	該当なし	該当なし	AACTATAACAATATCACTGT	5-10-5	0	14864	14883	964	10
						14923	14942		
						15198	15217		
						15270	15289		
						15329	15348		
						15591	15610		
						15663	15682		
						15734	15753		
						15793	15812		
						15865	15884		
						15923	15942		
						16066	16085		
						16091	16110		
						16144	16163		
						16239	16258		
546863	該当なし	該当なし	TAACTATAACAATATCACTG	5-10-5	21	14865	14884	965	20
						14924	14943		
						15199	15218		
						15271	15290		
						15330	15349		
						15592	15611		
						15664	15683		
						15735	15754		
						15794	15813		
						15866	15885		
						15924	15943		
						16067	16086		
						16092	16111		
						16145	16164		
						16240	16259		

【1 2 8 7】

【表 1 2 3 - 6】

546864	該当なし	該当なし	ATAACTATAACAATATCACT	5-10-5	0	14866	14885	966
						14925	14944	
						15200	15219	
						15272	15291	
						15331	15350	
						15593	15612	
						15665	15684	
						15736	15755	
						15795	15814	
						15867	15886	
						15925	15944	
						16068	16087	
						16093	16112	
						16146	16165	
						16241	16260	
546865	該当なし	該当なし	TATAACTATAACAATATCAC	5-10-5	0	14867	14886	967
						14926	14945	
						15201	15220	
						15273	15292	
						15332	15351	
						15594	15613	
						15666	15685	
						15737	15756	
						15796	15815	
						15868	15887	
						15926	15945	
						16069	16088	
						16094	16113	
						16147	16166	
						16242	16261	
546866	該当なし	該当なし	GTTTCCTATAACTATAACAA	5-10-5	35	14873	14892	968
						14932	14951	
						15207	15226	
						15279	15298	
						15338	15357	
						15600	15619	
						15672	15691	
						15743	15762	
						15802	15821	
						15874	15893	
						15932	15951	

【1 2 8 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 7】

546867	該当なし	該当なし	ACCTATAACTCTAACAGTAT	5-10-5	40	14903	14922	969
						15022	15041	
						15094	15113	
						15237	15256	
						15309	15328	
						15428	15447	
						15500	15519	
						15630	15649	
						15832	15851	
						15962	15981	
546868	該当なし	該当なし	TACCTATAACTCTAACAGTA	5-10-5	51	14904	14923	970
						15023	15042	
						15095	15114	
						15238	15257	
						15310	15329	
						15429	15448	
						15501	15520	
						15631	15650	
						15833	15852	
						15963	15982	
546869	該当なし	該当なし	TGTACCTATAACTCTAACAG	5-10-5	53	14906	14925	971
						15025	15044	
						15240	15259	
						15312	15331	
						15431	15450	
						15503	15522	
						15633	15652	
						15835	15854	
						15965	15984	
546870	該当なし	該当なし	CTGTACCTATAACTCTAACA	5-10-5	87	14907	14926	972
						15026	15045	
						15241	15260	
						15313	15332	
						15432	15451	
						15504	15523	
						15634	15653	
						15836	15855	
						15966	15985	

【1 2 8 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 8】

546871	該当なし	該当なし	ACTGTACCTATAACTCTAAC	5-10-5	73	14908	14927	973
						15027	15046	
						15242	15261	
						15314	15333	
						15433	15452	
						15505	15524	
						15635	15654	
						15837	15856	
546872	該当なし	該当なし	CACTGTACCTATAACTCTAA	5-10-5	87	15967	15986	974
						14909	14928	
						15028	15047	
						15243	15262	
						15315	15334	
						15434	15453	
						15506	15525	
						15636	15655	
546873	該当なし	該当なし	CAATATCACTGTACCTATAA	5-10-5	34	15838	15857	975
						15968	15987	
						14915	14934	
546874	該当なし	該当なし	ATAACAATATCACTGTACCT	5-10-5	68	15321	15340	976
						15785	15804	
						14919	14938	
						15325	15344	
546875	該当なし	該当なし	ACTATAACAATATCACTGTA	5-10-5	33	15789	15808	977
						16062	16081	
						16140	16159	
						14922	14941	
546876	該当なし	該当なし	GTCCTATATCACTGTACCTG	5-10-5	87	15328	15347	978
						15792	15811	
						16065	16084	
						16143	16162	
546877	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATATCACTGTA	5-10-5	88	14971	14990	979
						14975	14994	
						15256	15275	
						15381	15400	
						15519	15538	
						15649	15668	
						15851	15870	
						15981	16000	

【1 2 9 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 9】

546878	該当なし	該当なし	CCTATAACAGTATCACTGTC	5-10-5	81	14988 15394	15007 15413	980
546879	該当なし	該当なし	TTTCCTATAACAGTATCACT	5-10-5	42	14991 15397	15010 15416	981
546880	該当なし	該当なし	GTTTCCTATAACAGTATCAC	5-10-5	41	14992 15398	15011 15417	982
546881	該当なし	該当なし	AGTTTCCTATAACAGTATCA	5-10-5	49	14993 15399	15012 15418	983
546882	該当なし	該当なし	TAGTTTCCTATAACAGTATC	5-10-5	24	14994 15400	15013 15419	984
546883	該当なし	該当なし	CTAGTTTCCTATAACAGTAT	5-10-5	19	14995 15401	15014 15420	985
546884	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACAGTA	5-10-5	6	14996 15402	15015 15421	986
547584	該当なし	該当なし	GTATCACTGTCCTATATCAC	5-10-5	85	14783 14979 15117 15385 15523 15985	14802 14998 15136 15404 15542 16004	987
547585	該当なし	該当なし	AACAGTATCACTGTCCTATA	5-10-5	85	14787 14983 15121 15389 15527 15989	14806 15002 15140 15408 15546 16008	988
547586	該当なし	該当なし	TATAACAGTATCACTGTCCT	5-10-5	82	14790 14986 15052 15124 15392 15458 15530 15992	14809 15005 15071 15143 15411 15477 15549 16011	989

【1 2 9 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1 0】

547587	該当なし	該当なし	CTATAACAGTATCACTGTCC	5-10-5	96	14791	14810	990
						14987	15006	
						15053	15072	
						15125	15144	
						15393	15412	
						15459	15478	
						15531	15550	
						15993	16012	
547588	該当なし	該当なし	ACTATAACAGTATCACTGTC	5-10-5	83	14792	14811	991
						15054	15073	
						15126	15145	
						15460	15479	
						15532	15551	
						15994	16013	
547589	該当なし	該当なし	TAACTATAACAGTATCACTG	5-10-5	36	14794	14813	992
						15056	15075	
						15128	15147	
						15161	15180	
						15462	15481	
						15534	15553	
						15567	15586	
						15697	15716	
547590	該当なし	該当なし	ATAACTATAACAGTATCACT	5-10-5	0	14795	14814	993
						15057	15076	
						15129	15148	
						15162	15181	
						15463	15482	
						15535	15554	
						15568	15587	
						15698	15717	
547591	該当なし	該当なし	CCTATAACTATAACAGTATC	5-10-5	23	14798	14817	994
						15060	15079	
						15165	15184	
						15466	15485	
						15538	15557	
						15571	15590	
						15701	15720	
						15772	15791	
						16000	16019	

【 1 2 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1 1】

547592	該当なし	該当なし	TCCTATAACTATAACAGTAT	5-10-5	27	14799	14818	995
						15061	15080	
						15166	15185	
						15467	15486	
						15539	15558	
						15572	15591	
						15702	15721	
547593	該当なし	該当なし	TTCCTATAACTATAACAGTA	5-10-5	29	16001	16020	996
						14800	14819	
						15062	15081	
						15468	15487	
547594	該当なし	該当なし	GTTTCCTATAACTATAACAG	5-10-5	19	15540	15559	997
						14802	14821	
						15064	15083	
						15470	15489	
547595	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACTATA	5-10-5	21	15542	15561	998
						14806	14825	
						14877	14896	
						14936	14955	
						15068	15087	
						15211	15230	
						15283	15302	
						15342	15361	
						15474	15493	
						15546	15565	
						15604	15623	
						15676	15695	
						15747	15766	
						15806	15825	
						15878	15897	
						15936	15955	

【 1 2 9 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1 2】

547596	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAACTAT	5-10-5	14	14807	14826	999	10
						14878	14897		
						14937	14956		
						15069	15088		
						15212	15231		
						15284	15303		
						15343	15362		
						15475	15494		
						15547	15566		
						15605	15624		
						15677	15696		
						15748	15767		
						15807	15826		
						15879	15898		
						15937	15956		
547597	該当なし	該当なし	CAATATCACTGTCCTATATC	5-10-5	29	14856	14875	1000	20
						15190	15209		
						15262	15281		
						15655	15674		
						15726	15745		
						15857	15876		
547598	該当なし	該当なし	ACTATAACAATATCACTGTC	5-10-5	59	14863	14882	1001	30
						15197	15216		
						15269	15288		
						15590	15609		
						15662	15681		
						15733	15752		
						15864	15883		
						15922	15941		
						16090	16109		
						16238	16257		

【 1 2 9 4】

【表 1 2 3 - 1 3】

547599	該当なし	該当なし	TTCCTATAACTATAACAATA	5-10-5	4	14871	14890	1002
						14930	14949	
						15205	15224	
						15277	15296	
						15336	15355	
						15598	15617	
						15670	15689	
						15741	15760	
						15800	15819	
						15872	15891	
547600	該当なし	該当なし	TTTCCTATAACTATAACAAT	5-10-5	26	14872	14891	1003
						14931	14950	
						15206	15225	
						15278	15297	
						15337	15356	
						15599	15618	
						15671	15690	
						15742	15761	
						15801	15820	
						15873	15892	
547601	該当なし	該当なし	GTACCTATAACTCTAACAGT	5-10-5	75	14905	14924	1004
						15024	15043	
						15239	15258	
						15311	15330	
						15430	15449	
						15502	15521	
						15632	15651	
						15834	15853	
						15964	15983	
547602	該当なし	該当なし	TCACTGTACCTATAACTCTA	5-10-5	93	14910	14929	1005
						15029	15048	
						15244	15263	
						15316	15335	
						15435	15454	
						15507	15526	
						15637	15656	
						15839	15858	
						15969	15988	

【 1 2 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1 4】

547603	該当なし	該当なし	TATCACTGTACCTATAACTC	5-10-5	41	14912	14931	1006
						15246	15265	
						15318	15337	
						15509	15528	
						15639	15658	
						15841	15860	
						15971	15990	
547604	該当なし	該当なし	ATATCACTGTACCTATAACT	5-10-5	0	14913	14932	1007
						15247	15266	
						15319	15338	
						15510	15529	
						15640	15659	
						15783	15802	
						15842	15861	
547605	該当なし	該当なし	ACAATATCACTGTACCTATA	5-10-5	43	14916	14935	1008
						15322	15341	
						15786	15805	
						16137	16156	
547606	該当なし	該当なし	AACAATATCACTGTACCTAT	5-10-5	43	14917	14936	1009
						15323	15342	
						15787	15806	
						16138	16157	
547607	該当なし	該当なし	TAACAATATCACTGTACCTA	5-10-5	49	14918	14937	1010
						15324	15343	
						15788	15807	
						16139	16158	
547608	該当なし	該当なし	TATAACAATATCACTGTACC	5-10-5	35	14920	14939	1011
						15326	15345	
						15790	15809	
						16063	16082	
						16141	16160	
547609	該当なし	該当なし	CTATAACAATATCACTGTAC	5-10-5	23	14921	14940	1012
						15327	15346	
						15791	15810	
						16064	16083	
						16142	16161	
547610	該当なし	該当なし	TGTAACAGTATCACTGTACT	5-10-5	45	14953	14972	1013
547611	該当なし	該当なし	CTGTAACAGTATCACTGTAC	5-10-5	71	14954	14973	1014
547612	該当なし	該当なし	CCTGTAACAGTATCACTGTA	5-10-5	68	14955	14974	1015

【1 2 9 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 1 5】

547613	該当なし	該当なし	CTATATCACTGTACCTGTAA	5-10-5	39	14968	14987	1016
547614	該当なし	該当なし	CCTATATCACTGTACCTGTA	5-10-5	81	14969	14988	1017
547615	該当なし	該当なし	TCCTATATCACTGTACCTGT	5-10-5	84	14970	14989	1018
547616	該当なし	該当なし	TGTCCTATATCACTGTACCT	5-10-5	86	14972	14991	1019
						15253	15272	
						15378	15397	
						15516	15535	
						15646	15665	
						15848	15867	
547617	該当なし	該当なし	CTGTCCTATATCACTGTACC	5-10-5	91	14973	14992	1020
						15254	15273	
						15379	15398	
						15517	15536	
						15647	15666	
						15849	15868	
547618	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATATCACTGTAC	5-10-5	87	14974	14993	1021
						15255	15274	
						15380	15399	
						15518	15537	
						15648	15667	
						15850	15869	
547619	該当なし	該当なし	TCCTATAACAGTATCACTGT	5-10-5	70	14989	15008	1022
						15395	15414	
547620	該当なし	該当なし	TTCCTATAACAGTATCACTG	5-10-5	65	14990	15009	1023
						15396	15415	
547621	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAACAGT	5-10-5	12	14997	15016	1024
						15403	15422	
547622	該当なし	該当なし	GTCACCTGTACCTATAACTCT	5-10-5	88	15030	15049	1025
						15436	15455	
547623	該当なし	該当なし	TGTCACCTGTACCTATAACTC	5-10-5	81	15031	15050	1026
						15437	15456	
547624	該当なし	該当なし	ATGTCACCTGTACCTATAACT	5-10-5	64	15032	15051	1027
						15438	15457	

【 1 2 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 1】

表 1 3 6

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止 部位	配列	% 阻 害	モチー フ	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	93	5-10-5	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	

【 1 2 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 2】

						15887	15906	
						15945	15964	
546885	該当なし	該当なし	TATGTCACGTACCTATAAC	46	5-10-5	15033	15052	1028
						15439	15458	
546886	該当なし	該当なし	CTATGTCACGTACCTATAA	80	5-10-5	15034	15053	1029
						15440	15459	
546887	該当なし	該当なし	CCTATGTCACGTACCTATA	82	5-10-5	15035	15054	1030
						15441	15460	
546888	該当なし	該当なし	TCCTATGTCACGTACCTAT	78	5-10-5	15036	15055	1031
						15442	15461	
546889	該当なし	該当なし	GTCCTATGTCACGTACCTA	93	5-10-5	15037	15056	1032
						15443	15462	
546890	該当なし	該当なし	TGTCCTATGTCACGTACCT	78	5-10-5	15038	15057	1033
						15444	15463	
546891	該当なし	該当なし	CTGTCCTATGTCACGTACC	81	5-10-5	15039	15058	1034
						15445	15464	
546892	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATGTCACGTAC	82	5-10-5	15040	15059	1035
						15446	15465	
546893	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATGTCACGTGA	70	5-10-5	15041	15060	1036
						15447	15466	
546894	該当なし	該当なし	TCACGTGTCCTATGTCACGT	91	5-10-5	15042	15061	1037
						15448	15467	
546895	該当なし	該当なし	TATCACTGTCCTATGTCAC	77	5-10-5	15044	15063	1038
						15450	15469	
546896	該当なし	該当なし	GTATCACTGTCCTATGTCAC	75	5-10-5	15045	15064	1039
						15451	15470	
546897	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTCCTATGTCA	90	5-10-5	15046	15065	1040
						15452	15471	
546898	該当なし	該当なし	AACAGTATCACTGTCCTATG	91	5-10-5	15049	15068	1041
						15455	15474	
546899	該当なし	該当なし	CTACCTATAACTCTAACAGT	27	5-10-5	15096	15115	1042
						15170	15189	
546901	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATAACTATAACA	56	5-10-5	15576	15595	1043
						15706	15725	
						16005	16024	
						16076	16095	
						16101	16120	
						16154	16173	
546902	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATAACTATAAC	71	5-10-5	15171	15190	1044
						15577	15596	
						15707	15726	
						16006	16025	
						16077	16096	
						16102	16121	

【1 2 9 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 3】

						16155	16174	
546903	該当なし	該当なし	CCTATATCACTGTACCTATA	91	5-10-5	15250	15269	1045
						15375	15394	
						15513	15532	
						15643	15662	
						15845	15864	
						15975	15994	
546904	該当なし	該当なし	TCCTATATCACTGTACCTAT	80	5-10-5	15251	15270	1046
						15376	15395	
						15514	15533	
						15644	15663	
						15846	15865	
						15976	15995	
546905	該当なし	該当なし	TACCTATAACAGTATCACTG	65	5-10-5	15363	15382	1047
546907	該当なし	該当なし	ATAACTATAACAGTATCACC	37	5-10-5	15769	15788	1048
546908	該当なし	該当なし	TCACTGTACCTATAACTATA	77	5-10-5	15780	15799	1049
						16252	16271	
546909	該当なし	該当なし	AACAATATCACTGTACCTTT	44	5-10-5	16060	16079	1050
546910	該当なし	該当なし	TAACAATATCACTGTACCTT	82	5-10-5	16061	16080	1051
546911	該当なし	該当なし	GTCCTATAACTATAACAATA	52	5-10-5	16073	16092	1052
						16098	16117	
						16151	16170	
547625	該当なし	該当なし	CAGTATCACTGTCCTATGTC	79	5-10-5	15047	15066	1053
						15453	15472	
547626	該当なし	該当なし	ACAGTATCACTGTCCTATGT	91	5-10-5	15048	15067	1054
						15454	15473	
547627	該当なし	該当なし	TCTACCTATAACTCTAACAG	71	5-10-5	15097	15116	1055
547628	該当なし	該当なし	CTCTACCTATAACTCTAACA	34	5-10-5	15098	15117	1056
547629	該当なし	該当なし	ACTCTACCTATAACTCTAAC	0	5-10-5	15099	15118	1057
547630	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATATCACTCTAC	76	5-10-5	15112	15131	1058
547631	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATATCACTCTA	85	5-10-5	15113	15132	1059
547632	該当なし	該当なし	TCACTGTCCTATATCACTCT	87	5-10-5	15114	15133	1060
547633	該当なし	該当なし	ATCACTGTCCTATATCACTC	87	5-10-5	15115	15134	1061
547634	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTTCTA	72	5-10-5	15148	15167	1062
547635	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCT	53	5-10-5	15149	15168	1063
547636	該当なし	該当なし	GTATCACTGTACTAGTTTCT	86	5-10-5	15150	15169	1064
547637	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTACTAGTTT	88	5-10-5	15151	15170	1065
547638	該当なし	該当なし	ATAACAGTATCACTGTACTA	87	5-10-5	15156	15175	1066
						15358	15377	
						15562	15581	
						15692	15711	
547639	該当なし	該当なし	GTCCTATAACTATAACAGTA	72	5-10-5	15894	15913	1067
						15167	15186	
						15573	15592	

【1 3 0 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 4】

						15703	15722	
						16002	16021	
547640	該当なし	該当なし	TGTCCTATAACTATAACAGT	13	5-10-5	15168	15187	1068
						15574	15593	
						15704	15723	
						16003	16022	
547641	該当なし	該当なし	CTGTCCTATAACTATAACAG	43	5-10-5	15169	15188	1069
						15575	15594	
						15705	15724	
						16004	16023	
547642	該当なし	該当なし	TCACTGTCCTATAACTATAA	72	5-10-5	15172	15191	1070
						15578	15597	
						15708	15727	
						16007	16026	
						16078	16097	
						16103	16122	
						16156	16175	
547643	該当なし	該当なし	ATCACTGTCCTATAACTATA	72	5-10-5	15173	15192	1071
						15579	15598	
						15709	15728	
						16008	16027	
						16079	16098	
						16104	16123	
						16157	16176	
						16176	16195	
547644	該当なし	該当なし	TATCACTGTCCTATAACTAT	51	5-10-5	15174	15193	1072
						15580	15599	
						15710	15729	
						16009	16028	
						16080	16099	
						16158	16177	
						16177	16196	
						16228	16247	
547645	該当なし	該当なし	ATATCACTGTCCTATAACTA	60	5-10-5	15175	15194	1073
						15581	15600	
						15711	15730	
						16010	16029	
						16081	16100	
						16159	16178	
						16178	16197	
						16229	16248	
547646	該当なし	該当なし	CTATATCACTGTACCTATAA	23	5-10-5	15249	15268	1074
						15374	15393	
						15512	15531	

【1 3 0 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 5】

						15642	15661	
						15844	15863	
						15974	15993	
547647	該当なし	該当なし	GTCCTATATCACTGTACCTA	92	5-10-5	15252	15271	1075
						15377	15396	
						15515	15534	
						15645	15664	
						15847	15866	
						15977	15996	
547648	該当なし	該当なし	CCTATAACAGTATCACTGTA	83	5-10-5	15361	15380	1076
547649	該当なし	該当なし	ACCTATAACAGTATCACTGT	73	5-10-5	15362	15381	1077
547650	該当なし	該当なし	GTACCTATAACAGTATCACT	32	5-10-5	15364	15383	1078
547651	該当なし	該当なし	TGTACCTATAACAGTATCAC	48	5-10-5	15365	15384	1079
547652	該当なし	該当なし	TCACCTGTACCTATAACAGTA	59	5-10-5	15369	15388	1080
547653	該当なし	該当なし	ATCACTGTACCTATAACAGT	57	5-10-5	15370	15389	1081
547654	該当なし	該当なし	TATCACTGTACCTATAACAG	53	5-10-5	15371	15390	1082
547655	該当なし	該当なし	AATATCACTGTCTTATAACT	37	5-10-5	15582	15601	1083
						16011	16030	
						16082	16101	
						16179	16198	
						16230	16249	
547656	該当なし	該当なし	CAATATCACTGTCTTATAAC	42	5-10-5	15583	15602	1084
						16083	16102	
						16180	16199	
						16231	16250	
547657	該当なし	該当なし	ACAATATCACTGTCTTATAA	43	5-10-5	15584	15603	1085
						16084	16103	
						16181	16200	
						16232	16251	
547658	該当なし	該当なし	CGTACTAGTTTCCTATAACT	68	5-10-5	15750	15769	1086
547659	該当なし	該当なし	ACTATAACAGTATCACCGTA	80	5-10-5	15766	15785	1087
547660	該当なし	該当なし	AACTATAACAGTATCACCGT	68	5-10-5	15767	15786	1088
547661	該当なし	該当なし	TAACTATAACAGTATCACCG	80	5-10-5	15768	15787	1089
547662	該当なし	該当なし	ACCTATAACTATAACAGTAT	0	5-10-5	15773	15792	1090
547663	該当なし	該当なし	TACCTATAACTATAACAGTA	10	5-10-5	15774	15793	1091
547664	該当なし	該当なし	GTACCTATAACTATAACAGT	2	5-10-5	15775	15794	1092
547665	該当なし	該当なし	TGTACCTATAACTATAACAG	10	5-10-5	15776	15795	1093
547666	該当なし	該当なし	ATCACTGTACCTATAACTAT	71	5-10-5	15781	15800	1094
						16253	16272	
547667	該当なし	該当なし	TATCACTGTACCTATAACTA	55	5-10-5	15782	15801	1095
547668	該当なし	該当なし	CAACTATAACAGTATCACTG	44	5-10-5	15899	15918	1096
547669	該当なし	該当なし	ACAACCTATAACAGTATCACT	0	5-10-5	15900	15919	1097
547670	該当なし	該当なし	TACAACCTATAACAGTATCAC	0	5-10-5	15901	15920	1098
547671	該当なし	該当なし	CTACAACCTATAACAGTATCA	0	5-10-5	15902	15921	1099

【1 3 0 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 6】

547672	該当なし	該当なし	CAATATCACTGTCCTACAAC	36	5-10-5	15915	15934	1100
547673	該当なし	該当なし	GAATATCACTGTCCTATAAC	21	5-10-5	16012	16031	1101
547674	該当なし	該当なし	ACAATATCACTGTACCTTTA	53	5-10-5	16059	16078	1102
547675	該当なし	該当なし	TGTCTATAACTATAACAAT	10	5-10-5	16074	16093	1103
						16099	16118	
						16152	16171	
547676	該当なし	該当なし	CTGTCCTATAACTATAACAA	41	5-10-5	16075	16094	1104
						16100	16119	
						16153	16172	

10

【1 3 0 3】

【表 1 2 4 - 7】

表 1 3 7

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番 号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	93	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546529	該当なし	該当なし	GCACCTGGCAGAACAGTACC	5-10-5	65	26419	26438	1105
546578	該当なし	該当なし	GACAGTGGGCCAGAGCCTTG	5-10-5	73	26686	26705	1106
546912	該当なし	該当なし	ACATCACTGTCCTATAACTA	5-10-5	26	16106	16125	1107
546913	該当なし	該当なし	GTACCTATATCACTGTAACCT	5-10-5	38	16126	16145	1108
546914	該当なし	該当なし	ATATCACTGTACCTATATCA	5-10-5	52	16134	16153	1109

20

30

40

50

【1304】

【表124-8】

546915	該当なし	該当なし	TCACCTGTCTATAACTATAT	5-10-5	39	16175	16194	1110
546916	該当なし	該当なし	CGTCACTGTACCTATAACTG	5-10-5	92	16203	16222	1111
546917	該当なし	該当なし	ATCACTGTCTATAACTATT	5-10-5	63	16227	16246	1112
546918	該当なし	該当なし	AACATCACTGTACCTATAAC	5-10-5	14	16256	16275	1113
546926	該当なし	該当なし	GCCATCCAGGGTGCTCTCCC	5-10-5	81	16839	16858	1114
546931	該当なし	該当なし	GCCCCCGAGCACCTTCACT	5-10-5	58	17205	17224	1115
546935	該当なし	該当なし	CGTGGTTAGCCTGACATCTC	5-10-5	86	17412	17431	1116
546939	該当なし	該当なし	GCCATCTGGTTAGCCTCCGA	5-10-5	89	17664	17683	1117
546942	該当なし	該当なし	TACACTGAACCCCTTAGGC	5-10-5	56	18570	18589	1118
546943	該当なし	該当なし	CAGTTTGGCCTTTCCATCTC	5-10-5	54	18819	18838	1119
546944	該当なし	該当なし	GCCACTAACCCACCTCTTAA	5-10-5	42	19140	19159	1120
546946	該当なし	該当なし	ACTCCCATCTACTCCCCAT	5-10-5	41	19291	19310	1121
546954	該当なし	該当なし	CTGCTGATTGTGTCTGGCTC	5-10-5	71	20235	20254	1122
546955	該当なし	該当なし	ACAAGGCTTCGAGGACAGCC	5-10-5	49	20339	20358	1123
546964	該当なし	該当なし	GCGATTCCTTGCTCTGCTG	5-10-5	53	21550	21569	1124
546967	該当なし	該当なし	CACCGCGGAATGCCTGCCT	5-10-5	93	22657	22676	1125
546969	該当なし	該当なし	ATCCAACCTCTCTCCCTATC	5-10-5	53	22901	22920	1126
546970	該当なし	該当なし	GCCCAAGCCTACATGCATAC	5-10-5	61	23426	23445	1127
546975	該当なし	該当なし	GGCCTGGATACAGCCTTTCT	5-10-5	70	23825	23844	1128
546977	該当なし	該当なし	GTCCCGAAGAGTCAAGTCCA	5-10-5	76	24253	24272	1129
546979	該当なし	該当なし	ACTGTTGTCCATAGCAGCAT	5-10-5	71	24504	24523	1130

【1305】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 9】

546980	該当なし	該当なし	AGCCCTCAATTGTTGCTGGT	5-10-5	79	24664	24683	1131
546983	該当なし	該当なし	GATGACCTGCAGATGCACAG	5-10-5	74	24978	24997	1132
546986	該当なし	該当なし	CAGGATAGAACTGATGGTCC	5-10-5	91	25318	25337	1133
546990	該当なし	該当なし	AGAACAGGAGACAATCCACT	5-10-5	49	25680	25699	1134
546994	該当なし	該当なし	GTTCATGTGGCAACCTGTGA	5-10-5	58	26112	26131	1135
547677	該当なし	該当なし	CATCACTGTCCTATAACTAT	5-10-5	62	16105	16124	1136
547678	該当なし	該当なし	TACCTATATCACTGTAAC TA	5-10-5	21	16125	16144	1137
547679	該当なし	該当なし	TGTACCTATATCACTGTAAC	5-10-5	28	16127	16146	1138
547680	該当なし	該当なし	TATCACTGTACCTATATCAC	5-10-5	41	16133	16152	1139
547681	該当なし	該当なし	AATATCACTGTACCTATATC	5-10-5	6	16135	16154	1140
547682	該当なし	該当なし	CAATATCACTGTACCTATAT	5-10-5	20	16136	16155	1141
547683	該当なし	該当なし	ACTATATCACTGTCCTATAA	5-10-5	33	16162	16181	1142
547684	該当なし	該当なし	TAACTATATCACTGTCCTAT	5-10-5	43	16164	16183	1143
547685	該当なし	該当なし	ATAACTATATCACTGTCCTA	5-10-5	35	16165	16184	1144
547686	該当なし	該当なし	CTGTCCTATAACTATATCAC	5-10-5	36	16172	16191	1145
547687	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATAACTATATCA	5-10-5	41	16173	16192	1146
547688	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATAACTATATC	5-10-5	47	16174	16193	1147
547689	該当なし	該当なし	GTAACAATATCACTGTCCTA	5-10-5	73	16184	16203	1148
547690	該当なし	該当なし	CTGTAACAATATCACTGTCC	5-10-5	76	16186	16205	1149
547691	該当なし	該当なし	ACTGTAACAATATCACTGTC	5-10-5	36	16187	16206	1150
547692	該当なし	該当なし	CACTGTACCTATAACTGTAA	5-10-5	47	16200	16219	1151

【1 3 0 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 1 0】

547693	該当なし	該当なし	TCACTGTACCTATAACTGTA	5-10-5	61	16201	16220	1152
547694	該当なし	該当なし	GTCACGTGTACCTATAACTGT	5-10-5	92	16202	16221	1153
547695	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATAACTATTACA	5-10-5	31	16224	16243	1154
547696	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATAACTATTAC	5-10-5	26	16225	16244	1155
547697	該当なし	該当なし	TCACTGTCCTATAACTATTA	5-10-5	63	16226	16245	1156
547698	該当なし	該当なし	ACCTATAACTATAACAATAT	5-10-5	0	16245	16264	1157
547699	該当なし	該当なし	TACCTATAACTATAACAATA	5-10-5	10	16246	16265	1158
547700	該当なし	該当なし	GTACCTATAACTATAACAAT	5-10-5	0	16247	16266	1159
547701	該当なし	該当なし	CATCACTGTACCTATAACTA	5-10-5	49	16254	16273	1160
547702	該当なし	該当なし	ACATCACTGTACCTATAACT	5-10-5	44	16255	16274	1161
547703	該当なし	該当なし	CAACATCACTGTACCTATAA	5-10-5	25	16257	16276	1162
547704	該当なし	該当なし	ACATCTTGTCATTAAACATCC	5-10-5	61	16435	16454	1163
547705	該当なし	該当なし	GCACCCAATACAGGGCCAGG	5-10-5	69	16512	16531	1164
547706	該当なし	該当なし	TGCCTCCTGGCAGCCTTCAA	5-10-5	73	16694	16713	1165
547707	該当なし	該当なし	TGAAAAGCCACGCCCTTAGC	5-10-5	32	16975	16994	1166
547708	該当なし	該当なし	GCCAGGAGACAGCCCTACTC	5-10-5	67	17055	17074	1167
547709	該当なし	該当なし	AGCCCAATGTCCTAACCTGT	5-10-5	76	17791	17810	1168
547710	該当なし	該当なし	TGCGGTTATATGGGCTGAAG	5-10-5	85	19540	19559	1169
547711	該当なし	該当なし	CCTTTAGCCACTCCTCTTGC	5-10-5	45	20061	20080	1170
547712	該当なし	該当なし	CCCCATGGTACCAAAGCCAT	5-10-5	79	20528	20547	1171
547713	該当なし	該当なし	CTCAATGCCACCCTTTCCCC	5-10-5	37	20880	20899	1172

【1 3 0 7】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 1 1】

547714	該当なし	該当なし	CTGTCTAACTGGCCTGGCTG	5-10-5	19	21326	21345	1173
547715	該当なし	該当なし	GGTCAGAAGGCCTCTTATTC	5-10-5	21	21750	21769	1174
547716	該当なし	該当なし	CCATCTGTCCCTCAATCCC	5-10-5	9	22197	22216	1175
547717	該当なし	該当なし	ACTCTGGCACTGGTCATGGA	5-10-5	54	22761	22780	1176
547718	該当なし	該当なし	ATAAAGTGCATTAAAGCCCC	5-10-5	86	23515	23534	1177
547719	該当なし	該当なし	TACCAAGCTTGTAGAAGGGA	5-10-5	69	23633	23652	1178
547720	該当なし	該当なし	GAAAGACGGCCAATGGGAAA	5-10-5	8	24177	24196	1179
547721	該当なし	該当なし	CTCTATCAAAATCCTGCTGC	5-10-5	68	25527	25546	1180
547722	該当なし	該当なし	CTCCAGTCACCACCATTGCC	5-10-5	80	25860	25879	1181

【1 3 0 8】

【表 1 2 5 - 1】

表 1 3 8

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止 部位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	91	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
546599	該当なし	該当なし	AAGAGTAAGCCTTCACAGGG	5-10-5	82	27583	27602	1182

【1 3 0 9】

【表 1 2 5 - 2】

546606	該当なし	該当なし	CTCACCAGAGTTGTCCCCAG	5-10-5	0	27722	27741	1183
546999	該当なし	該当なし	GCAGCTCACACCCAAAAAGC	5-10-5	29	27004	27023	1184
547000	該当なし	該当なし	TCTGTTACCTTGAGGATTGT	5-10-5	63	27276	27295	1185
547006	該当なし	該当なし	CGCCATCTGCCCTGTACAGA	5-10-5	39	28248	28267	1186
547008	該当なし	該当なし	TTGGTGGTGGGATTGGTGGT	5-10-5	81	28333	28352	1187
						28388	28407	
						28443	28462	
						28608	28627	
						28620	28639	
547009	該当なし	該当なし	AATTGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	73	28335	28354	1188
547010	該当なし	該当なし	GAATTGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	39	28336	28355	1189
547011	該当なし	該当なし	GGCAGGATTGGTGGTGAAT	5-10-5	22	28352	28371	1190
547013	該当なし	該当なし	TGAGATTGGTGGGTGGC	5-10-5	0	28369	28388	1191
547015	該当なし	該当なし	GGTGGTGGGATTGGTGCTGA	5-10-5	55	28429	28448	1192
547016	該当なし	該当なし	GTAGGTGGTGGGATTGGTGG	5-10-5	62	28456	28475	1193
						28535	28554	
547017	該当なし	該当なし	GGTAGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	61	28457	28476	1194
						28536	28555	
547018	該当なし	該当なし	GGTGGCGGGATTGGTGGTGG	5-10-5	58	28477	28496	1195
						28556	28575	
547019	該当なし	該当なし	GATCGGTGGTGGGATTGGTC	5-10-5	83	28500	28519	1196
						28579	28598	
547020	該当なし	該当なし	GGATCGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	47	28501	28520	1197
						28580	28599	
547021	該当なし	該当なし	TTGGTGGCGGGATCGGTGGT	5-10-5	57	28510	28529	1198
						28589	28608	
547022	該当なし	該当なし	ATTGGTGGCGGGATCGGTGG	5-10-5	69	28511	28530	1199
547023	該当なし	該当なし	GATTGGTGGCGGGATCGGTG	5-10-5	91	28512	28531	1200
547024	該当なし	該当なし	GGATTGGTGGCGGGATCGGT	5-10-5	56	28513	28532	1201
547025	該当なし	該当なし	TGGTGGTGGGATTGGTGTT	5-10-5	72	28607	28626	1202
547029	該当なし	該当なし	TCTTCTAGGGCCACCTCT	5-10-5	50	28891	28910	1203
547035	該当なし	該当なし	TGGTCCCAAATTGGAGTGCA	5-10-5	40	29383	29402	1204
547039	該当なし	該当なし	TCTCTATACAGCTGGGCACA	5-10-5	0	29997	30016	1205
547049	該当なし	該当なし	CACTTCCCAGCAACCCTCAC	5-10-5	20	30765	30784	1206
547055	該当なし	該当なし	GCTCCTGGCAGCAATGACCC	5-10-5	70	31104	31123	1207
547059	該当なし	該当なし	GGGTATCTTCACTGTCCAG	5-10-5	12	31540	31559	1208
547063	該当なし	該当なし	CGTCATGCTTACCTTCTCC	5-10-5	23	31955	31974	1209
547069	該当なし	該当なし	GCCCTCCGAGCTTTGGCAAC	5-10-5	35	32581	32600	1210
547071	該当なし	該当なし	GCAGCCCCCAGAAATCCCA	5-10-5	27	32708	32727	1211
547076	該当なし	該当なし	TCTCAAGCAGCCTATTGTGT	5-10-5	14	33263	33282	1212
547080	該当なし	該当なし	GTGCAAGACCTTGCTTGCCA	5-10-5	54	33657	33676	1213
547081	該当なし	該当なし	CTGTAGTCCACTACACAGCA	5-10-5	83	33801	33820	1214

【1 3 1 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 5 - 3】

547082	該当なし	該当なし	TCTCCCTGAGTCACAGTGGA	5-10-5	64	33881	33900	1215
547085	該当なし	該当なし	CCAGGTGCAGCACGGAGAGG	5-10-5	44	34479	34498	1216
547723	該当なし	該当なし	TAGAATGGCAGGGTTCTGTG	5-10-5	53	27357	27376	1217
547724	該当なし	該当なし	GATGCATCCAACACTTACCC	5-10-5	16	28059	28078	1218
547725	該当なし	該当なし	ATTGGTGGTGGGATTGGTGG	5-10-5	26	28334	28353	1219
						28389	28408	
						28444	28463	
						28523	28542	
						28609	28628	
						28621	28640	
547726	該当なし	該当なし	GCAGGATTGGTGGTGAATT	5-10-5	0	28351	28370	1220
547727	該当なし	該当なし	TGGCAGGATTGGTGGTGGAA	5-10-5	0	28353	28372	1221
547728	該当なし	該当なし	GAGATTGGTGGTGGGTGGCA	5-10-5	88	28368	28387	1222
547729	該当なし	該当なし	GTGAGATTGGTGGTGGGTGG	5-10-5	45	28370	28389	1223
547730	該当なし	該当なし	GATTGGTGGTGGGATTGGTG	5-10-5	60	28390	28409	1224
						28433	28452	
						28445	28464	
						28524	28543	
						28610	28629	
						28622	28641	
547731	該当なし	該当なし	GGATTGGTGGTGGGATTGGT	5-10-5	49	28391	28410	1225
						28434	28453	
						28446	28465	
						28525	28544	
						28611	28630	
						28623	28642	
547732	該当なし	該当なし	AGGATTGGTGGTGGGATTGG	5-10-5	0	28392	28411	1226
547733	該当なし	該当なし	TAGGATTGGTGGTGGGATTG	5-10-5	0	28393	28412	1227
547734	該当なし	該当なし	GTAGGATTGGTGGTGGGATT	5-10-5	14	28394	28413	1228
547735	該当なし	該当なし	GGTAGGATTGGTGGTGGGAT	5-10-5	39	28395	28414	1229
547736	該当なし	該当なし	TGGTAGGATTGGTGGTGGGA	5-10-5	54	28396	28415	1230
547737	該当なし	該当なし	TGGTGGTGGGATTGGTGCTG	5-10-5	59	28430	28449	1231
547738	該当なし	該当なし	TTGGTGGTGGGATTGGTGCT	5-10-5	41	28431	28450	1232
547739	該当なし	該当なし	ATTGGTGGTGGGATTGGTGC	5-10-5	12	28432	28451	1233
547740	該当なし	該当なし	AGGTGGTGGGATTGGTGGTG	5-10-5	30	28454	28473	1234
						28533	28552	
547741	該当なし	該当なし	TAGGTGGTGGGATTGGTGGT	5-10-5	47	28455	28474	1235
						28534	28553	
547742	該当なし	該当なし	ATCGGTGGTGGGATTGGTCG	5-10-5	57	28499	28518	1236
						28578	28597	
547743	該当なし	該当なし	GGTGGTGGGATTGGTGCGG	5-10-5	61	28520	28539	1237
547744	該当なし	該当なし	TGGTGGTGGGATTGGTGCGG	5-10-5	65	28521	28540	1238

【1 3 1 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 5 - 4】

547745	該当なし	該当なし	TTGGTGGTGGGATTGGTGGC	5-10-5	55	28522	28541	1239
547746	該当なし	該当なし	GTTGGTGGCGGGATCGGTGG	5-10-5	0	28590	28609	1240
547748	該当なし	該当なし	GGTTGGTGGCGGGATCGGTG	5-10-5	78	28591	28610	1241
547750	該当なし	該当なし	TGGTTGGTGGCGGGATCGGT	5-10-5	41	28592	28611	1242
547752	該当なし	該当なし	GTGGTTGGTGGCGGGATCGG	5-10-5	41	28593	28612	1243
547754	該当なし	該当なし	GGGATTGGTGGTTGGTGGCG	5-10-5	47	28600	28619	1244
547756	該当なし	該当なし	GGGTCTTGCTCCACCCACAT	5-10-5	49	29244	29263	1245
547758	該当なし	該当なし	CCAAGTAGTGCAAGGCATGT	5-10-5	24	29540	29559	1246
547760	該当なし	該当なし	ATCATGCTTACTGCAAGTGA	5-10-5	19	30219	30238	1247
547762	該当なし	該当なし	TGAAACTGGGCAGTCCTTCC	5-10-5	0	30417	30436	1248
547764	該当なし	該当なし	CCACCTTCTTACATATGCTA	5-10-5	24	30644	30663	1249
547766	該当なし	該当なし	GCCTCTCAGACGGCACAGAC	5-10-5	0	30902	30921	1250
547768	該当なし	該当なし	TTGCCCTCACACATTCGAAT	5-10-5	0	30977	30996	1251
547770	該当なし	該当なし	TGCTTTCTGCCAACCTCTA	5-10-5	48	31727	31746	1252
547772	該当なし	該当なし	CTGTGCTCCCGGCCATTAGC	5-10-5	0	32312	32331	1253
547774	該当なし	該当なし	GAGACAGTTTGGCAAGCTAC	5-10-5	46	32389	32408	1254
547776	該当なし	該当なし	GGAGAGAGACGGCACCCTGT	5-10-5	48	32828	32847	1255
547778	該当なし	該当なし	TCACCTGTGAGTAACCAATA	5-10-5	53	33085	33104	1256
547780	該当なし	該当なし	CCCCTCTTAAATAGCACATG	5-10-5	67	33441	33460	1257
547782	該当なし	該当なし	CCAAGTATCTCATGTGCCTG	5-10-5	67	33580	33599	1258

10

20

【1 3 1 2】

【表 1 2 6 - 1】

表 1 3 9

ISIS 番号	配列番 号 1 開始部 位	配列番 号 1 終止部 位	配列	モチー フ	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	5-10-5	90	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	

30

40

50

【 1 3 1 3 】

【表 1 2 6 - 2 】

548706	該当なし	該当なし	CTAGTTTCCTATAACT	3-10-3	0	14738	14753	1259
						14809	14824	
						14880	14895	
						14939	14954	
						15071	15086	
						15214	15229	
						15286	15301	
						15345	15360	
						15477	15492	
						15549	15564	
						15607	15622	
						15679	15694	
						15750	15765	
						15809	15824	
						15881	15896	
						15939	15954	
548707	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAAC	3-10-3	10	14739	14754	1260
						14810	14825	
						14881	14896	
						14940	14955	
						15000	15015	
						15072	15087	
						15215	15230	
						15287	15302	
						15346	15361	
						15406	15421	
						15478	15493	
						15550	15565	
						15608	15623	
						15680	15695	
						15751	15766	
						15810	15825	
						15882	15897	
						15940	15955	
548708	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAA	3-10-3	0	14740	14755	1261
						14811	14826	
						14882	14897	
						14941	14956	
						15001	15016	
						15073	15088	
						15216	15231	
						15288	15303	

【 1 3 1 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 3】

						15347	15362	
						15407	15422	
						15479	15494	
						15551	15566	
						15609	15624	
						15681	15696	
						15752	15767	
						15811	15826	
						15883	15898	
						15941	15956	
548709	該当なし	該当なし	GTACTAGTTTCCTATA	3-10-3	0	14741	14756	1262
						14812	14827	
						14883	14898	
						14942	14957	
						15002	15017	
						15074	15089	
						15217	15232	
						15289	15304	
						15348	15363	
						15408	15423	
						15480	15495	
						15552	15567	
						15610	15625	
						15682	15697	
						15753	15768	
						15812	15827	
						15884	15899	
						15942	15957	
548710	該当なし	該当なし	TGTACTAGTTTCCTAT	3-10-3	0	14742	14757	1263
						14813	14828	
						14884	14899	
						14943	14958	
						15003	15018	
						15075	15090	
						15218	15233	
						15290	15305	
						15349	15364	
						15409	15424	
						15481	15496	
						15553	15568	
						15611	15626	
						15683	15698	

【1 3 1 5】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 4】

						15813	15828	
						15885	15900	
						15943	15958	
548711	該当なし	該当なし	CTGTACTAGTTTCCTA	3-10-3	21	14743	14758	1264
						14814	14829	
						14885	14900	
						14944	14959	
						15004	15019	
						15076	15091	
						15219	15234	
						15291	15306	
						15350	15365	
						15410	15425	
						15482	15497	
						15554	15569	
						15612	15627	
						15684	15699	
						15814	15829	
548712	該当なし	該当なし	ACTGTACTAGTTTCCT	3-10-3	9	15886	15901	1265
						15944	15959	
						14744	14759	
						14815	14830	
						14886	14901	
						14945	14960	
						15005	15020	
						15077	15092	
						15220	15235	
						15292	15307	
						15351	15366	
						15411	15426	
						15483	15498	
						15555	15570	
						15613	15628	
						15685	15700	
548713	該当なし	該当なし	CACTGTACTAGTTTCC	3-10-3	33	15815	15830	1266
						15887	15902	
						15945	15960	
						14745	14760	
						14816	14831	
						14887	14902	
						14946	14961	
						15006	15021	

【1 3 1 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 5】

						15078	15093	
						15221	15236	
						15293	15308	
						15352	15367	
						15412	15427	
						15484	15499	
						15556	15571	
						15614	15629	
						15686	15701	
						15816	15831	
						15888	15903	
						15946	15961	
548714	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTTC	3-10-3	15	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548715	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTT	3-10-3	0	14747	14762	1268
						14818	14833	
						14889	14904	
						14948	14963	
						15008	15023	
						15080	15095	
						15152	15167	
						15223	15238	
						15295	15310	
						15354	15369	
						15414	15429	
						15486	15501	
						15558	15573	

【1 3 1 7】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 6】

						15616	15631	
						15688	15703	
						15818	15833	
						15890	15905	
						15948	15963	
548716	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTT	3-10-3	10	14748	14763	1269
						14819	14834	
						14890	14905	
						14949	14964	
						15009	15024	
						15081	15096	
						15153	15168	
						15224	15239	
						15296	15311	
						15355	15370	
						15415	15430	
						15487	15502	
						15559	15574	
						15617	15632	
						15689	15704	
						15819	15834	
						15891	15906	
						15949	15964	
548717	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACT	3-10-4	0	14738	14754	1270
						14809	14825	
						14880	14896	
						14939	14955	
						15071	15087	
						15214	15230	
						15286	15302	
						15345	15361	
						15477	15493	
						15549	15565	
						15607	15623	
						15679	15695	
						15750	15766	
						15809	15825	
						15881	15897	
						15939	15955	
548718	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAAC	3-10-4	0	14739	14755	1271
						14810	14826	
						14881	14897	

【1 3 1 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 7】

						14940	14956	
						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
548719	該当なし	該当なし	GTACTAGTTCCTATAA	3-10-4	0	14740	14756	1272
						14811	14827	
						14882	14898	
						14941	14957	
						15001	15017	
						15073	15089	
						15216	15232	
						15288	15304	
						15347	15363	
						15407	15423	
						15479	15495	
						15551	15567	
						15609	15625	
						15681	15697	
						15752	15768	
548720	該当なし	該当なし	TGTACTAGTTCCTATA	3-10-4	0	15811	15827	1273
						15883	15899	
						15941	15957	
						14741	14757	
						14812	14828	
						14883	14899	
						14942	14958	
						15002	15018	
						15074	15090	
						15217	15233	
						15289	15305	
						15348	15364	

【1 3 1 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 8】

						15408	15424	
						15480	15496	
						15552	15568	
						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
548721	該当なし	該当なし	CTGTACTAGTTTCCTAT	3-10-4	27	14742	14758	1274
						14813	14829	
						14884	14900	
						14943	14959	
						15003	15019	
						15075	15091	
						15218	15234	
						15290	15306	
						15349	15365	
						15409	15425	
						15481	15497	
						15553	15569	
						15611	15627	
						15683	15699	
						15813	15829	
						15885	15901	
						15943	15959	
548722	該当なし	該当なし	ACTGTACTAGTTTCCTA	3-10-4	26	14743	14759	1275
						14814	14830	
						14885	14901	
						14944	14960	
						15004	15020	
						15076	15092	
						15219	15235	
						15291	15307	
						15350	15366	
						15410	15426	
						15482	15498	
						15554	15570	
						15612	15628	
						15684	15700	
						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	

【1 3 2 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 9】

548723	該当なし	該当なし	CACTGTACTAGTTTCCT	3-10-4	62	14744	14760	1276
						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	
						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
548724	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTTCC	3-10-4	61	14745	14761	1277
						14816	14832	
						14887	14903	
						14946	14962	
						15006	15022	
						15078	15094	
						15221	15237	
						15293	15309	
						15352	15368	
						15412	15428	
						15484	15500	
						15556	15572	
						15614	15630	
						15686	15702	
						15816	15832	
						15888	15904	
						15946	15962	
548725	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTTC	3-10-4	32	14746	14762	1278
						14817	14833	
						14888	14904	
						14947	14963	
						15007	15023	
						15079	15095	
						15222	15238	
						15294	15310	

【1 3 2 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 0】

						15353	15369	
						15413	15429	
						15485	15501	
						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	
						15889	15905	
						15947	15963	
548726	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTT	3-10-4	21	14747	14763	1279
						14818	14834	
						14889	14905	
						14948	14964	
						15008	15024	
						15080	15096	
						15152	15168	
						15223	15239	
						15295	15311	
						15354	15370	
						15414	15430	
						15486	15502	
						15558	15574	
						15616	15632	
						15688	15704	
						15818	15834	
548727	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACT	4-10-3	0	14738	14754	1270
						14809	14825	
						14880	14896	
						14939	14955	
						15071	15087	
						15214	15230	
						15286	15302	
						15345	15361	
						15477	15493	
						15549	15565	
						15607	15623	
						15679	15695	
						15750	15766	
						15809	15825	
						15881	15897	

【1 3 2 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 1】

						15939	15955	
548728	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAAC	4-10-3	0	14739	14755	1271
						14810	14826	
						14881	14897	
						14940	14956	
						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
548729	該当なし	該当なし	GTACTAGTTTCCTATAA	4-10-3	13	14740	14756	1272
						14811	14827	
						14882	14898	
						14941	14957	
						15001	15017	
						15073	15089	
						15216	15232	
						15288	15304	
						15347	15363	
						15407	15423	
						15479	15495	
						15551	15567	
						15609	15625	
						15681	15697	
						15752	15768	
						15811	15827	
						15883	15899	
						15941	15957	
548730	該当なし	該当なし	TGTACTAGTTTCCTATA	4-10-3	0	14741	14757	1273
						14812	14828	
						14883	14899	
						14942	14958	
						15002	15018	

【1 3 2 3】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 2】

						15074	15090	
						15217	15233	
						15289	15305	
						15348	15364	
						15408	15424	
						15480	15496	
						15552	15568	
						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
548731	該当なし	該当なし	CTGTACTAGTTTCCTAT	4-10-3	49	14742	14758	
						14813	14829	
						14884	14900	
						14943	14959	
						15003	15019	
						15075	15091	
						15218	15234	
						15290	15306	
						15349	15365	1274
						15409	15425	
						15481	15497	
						15553	15569	
						15611	15627	
						15683	15699	
						15813	15829	
						15885	15901	
						15943	15959	
548732	該当なし	該当なし	ACTGTACTAGTTTCCTA	4-10-3	36	14743	14759	
						14814	14830	
						14885	14901	
						14944	14960	
						15004	15020	
						15076	15092	
						15219	15235	
						15291	15307	
						15350	15366	
						15410	15426	
						15482	15498	
						15554	15570	
						15612	15628	

10

20

30

40

【1 3 2 4】

50

【表 1 2 6 - 1 3】

						15684	15700	
						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	
548733	該当なし	該当なし	CACTGTACTAGTTTCCT	4-10-3	84	14744	14760	1276
						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	
						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
548734	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTTCC	4-10-3	51	14745	14761	1277
						14816	14832	
						14887	14903	
						14946	14962	
						15006	15022	
						15078	15094	
						15221	15237	
						15293	15309	
						15352	15368	
						15412	15428	
						15484	15500	
						15556	15572	
						15614	15630	
						15686	15702	
						15816	15832	
						15888	15904	
						15946	15962	
548735	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTTC	4-10-3	48	14746	14762	1278
						14817	14833	
						14888	14904	
						14947	14963	

【1 3 2 5】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 4】

						15007	15023	
						15079	15095	
						15222	15238	
						15294	15310	
						15353	15369	
						15413	15429	
						15485	15501	
						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	
						15889	15905	
						15947	15963	
548736	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTT	4-10-3	21	14747	14763	1279
						14818	14834	
						14889	14905	
						14948	14964	
						15008	15024	
						15080	15096	
						15152	15168	
						15223	15239	
						15295	15311	
						15354	15370	
						15414	15430	
						15486	15502	
						15558	15574	
						15616	15632	
						15688	15704	
						15818	15834	
						15890	15906	
						15948	15964	
548737	該当なし	該当なし	ACTAGTTTCCTATAACT	4-9-4	11	14738	14754	1270
						14809	14825	
						14880	14896	
						14939	14955	
						15071	15087	
						15214	15230	
						15286	15302	
						15345	15361	
						15477	15493	
						15549	15565	
						15607	15623	

【1 3 2 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 5】

						15679	15695	
						15750	15766	
						15809	15825	
						15881	15897	
						15939	15955	
						14739	14755	
						14810	14826	
						14881	14897	
						14940	14956	
						15000	15016	
						15072	15088	
						15215	15231	
						15287	15303	
						15346	15362	
						15406	15422	
						15478	15494	
						15550	15566	
						15608	15624	
						15680	15696	
						15751	15767	
						15810	15826	
						15882	15898	
						15940	15956	
						14740	14756	
						14811	14827	
						14882	14898	
						14941	14957	
						15001	15017	
						15073	15089	
						15216	15232	
						15288	15304	
						15347	15363	
						15407	15423	
						15479	15495	
						15551	15567	
						15609	15625	
						15681	15697	
						15752	15768	
						15811	15827	
						15883	15899	
						15941	15957	
548738	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAAC	4-9-4	0			1271
548739	該当なし	該当なし	GTACTAGTTTCCTATAA	4-9-4	0			1272
548740	該当なし	該当なし	TGTACTAGTTTCCTATA	4-9-4	0	14741	14757	1273

【1 3 2 7】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 6】

	し	し				14812	14828	
						14883	14899	
						14942	14958	
						15002	15018	
						15074	15090	
						15217	15233	
						15289	15305	
						15348	15364	
						15408	15424	
						15480	15496	
						15552	15568	
						15610	15626	
						15682	15698	
						15812	15828	
						15884	15900	
						15942	15958	
548741	該当なし	該当なし	CTGTACTAGTTTCCTAT	4-9-4	69	14742	14758	1274
						14813	14829	
						14884	14900	
						14943	14959	
						15003	15019	
						15075	15091	
						15218	15234	
						15290	15306	
						15349	15365	
						15409	15425	
						15481	15497	
						15553	15569	
						15611	15627	
						15683	15699	
						15813	15829	
						15885	15901	
						15943	15959	
548742	該当なし	該当なし	ACTGTACTAGTTTCCTA	4-9-4	50	14743	14759	1275
						14814	14830	
						14885	14901	
						14944	14960	
						15004	15020	
						15076	15092	
						15219	15235	
						15291	15307	
						15350	15366	

【1 3 2 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 7】

						15410	15426	
						15482	15498	
						15554	15570	
						15612	15628	
						15684	15700	
						15814	15830	
						15886	15902	
						15944	15960	
548743	該当なし	該当なし	CACTGTACTAGTTTCCT	4-9-4	80	14744	14760	1276
						14815	14831	
						14886	14902	
						14945	14961	
						15005	15021	
						15077	15093	
						15220	15236	
						15292	15308	
						15351	15367	
						15411	15427	
						15483	15499	
						15555	15571	
						15613	15629	
						15685	15701	
						15815	15831	
						15887	15903	
						15945	15961	
548744	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTTCC	4-9-4	83	14745	14761	1277
						14816	14832	
						14887	14903	
						14946	14962	
						15006	15022	
						15078	15094	
						15221	15237	
						15293	15309	
						15352	15368	
						15412	15428	
						15484	15500	
						15556	15572	
						15614	15630	
						15686	15702	
						15816	15832	
						15888	15904	
						15946	15962	

【1 3 2 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 8】

548745	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTTC	4-9-4	71	14746	14762	1278
						14817	14833	
						14888	14904	
						14947	14963	
						15007	15023	
						15079	15095	
						15222	15238	
						15294	15310	
						15353	15369	
						15413	15429	
						15485	15501	
						15557	15573	
						15615	15631	
						15687	15703	
						15817	15833	
						15889	15905	
						15947	15963	
548746	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTT	4-9-4	40	14747	14763	1279
						14818	14834	
						14889	14905	
						14948	14964	
						15008	15024	
						15080	15096	
						15152	15168	
						15223	15239	
						15295	15311	
						15354	15370	
						15414	15430	
						15486	15502	
						15558	15574	
						15616	15632	
						15688	15704	
						15818	15834	
						15890	15906	
						15948	15964	
548747	該当なし	該当なし	TACTAGTTTCCTATAACT	4-10-4	2	14738	14755	1280
						14809	14826	
						14880	14897	
						14939	14956	
						15071	15088	
						15214	15231	
						15286	15303	

【1 3 3 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1 9】

						15345	15362	
						15477	15494	
						15549	15566	
						15607	15624	
						15679	15696	
						15750	15767	
						15809	15826	
						15881	15898	
						15939	15956	
548748	該当なし	該当なし	GTACTAGTTTCCTATAAC	4-10-4	0	14739	14756	1281
						14810	14827	
						14881	14898	
						14940	14957	
						15000	15017	
						15072	15089	
						15215	15232	
						15287	15304	
						15346	15363	
						15406	15423	
						15478	15495	
						15550	15567	
						15608	15625	
						15680	15697	
						15751	15768	
						15810	15827	
548749	該当なし	該当なし	TGTACTAGTTTCCTATAA	4-10-4	0	15882	15899	1282
						15940	15957	
						14740	14757	
						14811	14828	
						14882	14899	
						14941	14958	
						15001	15018	
						15073	15090	
						15216	15233	
						15288	15305	
						15347	15364	
						15407	15424	
						15479	15496	
						15551	15568	
						15609	15626	
						15681	15698	
						15811	15828	

【 1 3 3 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 0】

						15883	15900	
						15941	15958	
548750	該当なし	該当なし	CTGTACTAGTTTCCTATA	4-10-4	62	14741	14758	1283
						14812	14829	
						14883	14900	
						14942	14959	
						15002	15019	
						15074	15091	
						15217	15234	
						15289	15306	
						15348	15365	
						15408	15425	
						15480	15497	
						15552	15569	
						15610	15627	
						15682	15699	
						15812	15829	
						15884	15901	
						15942	15959	
548751	該当なし	該当なし	ACTGTACTAGTTTCCTAT	4-10-4	53	14742	14759	1284
						14813	14830	
						14884	14901	
						14943	14960	
						15003	15020	
						15075	15092	
						15218	15235	
						15290	15307	
						15349	15366	
						15409	15426	
						15481	15498	
						15553	15570	
						15611	15628	
						15683	15700	
						15813	15830	
						15885	15902	
						15943	15960	
548752	該当なし	該当なし	CACTGTACTAGTTTCCTA	4-10-4	89	14743	14760	1285
						14814	14831	
						14885	14902	
						14944	14961	
						15004	15021	
						15076	15093	

【1 3 3 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 1】

						15219	15236	
						15291	15308	
						15350	15367	
						15410	15427	
						15482	15499	
						15554	15571	
						15612	15629	
						15684	15701	
						15814	15831	
						15886	15903	
						15944	15961	
548753	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTTCCT	4-10-4	82	14744	14761	1286
						14815	14832	
						14886	14903	
						14945	14962	
						15005	15022	
						15077	15094	
						15220	15237	
						15292	15309	
						15351	15368	
						15411	15428	
						15483	15500	
						15555	15572	
						15613	15630	
						15685	15702	
						15815	15832	
						15887	15904	
						15945	15962	
548754	該当なし	該当なし	ATCACTGTACTAGTTTCC	4-10-4	77	14745	14762	1287
						14816	14833	
						14887	14904	
						14946	14963	
						15006	15023	
						15078	15095	
						15221	15238	
						15293	15310	
						15352	15369	
						15412	15429	
						15484	15501	
						15556	15573	
						15614	15631	
						15686	15703	

【1 3 3 3】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 2】

						15816	15833	
						15888	15905	
						15946	15963	
548755	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTC	4-10-4	20	14746	14763	1288
						14817	14834	
						14888	14905	
						14947	14964	
						15007	15024	
						15079	15096	
						15222	15239	
						15294	15311	
						15353	15370	
						15413	15430	
						15485	15502	
						15557	15574	
						15615	15632	
						15687	15704	
548756	該当なし	該当なし	GTATCACTGTACTAGTT	4-9-4	81	14748	14764	1289
						14819	14835	
						14890	14906	
						14949	14965	
						15009	15025	
						15081	15097	
						15153	15169	
						15224	15240	
						15296	15312	
						15355	15371	
						15415	15431	
						15487	15503	
						15559	15575	
						15617	15633	
548757	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTACTAGT	4-9-4	87	14749	14765	1290
						14820	14836	
						14891	14907	
						14950	14966	

【1 3 3 4】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 3】

						15010	15026	
						15082	15098	
						15154	15170	
						15225	15241	
						15297	15313	
						15356	15372	
						15416	15432	
						15488	15504	
						15560	15576	
						15618	15634	
						15690	15706	
						15820	15836	
						15892	15908	
						15950	15966	
548758	該当なし	該当なし	CAGTATCACTGTACTAG	4-9-4	97	14750	14766	1291
						14821	14837	
						14892	14908	
						14951	14967	
						15011	15027	
						15083	15099	
						15155	15171	
						15226	15242	
						15298	15314	
						15357	15373	
						15417	15433	
						15489	15505	
						15561	15577	
						15619	15635	
						15691	15707	
						15821	15837	
548759	該当なし	該当なし	AACAGTATCACTGTACT	4-9-4	68	15893	15909	1292
						15951	15967	
						14752	14768	
						14823	14839	
						14894	14910	
						14953	14969	
						15013	15029	
						15085	15101	
						15157	15173	
						15228	15244	
						15300	15316	
						15359	15375	

【1 3 3 5】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 4】

						15419	15435	
						15491	15507	
						15563	15579	
						15621	15637	
						15693	15709	
						15823	15839	
						15895	15911	
						15953	15969	
548760	該当なし	該当なし	TAACAGTATCACTGTAC	4-9-4	53	14753	14769	1293
						14824	14840	
						14895	14911	
						14954	14970	
						15014	15030	
						15086	15102	
						15158	15174	
						15229	15245	
						15301	15317	
						15360	15376	
						15420	15436	
						15492	15508	
						15564	15580	
						15622	15638	
						15694	15710	
						15824	15840	
548761	該当なし	該当なし	CTAACAGTATCACTGTA	4-9-4	49	14754	14770	1294
						14825	14841	
						14896	14912	
						15015	15031	
						15087	15103	
						15230	15246	
						15302	15318	
						15421	15437	
						15493	15509	
						15623	15639	
548762	該当なし	該当なし	TCTAACAGTATCACTGT	4-9-4	16	15825	15841	1295
						15955	15971	
						14755	14771	
						14826	14842	
						14897	14913	
						15016	15032	

【1 3 3 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 5】

						15088	15104	
						15231	15247	
						15303	15319	
						15422	15438	
						15494	15510	
						15624	15640	
						15826	15842	
						15956	15972	
548763	該当なし	該当なし	CTCTAACAGTATCACTG	4-9-4	44	14756	14772	1296
						14827	14843	
						14898	14914	
						15017	15033	
						15089	15105	
						15232	15248	
						15304	15320	
						15423	15439	
						15495	15511	
						15625	15641	
						15827	15843	
						15957	15973	
548764	該当なし	該当なし	TATCACTGTCCTATAAC	4-9-4	31	14772	14788	1297
						14843	14859	
						15177	15193	
						15583	15599	
						15713	15729	
						16012	16028	
						16083	16099	
						16161	16177	
						16180	16196	
						16231	16247	
548765	該当なし	該当なし	ATATCACTGTCCTATAA	4-9-4	0	14773	14789	1298
						14844	14860	
						15178	15194	
						15584	15600	
						15714	15730	
						16013	16029	
						16084	16100	
						16162	16178	
						16181	16197	
						16232	16248	
548766	該当なし	該当なし	TATATCACTGTCCTATA	4-9-4	36	14774	14790	1299
						14845	14861	

【1 3 3 7】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 6】

						15179	15195	
						15715	15731	
						16163	16179	
548767	該当なし	該当なし	TATCACTGTCCTATATC	4-9-4	59	14785	14801	1300
						14856	14872	
						14981	14997	
						15119	15135	
						15190	15206	
						15262	15278	
						15387	15403	
						15525	15541	
						15655	15671	
						15726	15742	
						15857	15873	
						15987	16003	
548768	該当なし	該当なし	GTATCACTGTCCTATAT	4-9-4	56	14786	14802	1301
						14982	14998	
						15120	15136	
						15388	15404	
						15526	15542	
						15988	16004	
548769	該当なし	該当なし	AGTATCACTGTCCTATA	4-9-4	64	14787	14803	1302
						14983	14999	
						15121	15137	
						15389	15405	
						15527	15543	
						15989	16005	
548770	該当なし	該当なし	TAACAGTATCACTGTCC	4-9-4	92	14791	14807	1303
						14987	15003	
						15053	15069	
						15125	15141	
						15393	15409	
						15459	15475	
						15531	15547	
						15993	16009	
548771	該当なし	該当なし	ATAACAGTATCACTGTC	4-9-4	62	14792	14808	1304
						14988	15004	
						15054	15070	
						15126	15142	
						15394	15410	
						15460	15476	
						15532	15548	

【1 3 3 8】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 7】

						15994	16010	
548772	該当なし	該当なし	TATAACAGTATCACTGT	4-9-4	0	14793	14809	1305
						14989	15005	
						15055	15071	
						15127	15143	
						15160	15176	
						15362	15378	
						15395	15411	
						15461	15477	
						15533	15549	
						15566	15582	
						15696	15712	
						15898	15914	
						15995	16011	
548773	該当なし	該当なし	CTATAACAGTATCACTG	4-9-4	0	14794	14810	1306
						14990	15006	
						15056	15072	
						15128	15144	
						15161	15177	
						15363	15379	
						15396	15412	
						15462	15478	
						15534	15550	
						15567	15583	
						15697	15713	
						15899	15915	
						15996	16012	
548774	該当なし	該当なし	CCTATAACTATAACAGT	4-9-4	0	14801	14817	1307
						15063	15079	
						15168	15184	
						15469	15485	
						15541	15557	
						15574	15590	
						15704	15720	
						15775	15791	
548775	該当なし	該当なし	TCCTATAACTATAACAG	4-9-4	0	16003	16019	1308
						14802	14818	
						15064	15080	
						15169	15185	
						15470	15486	
						15542	15558	
						15575	15591	

【1 3 3 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2 8】

						15705	15721	
						16004	16020	
548776	該当なし	該当なし	CCTATAACTATAACAAT	4-9-4	0	14872	14888	1309
						14931	14947	
						15206	15222	
						15278	15294	
						15337	15353	
						15599	15615	
						15671	15687	
						15742	15758	
						15801	15817	
						15873	15889	
						15931	15947	
						16074	16090	
						16099	16115	
						16152	16168	
						16247	16263	
548777	該当なし	該当なし	GTAACAGTATCACTGTA	4-9-4	41	14955	14971	1310
548778	該当なし	該当なし	ATAACAGTATCACTGTA	4-9-4	20	15159	15175	1311
						15361	15377	
						15565	15581	
						15695	15711	
548779	該当なし	該当なし	GTCCTATAACTATAACA	4-9-4	0	15897	15913	1312
						15170	15186	
						15576	15592	
						15706	15722	
						16005	16021	
548780	該当なし	該当なし	TGTCCTATAACTATAAC	4-9-4	22	16076	16092	1313
						16101	16117	
						16154	16170	
						15171	15187	
						15577	15593	
						15707	15723	
548781	該当なし	該当なし	ACCTATAACTATAACAG	4-9-4	0	16006	16022	1314
						16077	16093	
548782	該当なし	該当なし	TACCTATAACTATAACA	4-9-4	0	16102	16118	1315
						16155	16171	
						15776	15792	
548783	該当なし	該当なし	ACCTATAACTATAACAA	4-9-4	0	15777	15793	1316
						16249	16265	

【1 3 4 0】

【表 1 2 6 - 2 9】

548783	該当なし	該当なし	ACCTATAACTATAACAA	4-9-4	0	16248	16264	1316

【1 3 4 1】

実施例 1 1 6 : M O E、デオキシ及び c E t 糖修飾を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドによる H e p a R G (商 標) 細胞中のヒト P K K のアンチセンス阻害

追加のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、P K K 核酸を標的にするように設計し、P K K mRNA に対する効果について *in vitro* 試験を行った。

【1342】

以下の表のキメラのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシ、MOE 及び c E t ギャップマーとして設計した。ギャップマーは長さが16ヌクレオチドであり、そのヌクレオチドはMOE 糖修飾、c E t 糖修飾、またはデオキシ修飾のいずれかを有する。列「化学構造」は、各オリゴヌクレオチドの糖修飾を記載している。「k」はc E t 糖修飾を示し、その数はデオキシヌクレオシドの数を示し、そうでなければ、「d」はデオキシヌクレオシドを示し、「e」は2'-O-メトキシエチル修飾を示す。各ギャップマー全体のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。各オリゴヌクレオチド全体のすべてのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的となる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的となる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、配列番号1として本明細書で設計したヒトP K K mRNA、または配列番号10として本明細書で設計したヒトP K K 遺伝子配列のいずれかを標的とする。「該当なし」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、当該特定の遺伝子配列を標的としないことを示す。

【1343】

ウェルあたり20,000個の細胞密度の培養されたHepaRG（商標）に、1,000nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。約24時間処理を行った後、RNAを細胞から単離し、P K K mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3454を使用してmRNAレベルを測定した。ISIS 531231もこのアッセイに含めた。P K K mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）によって測定する総RNA含量に従って調整した。同様の培養条件を有する一連の実験でアンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を行った。各実験の結果は、以下に示す別個の表に表す。結果は、未処理の対照細胞に対するP K Kの阻害率（%）として表す。

【1344】

10

20

30

40

50

【表 1 2 7 - 1】

表 1 4 0

ISIS 番号	配列 番号 1 開 始部 位	配列 番号 1 終 止部 位	配列	化学構造	%阻害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配列 番号
547747	該当 なし	該当 なし	TCACTGTACTAGTTTC	eekd ₁₀ kke	95	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548074	1642	1657	CCTTTCTCCTTCGAGA	eekd ₁₀ kke	0	31948	31963	1317
548075	1643	1658	ACCTTTCTCCTTCGAG	eekd ₁₀ kke	0	31949	31964	1318
548076	1644	1659	CACCTTTCTCCTTCGA	eekd ₁₀ kke	26	該当 なし	該当 なし	1319
548077	1691	1706	ATTGTTACCAAAGGA	eekd ₁₀ kke	51	33135	33150	1320
548078	1696	1711	TCTTCATTTGTTACCA	eekd ₁₀ kke	36	33140	33155	1321
548079	1762	1777	CCTTCTTTATAGCCAG	eekd ₁₀ kke	39	33206	33221	1322
548080	1763	1778	CCCTTCTTTATAGCCA	eekd ₁₀ kke	0	33207	33222	1323
548081	1764	1779	CCCCTTCTTTATAGCC	eekd ₁₀ kke	64	33208	33223	1324
548082	1776	1791	AAGCATCTTTTCCCCC	eekd ₁₀ kke	42	33220	33235	1325
548083	1800	1815	AGGGACCACCTGAATC	eekd ₁₀ kke	0	33899	33914	1326
548084	1801	1816	AAGGGACCACCTGAAT	eekd ₁₀ kke	0	33900	33915	1327
548085	1802	1817	TAAGGGACCACCTGAA	eekd ₁₀ kke	8	33901	33916	1328
548086	1803	1818	CTAAGGGACCACCTGA	eekd ₁₀ kke	36	33902	33917	1329
548087	1804	1819	ACTAAGGGACCACCTG	eekd ₁₀ kke	24	33903	33918	1330
548088	1805	1820	AACTAAGGGACCACCT	eekd ₁₀ kke	27	33904	33919	1331
548089	1806	1821	AACTAAGGGACCACC	eekd ₁₀ kke	34	33905	33920	1332
548090	1807	1822	CAAATAAGGGACCAC	eekd ₁₀ kke	46	33906	33921	1333
548091	1809	1824	TGCAAACTAAGGGACC	eekd ₁₀ kke	62	33908	33923	1334

【 1 3 4 5】

10

20

30

40

50

【表 1 2 7 - 2】

548092	1810	1825	TTGCAAACTAAGGGAC	eed ₁₀ kke	30	33909	33924	1335
548093	1811	1826	TTTGCAAACTAAGGGA	eed ₁₀ kke	0	33910	33925	1336
548094	1812	1827	GTTTGCAAACTAAGGG	eed ₁₀ kke	74	33911	33926	1337
548095	1813	1828	TGTTTGCAAACTAAGG	eed ₁₀ kke	35	33912	33927	1338
548096	1814	1829	GTGTTTGCAAACTAAG	eed ₁₀ kke	23	33913	33928	1339
548097	1876	1891	TGCTCCCTGCGGGCAC	eed ₁₀ kke	2	33975	33990	1340
548098	1887	1902	AGACACCAGGTTGCTC	eed ₁₀ kke	0	33986	34001	1341
548099	1904	1919	CTCAGCGACTTTGGTG	eed ₁₀ kke	55	34003	34018	1342
548100	1905	1920	ACTCAGCGACTTTGGT	eed ₁₀ kke	25	34004	34019	1343
548101	1906	1921	TACTCAGCGACTTTGG	eed ₁₀ kke	47	34005	34020	1344
548102	1907	1922	GTA CT CAGCGACTTTG	eed ₁₀ kke	58	34006	34021	1345
548103	1908	1923	TGTA CT CAGCGACTTT	eed ₁₀ kke	66	34007	34022	1346
548104	1909	1924	ATGTA CT CAGCGACTT	eed ₁₀ kke	59	34008	34023	1347
548105	1910	1925	CATGTA CT CAGCGACT	eed ₁₀ kke	49	34009	34024	1348
548106	1911	1926	CCATGTA CT CAGCGAC	eed ₁₀ kke	79	34010	34025	1349
548107	1912	1927	TCCATGTA CT CAGCGA	eed ₁₀ kke	76	34011	34026	1350
548108	1953	1968	GAGCTTTTCCATCACT	eed ₁₀ kke	61	34052	34067	1351
548109	1959	1974	GCATCTGAGCTTTTCC	eed ₁₀ kke	77	34058	34073	1352
548110	1960	1975	TGCATCTGAGCTTTTC	eed ₁₀ kke	62	34059	34074	1353
548111	1963	1978	GACTGCATCTGAGCTT	eed ₁₀ kke	53	34062	34077	1354
548112	1965	1980	GTGACTGCATCTGAGC	eed ₁₀ kke	23	34064	34079	1355
548113	1966	1981	GGTGACTGCATCTGAG	eed ₁₀ kke	56	34065	34080	1356
548114	1967	1982	TGGTGACTGCATCTGA	eed ₁₀ kke	70	34066	34081	1357
548115	1972	1987	CATGCTGGTGACTGCA	eed ₁₀ kke	76	34071	34086	1358
548116	1973	1988	TCATGCTGGTGACTGC	eed ₁₀ kke	3	34072	34087	1359
548117	1974	1989	CTCATGCTGGTGACTG	eed ₁₀ kke	73	34073	34088	1360
548118	1975	1990	TCTCATGCTGGTGACT	eed ₁₀ kke	47	34074	34089	1361
548119	1984	1999	TGGACTGCTTCTCATG	eed ₁₀ kke	25	34083	34098	1362
548121	1986	2001	TCTGGACTGCTTCTCA	eed ₁₀ kke	64	34085	34100	1363
548122	1987	2002	CTCTGGACTGCTTCTC	eed ₁₀ kke	55	34086	34101	1364
548123	1990	2005	AGACTCTGGACTGCTT	eed ₁₀ kke	49	34089	34104	1365
548124	1991	2006	TAGACTCTGGACTGCT	eed ₁₀ kke	51	34090	34105	1366
548125	1992	2007	CTAGACTCTGGACTGC	eed ₁₀ kke	89	34091	34106	1367
548126	1995	2010	TGCCTAGACTCTGGAC	eed ₁₀ kke	19	34094	34109	1368
548127	1996	2011	TTGCCTAGACTCTGGA	eed ₁₀ kke	60	34095	34110	1369
548128	1997	2012	ATTGCCTAGACTCTGG	eed ₁₀ kke	55	34096	34111	1370
548129	2022	2037	TTTGACTTGAACCTAG	eed ₁₀ kke	35	34121	34136	1371
548130	2023	2038	ATTTGACTTGAACCTA	eed ₁₀ kke	27	34122	34137	1372
548131	2024	2039	AATTTGACTTGAACCTC	eed ₁₀ kke	45	34123	34138	1373
548132	2025	2040	GAATTTGACTTGAACCT	eed ₁₀ kke	0	34124	34139	1374
548133	2026	2041	AGAATTTGACTTGAAC	eed ₁₀ kke	23	34125	34140	1375
548134	2027	2042	CAGAATTTGACTTGAA	eed ₁₀ kke	17	34126	34141	1376

【1 3 4 6】

10

20

30

40

50

【表 1 2 7 - 3】

548135	2028	2043	TCAGAATTTGACTTGA	eekd ₁₀ kke	46	34127	34142	1377
548136	2031	2046	GGCTCAGAATTTGACT	eekd ₁₀ kke	39	34130	34145	1378
548137	2032	2047	AGGCTCAGAATTTGAC	eekd ₁₀ kke	62	34131	34146	1379
548138	2036	2051	CCCCAGGCTCAGAATT	eekd ₁₀ kke	52	34135	34150	1380
548139	2047	2062	AGATGAGGACCCCCCA	eekd ₁₀ kke	56	34146	34161	1381
548140	2048	2063	CAGATGAGGACCCCCC	eekd ₁₀ kke	74	34147	34162	1382
548141	2049	2064	GCAGATGAGGACCCCC	eekd ₁₀ kke	66	34148	34163	1383
548142	2063	2078	ACTCTCCATGCTTTGC	eekd ₁₀ kke	44	34162	34177	1384
548143	2064	2079	CACTCTCCATGCTTTG	eekd ₁₀ kke	39	34163	34178	1385
548144	2068	2083	ATGCCACTCTCCATGC	eekd ₁₀ kke	52	34167	34182	1386
548145	2079	2094	ATGCAAAGAAGATGCC	eekd ₁₀ kke	63	34178	34193	1387
548146	2088	2103	GTCCTTAGGATGCAAA	eekd ₁₀ kke	68	34187	34202	1388
548147	2089	2104	CGTCCTTAGGATGCAA	eekd ₁₀ kke	81	34188	34203	1389
548148	2114	2129	GCAGCTCTGAGTGAC	eekd ₁₀ kke	66	34213	34228	1390
548149	2127	2142	GACATTGTCCTCAGCA	eekd ₁₀ kke	39	34226	34241	1391
548150	2129	2144	CAGACATTGTCCTCAG	eekd ₁₀ kke	60	34228	34243	1392

10

20

【 1 3 4 7 】

30

40

50

【表 1 2 8 - 1】

表 1 4 1

ISIS 番号	配列 番号 1 開 始部 位	配列 番号 1 終 止部 位	配列	化学構造	%阻害	配列 番号 10 開 始部 位	配列 番号 10 終 止部 位	配列 番号
547747	該当 なし	該当 なし	TCACTGTACTAGTTTC	eekd ₁₀ kke	84	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
547843	384	399	CACTTATTTGATGACC	eekd ₁₀ kke	83	9918	9933	1393
547844	385	400	GCACCTATTTGATGAC	eekd ₁₀ kke	13	該当 なし	該当 なし	1394
547845	394	409	CGATGGCAAGCACTTA	eekd ₁₀ kke	0	該当 なし	該当 なし	1395
547846	395	410	TCGATGGCAAGCACTT	eekd ₁₀ kke	0	該当 なし	該当 なし	1396
547847	396	411	CTCGATGGCAAGCACT	eekd ₁₀ kke	46	該当 なし	該当 なし	1397
547848	400	415	ATGTCTCGATGGCAAG	eekd ₁₀ kke	93	12656	12671	1398
547849	401	416	AATGTCTCGATGGCAA	eekd ₁₀ kke	79	12657	12672	1399
547850	402	417	AAATGTCTCGATGGCA	eekd ₁₀ kke	51	12658	12673	1400
547851	403	418	TAAATGTCTCGATGGC	eekd ₁₀ kke	93	12659	12674	1401
547852	404	419	ATAAATGTCTCGATGG	eekd ₁₀ kke	67	12660	12675	1402
547853	405	420	TATAAATGTCTCGATG	eekd ₁₀ kke	0	12661	12676	1403
547854	416	431	ATCAACTCCTTTATAA	eekd ₁₀ kke	10	12672	12687	1404
547855	417	432	TATCAACTCCTTTATA	eekd ₁₀ kke	59	12673	12688	1405

【 1 3 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 8 - 2】

547856	419	434	CATATCAACTCCTTTA	eekd ₁₀ kke	93	12675	12690	1406
547858	423	438	CTCTCATATCAACTCC	eekd ₁₀ kke	82	12679	12694	1407
547859	424	439	CCTCTCATATCAACTC	eekd ₁₀ kke	77	12680	12695	1408
547860	425	440	TCCTCTCATATCAACT	eekd ₁₀ kke	71	12681	12696	1409
547861	427	442	ACTCCTCTCATATCAA	eekd ₁₀ kke	0	12683	12698	1410
547862	428	443	GACTCCTCTCATATCA	eekd ₁₀ kke	22	12684	12699	1411
547863	429	444	TGACTCCTCTCATATC	eekd ₁₀ kke	73	12685	12700	1412
547864	430	445	TTGACTCCTCTCATAT	eekd ₁₀ kke	53	12686	12701	1413
547865	434	449	AAAATTGACTCCTCTC	eekd ₁₀ kke	3	12690	12705	1414
547866	436	451	TTAAAATTGACTCCTC	eekd ₁₀ kke	46	12692	12707	1415
547867	447	462	CCTTAGACACATTAAA	eekd ₁₀ kke	34	12703	12718	1416
547868	448	463	ACCTTAGACACATTAA	eekd ₁₀ kke	47	12704	12719	1417
547869	449	464	AACCTTAGACACATTA	eekd ₁₀ kke	45	12705	12720	1418
547870	451	466	CTAACCTTAGACACAT	eekd ₁₀ kke	89	12707	12722	1419
547871	452	467	GCTAACCTTAGACACA	eekd ₁₀ kke	96	12708	12723	1420
547872	453	468	TGCTAACCTTAGACAC	eekd ₁₀ kke	85	12709	12724	1421
547873	454	469	CTGCTAACCTTAGACA	eekd ₁₀ kke	77	12710	12725	1422
547874	455	470	ACTGCTAACCTTAGAC	eekd ₁₀ kke	70	12711	12726	1423
547875	456	471	CACTGCTAACCTTAGA	eekd ₁₀ kke	73	12712	12727	1424
547876	457	472	ACACTGCTAACCTTAG	eekd ₁₀ kke	78	12713	12728	1425
547877	458	473	AACACTGCTAACCTTA	eekd ₁₀ kke	81	12714	12729	1426
547879	460	475	TCAACACTGCTAACCT	eekd ₁₀ kke	69	12716	12731	1427
547880	461	476	TTCAACACTGCTAACC	eekd ₁₀ kke	69	12717	12732	1428
547881	465	480	ATTCTTCAACACTGCT	eekd ₁₀ kke	0	12721	12736	1429
547882	500	515	CTGGCAGCGAATGTTA	eekd ₁₀ kke	91	12756	12771	1430
547883	501	516	ACTGGCAGCGAATGTT	eekd ₁₀ kke	99	12757	12772	1431
547884	518	533	CGTGGCATATGAAAAA	eekd ₁₀ kke	87	12774	12789	1432
547885	539	554	CTCTGCCTTGTGAAAT	eekd ₁₀ kke	45	12795	12810	1433
547886	544	559	CGGTACTCTGCCTTGT	eekd ₁₀ kke	97	12800	12815	1434
547889	547	562	TTCCGGTACTCTGCCT	eekd ₁₀ kke	91	該当 なし	該当 なし	1435
547890	550	565	TTGTTCCGGTACTCTG	eekd ₁₀ kke	97	該当 なし	該当 なし	1436
547891	551	566	ATTGTTCCGGTACTCT	eekd ₁₀ kke	84	該当 なし	該当 なし	1437
547892	553	568	CAATTGTTCCGGTACT	eekd ₁₀ kke	29	該当 なし	該当 なし	1438
547893	554	569	GCAATTGTTCCGGTAC	eekd ₁₀ kke	81	該当 なし	該当 なし	1439

【1 3 4 9】

10

20

30

40

50

【表 1 2 8 - 3】

547894	555	570	GGCAATTGTTCCGGTA	eekd ₁₀ kke	92	該当 なし	該当 なし	1440
547898	563	578	CTTTAATAGGCAATTG	eekd ₁₀ kke	0	14134	14149	1441
547899	566	581	GTACTTTAATAGGCAA	eekd ₁₀ kke	49	14137	14152	1442
547900	567	582	TGTACTTTAATAGGCA	eekd ₁₀ kke	93	14138	14153	1443
547901	568	583	CTGTACTTTAATAGGC	eekd ₁₀ kke	77	14139	14154	1444
547902	569	584	ACTGTACTTTAATAGG	eekd ₁₀ kke	20	14140	14155	1445
547903	604	619	CTCAGCACCTTTATAG	eekd ₁₀ kke	62	14175	14190	1446
547904	605	620	ACTCAGCACCTTTATA	eekd ₁₀ kke	56	14176	14191	1447
547905	606	621	TACTCAGCACCTTTAT	eekd ₁₀ kke	20	14177	14192	1448
547906	607	622	TTACTCAGCACCTTTA	eekd ₁₀ kke	59	14178	14193	1449
547907	652	667	ATTCTGAAAGGGCAC	eekd ₁₀ kke	27	14223	14238	1450
547908	654	669	CAATTTCTGAAAGGGC	eekd ₁₀ kke	94	14225	14240	1451
547909	655	670	CCAATTTCTGAAAGGG	eekd ₁₀ kke	82	14226	14241	1452
547910	656	671	ACCAATTTCTGAAAGG	eekd ₁₀ kke	26	14227	14242	1453
547911	661	676	TGGCAACCAATTTCTG	eekd ₁₀ kke	0	該当 なし	該当 なし	1454
547912	701	716	ATCCACATCTGAGAAC	eekd ₁₀ kke	23	26149	26164	1455
547913	706	721	GCAACATCCACATCTG	eekd ₁₀ kke	71	26154	26169	1456
547914	707	722	GGCAACATCCACATCT	eekd ₁₀ kke	74	26155	26170	1457
547915	708	723	TGGCAACATCCACATC	eekd ₁₀ kke	0	26156	26171	1458
547916	710	725	CCTGGCAACATCCACA	eekd ₁₀ kke	70	26158	26173	1459
547917	712	727	ACCCTGGCAACATCCA	eekd ₁₀ kke	33	26160	26175	1460
547918	713	728	AACCCTGGCAACATCC	eekd ₁₀ kke	1	26161	26176	1461
547919	714	729	GAACCCTGGCAACATC	eekd ₁₀ kke	41	26162	26177	1462

【1 3 5 0】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 1】

表 1 4 2

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTAC TAGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	62	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTA GTTTC	eekd ₁₀ kke	88	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 5 1】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 2】

547751	7	22	TGAACGGTCTT CAAGC	eekd ₁₀ kke	0	3399	3414	1463
547753	8	23	ATGAACGGTCT TCAAG	eekd ₁₀ kke	3	3400	3415	1464
547755	13	28	TAAAAATGAAC GGTCT	eekd ₁₀ kke	0	3405	3420	1465
547757	28	43	GAGTCTCTTGT CACTT	eekd ₁₀ kke	69	3420	3435	1466
547759	29	44	TGAGTCTCTTG TCACT	eekd ₁₀ kke	73	3421	3436	1467
547763	31	46	GGTGAGTCTCT TGTC	eekd ₁₀ kke	66	3423	3438	1468
547765	32	47	AGGTGAGTCTC TTGTC	eekd ₁₀ kke	20	3424	3439	1469
547767	35	50	TGGAGGTGAGT CTCTT	eekd ₁₀ kke	74	3427	3442	1470
547769	36	51	TTGGAGGTGAG TCTCT	eekd ₁₀ kke	81	3428	3443	1471
547771	37	52	CTTGGAGGTGA GTCTC	eekd ₁₀ kke	60	3429	3444	1472
547773	38	53	TCTTGGAGGTG AGTCT	eekd ₁₀ kke	47	3430	3445	1473
547777	43	58	TTGCTTCTTGG AGGTG	eekd ₁₀ kke	69	3435	3450	1474
547779	44	59	ATTGCTTCTTG GAGGT	eekd ₁₀ kke	41	3436	3451	1475
547781	46	61	CAATTGCTTCT TGGAG	eekd ₁₀ kke	49	3438	3453	1476
547783	48	63	CACAATTGCTT CTTGG	eekd ₁₀ kke	48	3440	3455	1477
547784	72	87	GCTTGAATAAA ATCAT	eekd ₁₀ kke	46	4071	4086	1478
547785	79	94	GTTGCTTGCTT GAATA	eekd ₁₀ kke	48	4078	4093	1479
547786	80	95	AGTTGCTTGCT TGAAT	eekd ₁₀ kke	44	4079	4094	1480
547787	81	96	AAGTTGCTTGC TTGAA	eekd ₁₀ kke	22	4080	4095	1481
547788	82	97	TAAGTTGCTTG CTTGA	eekd ₁₀ kke	49	4081	4096	1482

【1 3 5 2】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 3】

547789	86	101	GAAATAAGTTG CTTGC	eekd ₁₀ kke	20	4085	4100	1483
547790	87	102	TGAAATAAGTT GCTTG	eekd ₁₀ kke	23	4086	4101	1484
547791	106	121	ACTGTAGCAAA CAAGG	eekd ₁₀ kke	49	4105	4120	1485
547792	116	131	TCCACAGGAAA CTGTA	eekd ₁₀ kke	31	該当なし	該当なし	1486
547793	117	132	ATCCACAGGAA ACTGT	eekd ₁₀ kke	16	該当なし	該当なし	1487
547794	136	151	TCATAGAGTTG AGTCA	eekd ₁₀ kke	49	8008	8023	1488
547795	155	170	ACCTCTGAAGA AGGCG	eekd ₁₀ kke	66	8027	8042	1489
547796	161	176	ATCCCCACCTC TGAAG	eekd ₁₀ kke	35	8033	8048	1490
547797	167	182	AGCTACATCCC CACCT	eekd ₁₀ kke	33	8039	8054	1491
547799	169	184	GAAGCTACATC CCCAC	eekd ₁₀ kke	41	8041	8056	1492
547800	174	189	ACATGGAAGCT ACATC	eekd ₁₀ kke	20	8046	8061	1493
547801	175	190	TACATGGAAGC TACAT	eekd ₁₀ kke	11	8047	8062	1494
547802	176	191	GTACATGGAAG CTACA	eekd ₁₀ kke	41	8048	8063	1495
547803	177	192	TGTACATGGAA GCTAC	eekd ₁₀ kke	0	8049	8064	1496
547804	178	193	GTGTACATGGA AGCTA	eekd ₁₀ kke	22	8050	8065	1497
547805	180	195	GGGTGTACATG GAAGC	eekd ₁₀ kke	54	8052	8067	1498
547807	197	212	GCAGTATTGGG CATTT	eekd ₁₀ kke	75	8069	8084	1499
547808	203	218	CATCTGGCAGT ATTGG	eekd ₁₀ kke	56	8075	8090	1500
547809	204	219	TCATCTGGCAG TATTG	eekd ₁₀ kke	33	8076	8091	1501
547810	206	221	CCTCATCTGGC AGTAT	eekd ₁₀ kke	60	8078	8093	1502

【1 3 5 3】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 4】

547811	207	222	ACCTCATCTGG CAGTA	eekd ₁₀ kke	49	8079	8094	1503
547812	211	226	GTGCACCTCAT CTGGC	eekd ₁₀ kke	51	8083	8098	1504
547813	219	234	GGTGAATGTG CACCT	eekd ₁₀ kke	34	8091	8106	1505
547814	220	235	GGGTGAATGT GCACC	eekd ₁₀ kke	60	8092	8107	1506
547815	255	270	AACTTGCTGGA AGAAA	eekd ₁₀ kke	3	8127	8142	1507
547816	256	271	GAACCTGCTGG AAGAA	eekd ₁₀ kke	45	8128	8143	1508
547817	257	272	TGAACCTGCTG GAAGA	eekd ₁₀ kke	18	8129	8144	1509
547818	260	275	GATTGAACTTG CTGGA	eekd ₁₀ kke	4	8132	8147	1510
547819	264	279	CATTGATTGAA CTTGC	eekd ₁₀ kke	11	8136	8151	1511
547820	265	280	TCATTGATTGA ACTTG	eekd ₁₀ kke	0	8137	8152	1512
547821	282	297	CAAACCTTTTC TCCAT	eekd ₁₀ kke	44	該当なし	該当なし	1513
547822	287	302	GCAACCAAACC TTTTTC	eekd ₁₀ kke	71	該当なし	該当なし	1514
547823	288	303	AGCAACCAAAC CTTTT	eekd ₁₀ kke	51	該当なし	該当なし	1515
547824	331	346	CGATGTACTTT TGGCA	eekd ₁₀ kke	82	9865	9880	1516
547825	332	347	TCGATGTACTT TTGGC	eekd ₁₀ kke	59	9866	9881	1517
547826	333	348	TTGATGTACT TTTGG	eekd ₁₀ kke	31	9867	9882	1518
547827	334	349	GTTCGATGTAC TTTTG	eekd ₁₀ kke	47	9868	9883	1519
547828	337	352	CCTGTTCGATG TACTT	eekd ₁₀ kke	63	9871	9886	1520
547829	338	353	ACCTGTTCGAT GTACT	eekd ₁₀ kke	59	9872	9887	1521
547830	340	355	GCACCTGTTTCG ATGTA	eekd ₁₀ kke	74	9874	9889	1522

【1 3 5 4】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 5】

547831	342	357	CTGCACCTGTT CGATG	eekd ₁₀ kke	49	9876	9891	1523
547832	343	358	ACTGCACCTGT TCGAT	eekd ₁₀ kke	59	9877	9892	1524
547833	344	359	AACTGCACCTG TTCGA	eekd ₁₀ kke	40	9878	9893	1525
547834	345	360	AAACTGCACCT GTTCG	eekd ₁₀ kke	63	9879	9894	1526
547835	349	364	CCAGAACTGC ACCTG	eekd ₁₀ kke	81	9883	9898	1527
547836	350	365	TCCAGAACTG CACCT	eekd ₁₀ kke	50	9884	9899	1528
547837	352	367	TGTCCAGAAAC TGCAC	eekd ₁₀ kke	51	9886	9901	1529
547838	362	377	CTTCAAGGAAT GTCCA	eekd ₁₀ kke	45	9896	9911	1530
547839	363	378	GCTTCAAGGAA TGTC	eekd ₁₀ kke	35	9897	9912	1531
547840	365	380	TTGCTTCAAGG AATGT	eekd ₁₀ kke	36	9899	9914	1532
547841	369	384	CACATTGCTTC AAGGA	eekd ₁₀ kke	42	9903	9918	1533
547842	375	390	GATGACCACAT TGCTT	eekd ₁₀ kke	10	9909	9924	1534

【 1 3 5 5 】

【表 1 3 0 - 1】

表 1 4 3

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTA CTAGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	75	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACT AGTTTC	eekd ₁₀ kke	91	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【 1 3 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 0 - 2】

547843	384	399	CACTTATTTG ATGACC	eekd ₁₀ kke	83	9918	9933	1393
547844	385	400	GCACTTATTT GATGAC	eekd ₁₀ kke	76	該当なし	該当なし	1394
547845	394	409	CGATGGCAAG CACTTA	eekd ₁₀ kke	64	該当なし	該当なし	1395
547846	395	410	TCGATGGCAA GCACTT	eekd ₁₀ kke	42	該当なし	該当なし	1396
547847	396	411	CTCGATGGCA AGCACT	eekd ₁₀ kke	72	該当なし	該当なし	1397
547848	400	415	ATGTCTCGAT GGCAAG	eekd ₁₀ kke	79	12656	12671	1398
547849	401	416	AATGTCTCGA TGGCAA	eekd ₁₀ kke	90	12657	12672	1399
547850	402	417	AAATGTCTCG ATGGCA	eekd ₁₀ kke	80	12658	12673	1400
547851	403	418	TAAATGTCTC GATGGC	eekd ₁₀ kke	84	12659	12674	1401
547852	404	419	ATAAATGTCT CGATGG	eekd ₁₀ kke	66	12660	12675	1402
547853	405	420	TATAAATGTC TCGATG	eekd ₁₀ kke	30	12661	12676	1403
547854	416	431	ATCAACTCCT TTATAA	eekd ₁₀ kke	9	12672	12687	1404
547855	417	432	TATCAACTCC TTTATA	eekd ₁₀ kke	38	12673	12688	1405
547856	419	434	CATATCAACT CCTTTA	eekd ₁₀ kke	51	12675	12690	1406
547857	421	436	CTCATATCAA CTCCTT	eekd ₁₀ kke	84	12677	12692	1535
547858	423	438	CTCTCATATC AACTCC	eekd ₁₀ kke	76	12679	12694	1407
547859	424	439	CCTCTCATAT CAACTC	eekd ₁₀ kke	88	12680	12695	1408
547860	425	440	TCCTCTCATA TCAACT	eekd ₁₀ kke	70	12681	12696	1409
547861	427	442	ACTCCTCTCA TATCAA	eekd ₁₀ kke	57	12683	12698	1410
547862	428	443	GACTCCTCTC ATATCA	eekd ₁₀ kke	88	12684	12699	1411

【1 3 5 7】

10

20

30

40

50

【表 1 3 0 - 3】

547863	429	444	TGACTCCTCT CATATC	eekd ₁₀ kke	77	12685	12700	1412
547864	430	445	TTGACTCCTC TCATAT	eekd ₁₀ kke	73	12686	12701	1413
547865	434	449	AAAATTGACT CCTCTC	eekd ₁₀ kke	61	12690	12705	1414
547866	436	451	TTAAAATTGA CTCCTC	eekd ₁₀ kke	40	12692	12707	1415
547867	447	462	CCTTAGACAC ATTAAA	eekd ₁₀ kke	53	12703	12718	1416
547868	448	463	ACCTTAGACA CATTAA	eekd ₁₀ kke	71	12704	12719	1417
547869	449	464	AACCTTAGAC ACATTA	eekd ₁₀ kke	77	12705	12720	1418
547870	451	466	CTAACCTTAG ACACAT	eekd ₁₀ kke	83	12707	12722	1419
547871	452	467	GCTAACCTTA GACACA	eekd ₁₀ kke	77	12708	12723	1420
547872	453	468	TGCTAACCTT AGACAC	eekd ₁₀ kke	73	12709	12724	1421
547873	454	469	CTGCTAACCT TAGACA	eekd ₁₀ kke	82	12710	12725	1422
547874	455	470	ACTGCTAACC TTAGAC	eekd ₁₀ kke	60	12711	12726	1423
547875	456	471	CACTGCTAAC CTTAGA	eekd ₁₀ kke	57	12712	12727	1424
547876	457	472	ACACTGCTAA CCTTAG	eekd ₁₀ kke	59	12713	12728	1425
547877	458	473	AACACTGCTA ACCTTA	eekd ₁₀ kke	93	12714	12729	1426
547878	459	474	CAACACTGCT AACCTT	eekd ₁₀ kke	62	12715	12730	1536
547879	460	475	TCAACACTGC TAACCT	eekd ₁₀ kke	65	12716	12731	1427
547880	461	476	TTCAACACTG CTAACC	eekd ₁₀ kke	59	12717	12732	1428
547881	465	480	ATTCTTCAAC ACTGCT	eekd ₁₀ kke	50	12721	12736	1429
547882	500	515	CTGGCAGCGA ATGTTA	eekd ₁₀ kke	96	12756	12771	1430

【1 3 5 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 0 - 4】

547883	501	516	ACTGGCAGCG AATGTT	eekd ₁₀ kke	0	12757	12772	1431
547884	518	533	CGTGGCATAT GAAAAA	eekd ₁₀ kke	49	12774	12789	1432
547885	539	554	CTCTGCCTTG TGAAAT	eekd ₁₀ kke	57	12795	12810	1433
547886	544	559	CGGTACTCTG CCTTGT	eekd ₁₀ kke	89	12800	12815	1434
547887	545	560	CCGGTACTCT GCCTTG	eekd ₁₀ kke	99	12801	12816	1537
547888	546	561	TCCGGTACTC TGCCCT	eekd ₁₀ kke	99	該当なし	該当なし	1538
547889	547	562	TTCCGGTACT CTGCCCT	eekd ₁₀ kke	97	該当なし	該当なし	1435
547890	550	565	TTGTTCCGGT ACTCTG	eekd ₁₀ kke	90	該当なし	該当なし	1436
547891	551	566	ATTGTTCCGG TACTCT	eekd ₁₀ kke	88	該当なし	該当なし	1437
547892	553	568	CAATTGTTCC GGTACT	eekd ₁₀ kke	28	該当なし	該当なし	1438
547893	554	569	GCAATTGTTT CCGTAC	eekd ₁₀ kke	80	該当なし	該当なし	1439
547894	555	570	GGCAATTGTT CCGGTA	eekd ₁₀ kke	91	該当なし	該当なし	1440
547895	556	571	AGGCAATTGT TCCGGT	eekd ₁₀ kke	94	該当なし	該当なし	1539
547896	557	572	TAGGCAATTG TTCCGG	eekd ₁₀ kke	95	該当なし	該当なし	1540
547897	558	573	ATAGGCAATT GTTCCG	eekd ₁₀ kke	82	該当なし	該当なし	1541
547898	563	578	CTTTAATAGG CAATTG	eekd ₁₀ kke	28	14134	14149	1441
547899	566	581	GTAATTTAAT AGGCAA	eekd ₁₀ kke	68	14137	14152	1442
547900	567	582	TGTACTTTAA TAGGCA	eekd ₁₀ kke	68	14138	14153	1443
547901	568	583	CTGTACTTTA ATAGGC	eekd ₁₀ kke	85	14139	14154	1444
547902	569	584	ACTGTACTTT AATAGG	eekd ₁₀ kke	33	14140	14155	1445

【1 3 5 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 0 - 5】

547903	604	619	CTCAGCACCT TTATAG	eekd ₁₀ kke	6	14175	14190	1446
547904	605	620	ACTCAGCACCC TTTATA	eekd ₁₀ kke	41	14176	14191	1447
547905	606	621	TACTCAGCAC CTTTAT	eekd ₁₀ kke	59	14177	14192	1448
547906	607	622	TTACTCAGCA CCTTTA	eekd ₁₀ kke	70	14178	14193	1449
547907	652	667	ATTCTGAAA GGGCAC	eekd ₁₀ kke	27	14223	14238	1450
547908	654	669	CAATTTCTGA AAGGGC	eekd ₁₀ kke	71	14225	14240	1451
547909	655	670	CCAATTTCTG AAAGGG	eekd ₁₀ kke	51	14226	14241	1452
547910	656	671	ACCAATTTCT GAAAGG	eekd ₁₀ kke	34	14227	14242	1453
547911	661	676	TGGCAACCAA TTTCTG	eekd ₁₀ kke	15	該当なし	該当なし	1454
547912	701	716	ATCCACATCT GAGAAC	eekd ₁₀ kke	53	26149	26164	1455
547913	706	721	GCAACATCCA CATCTG	eekd ₁₀ kke	61	26154	26169	1456
547914	707	722	GGCAACATCC ACATCT	eekd ₁₀ kke	63	26155	26170	1457
547915	708	723	TGGCAACATC CACATC	eekd ₁₀ kke	62	26156	26171	1458
547916	710	725	CCTGGCAACA TCCACA	eekd ₁₀ kke	56	26158	26173	1459
547917	712	727	ACCCTGGCAA CATCCA	eekd ₁₀ kke	54	26160	26175	1460
547918	713	728	AACCCTGGCA ACATCC	eekd ₁₀ kke	65	26161	26176	1461
547919	714	729	GAACCCTGGC AACATC	eekd ₁₀ kke	73	26162	26177	1462

【 1 3 6 0 】

【表 1 3 1 - 1】

表 1 4 4

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番号 1 終止部 位	配列	化学構造	% 阻 害	配列番号 10 開始部 位	配列番号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACT AGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	16	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAG TTTC	eekd ₁₀ kke	83	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 6 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3 1 - 2】

547920	716	731	GAGAACCTGGC AACA	eekd ₁₀ kke	52	26164	26179	154 2
547921	717	732	TGAGAACCTGG CAAC	eekd ₁₀ kke	43	26165	26180	154 3
547922	722	737	TGGAGTGAGAAC CCTG	eekd ₁₀ kke	79	26170	26185	154 4
547923	725	740	ATCTGGAGTGAG AACC	eekd ₁₀ kke	68	26173	26188	154 5
547924	742	757	GTCCGACACACA AAAG	eekd ₁₀ kke	53	26190	26205	154 6
547925	743	758	GGTCCGACACAC AAAA	eekd ₁₀ kke	16	26191	26206	154 7
547927	745	760	ATGGTCCGACAC ACAA	eekd ₁₀ kke	79	26193	26208	154 8
547928	746	761	GATGGTCCGACA CACA	eekd ₁₀ kke	70	26194	26209	154 9
547929	747	762	AGATGGTCCGAC ACAC	eekd ₁₀ kke	65	26195	26210	155 0
547930	757	772	TGATAGGTGCAG ATGG	eekd ₁₀ kke	48	26205	26220	155 1
547931	758	773	GTGATAGGTGCA GATG	eekd ₁₀ kke	58	26206	26221	155 2
547932	804	819	CGATTTTCCATA CATT	eekd ₁₀ kke	33	26252	26267	155 3
547933	805	820	TCGATTTTCCAT ACAT	eekd ₁₀ kke	44	26253	26268	155 4
547934	806	821	CTCGATTTTCCA TACA	eekd ₁₀ kke	38	26254	26269	155 5
547935	807	822	ACTCGATTTTCC ATAC	eekd ₁₀ kke	27	26255	26270	155 6
547936	808	823	GACTCGATTTTC CATA	eekd ₁₀ kke	44	26256	26271	155 7
547937	811	826	TGTGACTCGATT TTCC	eekd ₁₀ kke	56	26259	26274	155 8
547938	812	827	TTGTGACTCGAT TTTC	eekd ₁₀ kke	56	26260	26275	155 9
547939	813	828	TTTGTGACTCGA TTTT	eekd ₁₀ kke	70	26261	26276	156 0
547940	817	832	TTTCTTTGTGAC TCGA	eekd ₁₀ kke	71	該当なし	該当なし	156 1

【1 3 6 2】

10

20

30

40

50

【表 1 3 1 - 3】

547941	852	867	GTGTGCCACTTT CAGA	eekd ₁₀ kke	66	27116	27131	156 2
547942	853	868	GGTGTGCCACTT TCAG	eekd ₁₀ kke	85	27117	27132	156 3
547943	854	869	TGGTGTGCCACT TTCA	eekd ₁₀ kke	83	27118	27133	156 4
547944	857	872	ACTTGGTGTGCC ACTT	eekd ₁₀ kke	54	27121	27136	156 5
547945	858	873	AACCTGGTGTGC CACT	eekd ₁₀ kke	62	27122	27137	156 6
547946	859	874	GAACCTGGTGTG CCAC	eekd ₁₀ kke	81	27123	27138	156 7
547947	860	875	GGAACCTGGTGT GCCA	eekd ₁₀ kke	80	27124	27139	156 8
547948	861	876	AGGAACTGGTGT TGCC	eekd ₁₀ kke	77	27125	27140	156 9
547949	880	895	GTGTTTCTTGA GGAG	eekd ₁₀ kke	6	27144	27159	157 0
547950	881	896	GGTGTCTTCTTG AGGA	eekd ₁₀ kke	49	27145	27160	157 1
547951	887	902	AGATATGGTGT TTCT	eekd ₁₀ kke	25	27151	27166	157 2
547952	888	903	CAGATATGGTGT TTTC	eekd ₁₀ kke	46	27152	27167	157 3
547953	895	910	CTATATCCAGAT ATGG	eekd ₁₀ kke	16	27159	27174	157 4
547954	902	917	TAAAAGGCTATA TCCA	eekd ₁₀ kke	36	27166	27181	157 5
547956	904	919	GTAAAAAGGCTA TATC	eekd ₁₀ kke	13	27168	27183	157 6
547957	905	920	GGTAAAAAGGCT ATAT	eekd ₁₀ kke	6	27169	27184	157 7
547958	907	922	CAGGTAAAAAGG CTAT	eekd ₁₀ kke	57	27171	27186	157 8
547959	908	923	GCAGGTAAAAAG GCTA	eekd ₁₀ kke	60	27172	27187	157 9
547960	909	924	TGCAGGTAAAAA GGCT	eekd ₁₀ kke	40	27173	27188	158 0
547961	910	925	TTGCAGGTAAAA AGGC	eekd ₁₀ kke	5	27174	27189	158 1

【1 3 6 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3 1 - 4】

547962	911	926	TTTGCAGGTAA AAGG	eekd ₁₀ kke	16	27175	27190	158 2
547963	927	942	GTTCAGGTAAAG TTCT	eekd ₁₀ kke	22	該当なし	該当なし	158 3
547964	928	943	GGTTCAGGTAAA GTTT	eekd ₁₀ kke	0	該当なし	該当なし	158 4
547965	929	944	GGGTTCAGGTAA AGTT	eekd ₁₀ kke	29	該当なし	該当なし	158 5
547966	930	945	AGGGTTCAGGTA AAGT	eekd ₁₀ kke	13	該当なし	該当なし	158 6
547967	933	948	GGCAGGGTTCAG GTAA	eekd ₁₀ kke	25	該当なし	該当なし	158 7
547968	940	955	TTAGAATGGCAG GGTT	eekd ₁₀ kke	37	27362	27377	158 8
547969	953	968	TCCCGGGTAAAT TTTA	eekd ₁₀ kke	0	27375	27390	158 9
547970	954	969	CTCCCGGGTAAA TTTT	eekd ₁₀ kke	42	27376	27391	159 0
547972	958	973	TCAACTCCCGGG TAAA	eekd ₁₀ kke	49	27380	27395	159 1
547973	961	976	AAGTCAACTCCC GGGT	eekd ₁₀ kke	62	27383	27398	159 2
547974	962	977	AAAGTCAACTCC CGGG	eekd ₁₀ kke	52	27384	27399	159 3
547975	963	978	CAAAGTCAACTC CCGG	eekd ₁₀ kke	44	27385	27400	159 4
547976	964	979	CCAAAGTCAACT CCCG	eekd ₁₀ kke	49	27386	27401	159 5
547977	967	982	CCTCCAAAGTCA ACTC	eekd ₁₀ kke	57	27389	27404	159 6
547978	1014	1029	CTTGGCAAACAT TCAC	eekd ₁₀ kke	71	27436	27451	159 7
547979	1018	1033	GTCTCTTGCGAA ACAT	eekd ₁₀ kke	77	27440	27455	159 8
547980	1020	1035	AAGTCTCTTGGC AAAC	eekd ₁₀ kke	54	27442	27457	159 9
547981	1029	1044	TCTTTGTGCAAG TCTC	eekd ₁₀ kke	76	27451	27466	160 0
547982	1034	1049	AATCATCTTTGT GCAA	eekd ₁₀ kke	54	27456	27471	160 1

10

20

30

40

【1 3 6 4】

50

【表 1 3 1 - 5】

547983	1035	1050	GAATCATCTTTG TGCA	eekd ₁₀ kke	56	27457	27472	160 2
547984	1036	1051	CGAATCATCTTT GTGC	eekd ₁₀ kke	55	27458	27473	160 3
547985	1037	1052	GCGAATCATCTT TGTG	eekd ₁₀ kke	63	27459	27474	160 4
547986	1039	1054	CAGCGAATCATC TTTG	eekd ₁₀ kke	63	27461	27476	160 5
547987	1040	1055	ACAGCGAATCAT CTTT	eekd ₁₀ kke	64	27462	27477	160 6
547988	1042	1057	TGACAGCGAATC ATCT	eekd ₁₀ kke	56	27464	27479	160 7
547989	1043	1058	CTGACAGCGAAT CATC	eekd ₁₀ kke	66	27465	27480	160 8
547990	1044	1059	ACTGACAGCGAA TCAT	eekd ₁₀ kke	58	27466	27481	160 9
547991	1077	1092	TACAGTCTTCTG GGAG	eekd ₁₀ kke	0	27499	27514	161 0
547992	1080	1095	CCTTACAGTCTT CTGG	eekd ₁₀ kke	17	27502	27517	161 1
547993	1113	1128	TAGATAATCTTA AGAA	eekd ₁₀ kke	26	27634	27649	161 2
547994	1120	1135	CCATCCATAGAT AATC	eekd ₁₀ kke	53	27641	27656	161 3
547995	1149	1164	GTGTCCCATACG CAAT	eekd ₁₀ kke	64	27670	27685	161 4
547996	1150	1165	TGTGTCCCATAC GCAA	eekd ₁₀ kke	65	27671	27686	161 5

【1 3 6 5】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 1】

表 1 4 5

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTA GTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	0	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGT TTC	eekd ₁₀ kke	80	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 6 6】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 2】

547997	1151	1166	TTGTGTCCCATAC GCA	eekd ₁₀ kke	89	27672	27687	161 6
547998	1152	1167	CTTGTGTCCCAT CGC	eekd ₁₀ kke	82	27673	27688	161 7
547999	1153	1168	CCTTGTGTCCCAT ACG	eekd ₁₀ kke	50	27674	27689	161 8
548000	1154	1169	CCCTTGTGTCCCA TAC	eekd ₁₀ kke	54	27675	27690	161 9
548001	1163	1178	ACCAGAGCTCCCT TGT	eekd ₁₀ kke	64	27684	27699	162 0
548002	1164	1179	AACCAGAGCTCCC TTG	eekd ₁₀ kke	56	27685	27700	162 1
548003	1165	1180	TAACCAGAGCTCC CTT	eekd ₁₀ kke	66	27686	27701	162 2
548004	1167	1182	AGTAACCAGAGCT CCC	eekd ₁₀ kke	80	27688	27703	162 3
548005	1169	1184	AGAGTAACCAGAG CTC	eekd ₁₀ kke	77	27690	27705	162 4
548006	1172	1187	CAAAGAGTAACCA GAG	eekd ₁₀ kke	54	27693	27708	162 5
548007	1174	1189	CTCAAAGAGTAAC CAG	eekd ₁₀ kke	70	27695	27710	162 6
548008	1175	1190	TCTCAAAGAGTAA CCA	eekd ₁₀ kke	71	27696	27711	162 7
548009	1184	1199	GTTACACAATCTC AAA	eekd ₁₀ kke	47	27705	27720	162 8
548010	1187	1202	AGTGTACACAAT CTC	eekd ₁₀ kke	80	27708	27723	162 9
548011	1189	1204	CCAGTGTACACA ATC	eekd ₁₀ kke	14	27710	27725	163 0
548012	1192	1207	TCCCCAGTGTTAC ACA	eekd ₁₀ kke	3	27713	27728	163 1
548013	1193	1208	GTCCCCAGTGTTA CAC	eekd ₁₀ kke	37	27714	27729	163 2
548014	1194	1209	TGTCCCCAGTGTT ACA	eekd ₁₀ kke	31	27715	27730	163 3
548015	1195	1210	TTGTCCCCAGTGT TAC	eekd ₁₀ kke	50	27716	27731	163 4
548016	1248	1263	AAGAGTTTGTTC TCC	eekd ₁₀ kke	55	27924	27939	163 5

【1 3 6 7】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 3】

548017	1252	1267	CAAGAAGAGTTTG TTC	eekd ₁₀ kke	3	27928	27943	163 6
548018	1253	1268	CCAAGAAGAGTTT GTT	eekd ₁₀ kke	22	27929	27944	163 7
548019	1255	1270	CCCCAAGAAGAGT TTG	eekd ₁₀ kke	24	27931	27946	163 8
548020	1256	1271	TCCCCAAGAAGAG TTT	eekd ₁₀ kke	76	27932	27947	163 9
548021	1261	1276	CACTCTCCCCAAG AAG	eekd ₁₀ kke	0	27937	27952	164 0
548022	1262	1277	CCACTCTCCCCAA GAA	eekd ₁₀ kke	69	27938	27953	164 1
548023	1290	1305	GCTTCACCTGCAG GCT	eekd ₁₀ kke	58	27966	27981	164 2
548024	1297	1312	GCTGTCAGCTTCA CCT	eekd ₁₀ kke	79	27973	27988	164 3
548025	1300	1315	TGAGCTGTCAGCT TCA	eekd ₁₀ kke	66	27976	27991	164 4
548026	1332	1347	GTCCTATGAGTGA CCC	eekd ₁₀ kke	52	28008	28023	164 5
548027	1334	1349	GTGTCCTATGAGT GAC	eekd ₁₀ kke	18	28010	28025	164 6
548028	1335	1350	GGTGTCTATGAG TGA	eekd ₁₀ kke	38	28011	28026	164 7
548029	1336	1351	TGGTGTCTATGA GTG	eekd ₁₀ kke	12	28012	28027	164 8
548030	1337	1352	CTGGTGTCTATG AGT	eekd ₁₀ kke	52	28013	28028	164 9
548031	1397	1412	GATGCGCCAAACA TCC	eekd ₁₀ kke	73	30475	30490	165 0
548032	1398	1413	AGATGCGCCAAAC ATC	eekd ₁₀ kke	51	30476	30491	165 1
548034	1400	1415	ATAGATGCGCCAA ACA	eekd ₁₀ kke	31	30478	30493	165 2
548035	1404	1419	CACTATAGATGCG CCA	eekd ₁₀ kke	44	30482	30497	165 3
548036	1405	1420	CCACTATAGATGC GCC	eekd ₁₀ kke	74	30483	30498	165 4
548037	1427	1442	AATGTCTGACAGA TTT	eekd ₁₀ kke	70	30505	30520	165 5

【1 3 6 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 4】

548038	1428	1443	TAATGTCTGACAG ATT	eekd ₁₀ kke	67	30506	30521	165 6
548039	1445	1460	GAAAGGTGTATCT TTT	eekd ₁₀ kke	29	30523	30538	165 7
548040	1449	1464	GTGAGAAAGGTGT ATC	eekd ₁₀ kke	62	30527	30542	165 8
548041	1450	1465	TGTGAGAAAGGTG TAT	eekd ₁₀ kke	64	30528	30543	165 9
548042	1452	1467	TTTGTGAGAAAGG TGT	eekd ₁₀ kke	63	30530	30545	166 0
548043	1453	1468	ATTTGTGAGAAAG GTG	eekd ₁₀ kke	76	30531	30546	166 1
548044	1474	1489	TGGTGAATAATAA TCT	eekd ₁₀ kke	12	30552	30567	166 2
548045	1483	1498	TTATAGTTTTGGT GAA	eekd ₁₀ kke	0	30561	30576	166 3
548046	1506	1521	TATCATGATTCCC TTC	eekd ₁₀ kke	84	30584	30599	166 4
548047	1508	1523	GATATCATGATTC CCT	eekd ₁₀ kke	83	30586	30601	166 5
548048	1509	1524	CGATATCATGATT CCC	eekd ₁₀ kke	84	30587	30602	166 6
548049	1510	1525	GCGATATCATGAT TCC	eekd ₁₀ kke	62	30588	30603	166 7
548050	1512	1527	AGGCGATATCATG ATT	eekd ₁₀ kke	37	30590	30605	166 8
548051	1513	1528	AAGGCGATATCAT GAT	eekd ₁₀ kke	61	30591	30606	166 9
548052	1535	1550	CAAAGGAGCCTGG AGT	eekd ₁₀ kke	43	30613	30628	167 0
548053	1538	1553	ATTCAAAGGAGCC TGG	eekd ₁₀ kke	36	30616	30631	167 1
548054	1539	1554	AATTCAAAGGAGC CTG	eekd ₁₀ kke	45	30617	30632	167 2
548055	1541	1556	GTAATTCAAAGGA GCC	eekd ₁₀ kke	78	30619	30634	167 3
548056	1543	1558	GTGTAATTCAAAG GAG	eekd ₁₀ kke	40	30621	30636	167 4
548057	1564	1579	CATATTGGTTTTT GGA	eekd ₁₀ kke	49	31870	31885	167 5

【1 3 6 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 5】

548058	1565	1580	GCATATTGGTTT TGG	eekd ₁₀ kke	71	31871	31886	167 6
548059	1568	1583	TAGGCATATTGGT TTT	eekd ₁₀ kke	50	31874	31889	167 7
548060	1588	1603	CTTGTGTCACCTT TGG	eekd ₁₀ kke	76	31894	31909	167 8
548061	1589	1604	GCTTGTGTCACCT TTG	eekd ₁₀ kke	86	31895	31910	167 9
548062	1598	1613	ATAAATTGTGCTT GTG	eekd ₁₀ kke	19	31904	31919	168 0
548063	1600	1615	GTATAAATTGTGC TTG	eekd ₁₀ kke	35	31906	31921	168 1
548064	1602	1617	TGGTATAAATTGT GCT	eekd ₁₀ kke	54	31908	31923	168 2
548065	1603	1618	TTGGTATAAATTG TGC	eekd ₁₀ kke	22	31909	31924	168 3
548067	1606	1621	CAGTTGGTATAAA TTG	eekd ₁₀ kke	18	31912	31927	168 4
548068	1609	1624	CAACAGTTGGTAT AAA	eekd ₁₀ kke	0	31915	31930	168 5
548069	1610	1625	CCAACAGTTGGTA TAA	eekd ₁₀ kke	57	31916	31931	168 6
548070	1611	1626	CCCAACAGTTGGT ATA	eekd ₁₀ kke	85	31917	31932	168 7
548071	1629	1644	AGAAGCCCCATCC GGT	eekd ₁₀ kke	55	31935	31950	168 8
548072	1640	1655	TTTCTCCTTCGAG AAG	eekd ₁₀ kke	33	31946	31961	168 9
548073	1641	1656	CTTCTCCTTCGA GAA	eekd ₁₀ kke	24	31947	31962	169 0

【1 3 7 0】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 1】

表 1 4 6

ISIS 番号	配列番号 1 開始部 位	配列番 号 1 終止部 位	配列	化学構造	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配 列 番 号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACT AGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	19	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAG TTTC	eekd ₁₀ kke	66	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 7 1】

10

20

30

40

【表 1 3 3 - 2】

548151	2139	2154	GGGCTTCAGCCA GACA	eekd ₁₀ kke	35	34238	34253	169 1
548152	2140	2155	CGGGCTTCAGCC AGAC	eekd ₁₀ kke	32	34239	34254	169 2
548153	2149	2164	TGCTGAAAGCGG GCTT	eekd ₁₀ kke	44	34248	34263	169 3
548154	2150	2165	GTGCTGAAAGCG GGCT	eekd ₁₀ kke	7	34249	34264	169 4
548155	2151	2166	CGTGCTGAAAGC GGGC	eekd ₁₀ kke	76	34250	34265	169 5
548156	2168	2183	TCAGCCCCTGGT TACG	eekd ₁₀ kke	0	34267	34282	169 6
548157	2172	2187	ATTGTCAGCCCC TGGT	eekd ₁₀ kke	7	34271	34286	169 7
548158	2174	2189	GCATTGTCAGCC CCTG	eekd ₁₀ kke	18	34273	34288	169 8
548159	2175	2190	CGCATTGTCAGC CCCT	eekd ₁₀ kke	59	34274	34289	169 9
548160	2176	2191	TCGCATTGTCAG CCCC	eekd ₁₀ kke	60	34275	34290	170 0
548161	2177	2192	CTCGCATTGTCA GCCC	eekd ₁₀ kke	59	34276	34291	170 1
548162	2178	2193	CCTCGCATTGTC AGCC	eekd ₁₀ kke	25	34277	34292	170 2
548163	2179	2194	ACCTCGCATTGT CAGC	eekd ₁₀ kke	46	34278	34293	170 3
548164	2180	2195	GACCTCGCATTG TCAG	eekd ₁₀ kke	40	34279	34294	170 4
548165	2181	2196	CGACCTCGCATT GTCA	eekd ₁₀ kke	53	34280	34295	170 5
548166	2182	2197	GCGACCTCGCAT TGTC	eekd ₁₀ kke	0	34281	34296	170 6
548167	2183	2198	TGCGACCTCGCA TTGT	eekd ₁₀ kke	36	34282	34297	170 7
548168	2184	2199	TTGCGACCTCGC ATTG	eekd ₁₀ kke	61	34283	34298	170 8
548169	2185	2200	GTTGCGACCTCG CATT	eekd ₁₀ kke	7	34284	34299	170 9
548170	2186	2201	AGTTGCGACCTC GCAT	eekd ₁₀ kke	68	34285	34300	171 0

【1 3 7 2】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 3】

548171	2187	2202	CAGTTGCGACCT CGCA	eekd ₁₀ kke	47	34286	34301	171 1
548172	2188	2203	TCAGTTGCGACC TCGC	eekd ₁₀ kke	0	34287	34302	171 2
548173	2189	2204	CTCAGTTGCGAC CTCG	eekd ₁₀ kke	51	34288	34303	171 3
548174	2190	2205	TCTCAGTTGCGA CCTC	eekd ₁₀ kke	68	34289	34304	171 4
548175	2191	2206	ATCTCAGTTGCG ACCT	eekd ₁₀ kke	0	34290	34305	171 5
548176	2192	2207	GATCTCAGTTGC GACC	eekd ₁₀ kke	38	34291	34306	171 6
548177	2193	2208	AGATCTCAGTTG CGAC	eekd ₁₀ kke	45	34292	34307	171 7
548178	2194	2209	GAGATCTCAGTT GCGA	eekd ₁₀ kke	54	34293	34308	171 8
548179	2195	2210	GGAGATCTCAGT TGCG	eekd ₁₀ kke	52	34294	34309	171 9
548180	2199	2214	TCATGGAGATCT CAGT	eekd ₁₀ kke	79	34298	34313	172 0
548181	2200	2215	GTCATGGAGATC TCAG	eekd ₁₀ kke	55	34299	34314	172 1
548182	2201	2216	AGTCATGGAGAT CTCA	eekd ₁₀ kke	55	34300	34315	172 2
548183	2202	2217	CAGTCATGGAGA TCTC	eekd ₁₀ kke	43	34301	34316	172 3
548184	2203	2218	ACAGTCATGGAG ATCT	eekd ₁₀ kke	73	34302	34317	172 4
548185	2208	2223	AACACACAGTCA TGGA	eekd ₁₀ kke	23	34307	34322	172 5
548186	2209	2224	CAACACACAGTC ATGG	eekd ₁₀ kke	0	34308	34323	172 6
548187	該当なし	該当なし	CATCCTATCCGT GTTC	eekd ₁₀ kke	33	3279	3294	172 7
548189	該当なし	該当なし	CATGAACATCCT ATCC	eekd ₁₀ kke	24	3285	3300	172 8
548190	該当なし	該当なし	TATTCCATGAAC ATCC	eekd ₁₀ kke	43	3290	3305	172 9
548191	該当なし	該当なし	GTCAACATATTC CATG	eekd ₁₀ kke	0	3297	3312	173 0

【1 3 7 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 4】

548192	該当なし	該当なし	CCTGTCAACATA TTCC	eekd ₁₀ kke	65	3300	3315	173 1
548193	該当なし	該当なし	TGTCCTGTCAAC ATAT	eekd ₁₀ kke	58	3303	3318	173 2
548194	該当なし	該当なし	GCCAACAGTTTC AACT	eekd ₁₀ kke	61	3322	3337	173 3
548195	該当なし	該当なし	TTCTGCCAACAG TTTC	eekd ₁₀ kke	84	3326	3341	173 4
548196	該当なし	該当なし	CAATATTGACTT TGGG	eekd ₁₀ kke	6	3343	3358	173 5
548197	該当なし	該当なし	TGCTTGGCTTCA ATAT	eekd ₁₀ kke	68	3353	3368	173 6
548198	該当なし	該当なし	ACTGCAGGCAAT ATTT	eekd ₁₀ kke	49	3369	3384	173 7
548199	該当なし	該当なし	GCACTGCAGGCA ATAT	eekd ₁₀ kke	24	3371	3386	173 8
548200	該当なし	該当なし	CTAATGTGGCAC TGCA	eekd ₁₀ kke	19	3379	3394	173 9
548201	該当なし	該当なし	TGTTCTAATGTG GCAC	eekd ₁₀ kke	67	3383	3398	174 0
548202	該当なし	該当なし	GCTGTTCTAATG TGGC	eekd ₁₀ kke	9	3385	3400	174 1
548203	該当なし	該当なし	TGACTAGTGAAT GGCT	eekd ₁₀ kke	73	2280	2295	174 2
548204	該当なし	該当なし	TCTGACTAGTGA ATGG	eekd ₁₀ kke	25	2282	2297	174 3
548205	該当なし	該当なし	TCAATCTGACTA GTGA	eekd ₁₀ kke	14	2286	2301	174 4
548206	該当なし	該当なし	GGTCAATCTGAC TAGT	eekd ₁₀ kke	45	2288	2303	174 5
548207	該当なし	該当なし	CTGGTCAATCTG ACTA	eekd ₁₀ kke	60	2290	2305	174 6
548208	該当なし	該当なし	CTCTGGTCAATC TGAC	eekd ₁₀ kke	19	2292	2307	174 7
548209	該当なし	該当なし	CAATCTCTGGTC AATC	eekd ₁₀ kke	57	2296	2311	174 8
548210	該当なし	該当なし	CAACAATCTCTG GTCA	eekd ₁₀ kke	55	2299	2314	174 9
548211	該当なし	該当なし	ACCAACAATCTC TGGT	eekd ₁₀ kke	51	2301	2316	175 0

【1 3 7 4】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 5】

548212	該当なし	該当なし	AGCCCACCAACA ATCT	eekd ₁₀ kke	44	2306	2321	175 1
548213	該当なし	該当なし	GACAGCCCACCA ACAA	eekd ₁₀ kke	70	2309	2324	175 2
548214	該当なし	該当なし	CAGACAGCCCAC CAAC	eekd ₁₀ kke	55	2311	2326	175 3
548215	該当なし	該当なし	GCATAGACCCCA ACAG	eekd ₁₀ kke	61	2324	2339	175 4
548216	該当なし	該当なし	GTGCATAGACCC CAAC	eekd ₁₀ kke	45	2326	2341	175 5
548217	該当なし	該当なし	CTGTGCATAGAC CCCA	eekd ₁₀ kke	69	2328	2343	175 6
548218	該当なし	該当なし	TCCTGTGCATAG ACCC	eekd ₁₀ kke	59	2330	2345	175 7
548219	該当なし	該当なし	GAAATCCTGTGC ATAG	eekd ₁₀ kke	8	2334	2349	175 8
548220	該当なし	該当なし	GCAGAAATCCTG TGCA	eekd ₁₀ kke	69	2337	2352	175 9
548221	該当なし	該当なし	ACTCCAGCAGAA ATCC	eekd ₁₀ kke	49	2343	2358	176 0
548222	該当なし	該当なし	AATCATGCCTTG TGGG	eekd ₁₀ kke	32	4765	4780	176 1
548223	該当なし	該当なし	TAGACCCAGAAT CATG	eekd ₁₀ kke	50	4774	4789	176 2
548224	該当なし	該当なし	CCATAGACCCAG AATC	eekd ₁₀ kke	20	4777	4792	176 3
548225	該当なし	該当なし	AGTCACCATAGA CCCA	eekd ₁₀ kke	48	4782	4797	176 4
548226	該当なし	該当なし	TAAGTCACCATA GACC	eekd ₁₀ kke	39	4784	4799	176 5
548227	該当なし	該当なし	GTGGCCCTCTTA AGTC	eekd ₁₀ kke	0	4794	4809	176 6

【1 3 7 5】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 1】

表 1 4 7

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	42	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTC	eekd ₁₀ kke	80	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 7 6】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 2】

548228	該当 なし	該当な し	GTTGTGTGGCCCTC TT	eed ₁₀ kke	37	4799	4814	176 7
548229	該当 なし	該当な し	CATTGTTGTGTGGC CC	eed ₁₀ kke	31	4803	4818	176 8
548230	該当 なし	該当な し	TACTCATTGTTGTG TG	eed ₁₀ kke	10	4807	4822	176 9
548231	該当 なし	該当な し	AATACTCATTGTG TG	eed ₁₀ kke	11	4809	4824	177 0
548232	該当 なし	該当な し	GCCATACATCTGAG GA	eed ₁₀ kke	3	4831	4846	177 1
548233	該当 なし	該当な し	ATTGTAGCCATACA TC	eed ₁₀ kke	38	4837	4852	177 2
548234	該当 なし	該当な し	TTATTGTAGCCATA CA	eed ₁₀ kke	17	4839	4854	177 3
548235	該当 なし	該当な し	TCTAGATGACCTGA AG	eed ₁₀ kke	0	18147	18162	177 4
548236	該当 なし	該当な し	TACATCTAGATGAC CT	eed ₁₀ kke	37	18151	18166	177 5
548237	該当 なし	該当な し	GTATACATCTAGAT GA	eed ₁₀ kke	22	18154	18169	177 6
548238	該当 なし	該当な し	ACTCGCCTTTGTGA CT	eed ₁₀ kke	31	26268	26283	177 7
548239	該当 なし	該当な し	TACTCGCCTTTGTG AC	eed ₁₀ kke	18	26269	26284	177 8
548240	該当 なし	該当な し	ATACTCGCCTTTGT GA	eed ₁₀ kke	3	26270 26301	26285 26316	177 9
548241	該当 なし	該当な し	CATACTCGCCTTTG TG	eed ₁₀ kke	1	26271 26302	26286 26317	178 0
548242	該当 なし	該当な し	GCATACTCGCCTTT GT	eed ₁₀ kke	25	26272 26303	26287 26318	178 1
548243	該当 なし	該当な し	ATGCATACTCGCCT TT	eed ₁₀ kke	0	26274 26305	26289 26320	178 2
548244	該当 なし	該当な し	CATGCATACTCGCC TT	eed ₁₀ kke	51	26275 26306	26290 26321	178 3
548245	該当 なし	該当な し	CCATGCATACTCGC CT	eed ₁₀ kke	31	26276 26307	26291 26322	178 4
548246	該当 なし	該当な し	TTCCATGCATACTC GC	eed ₁₀ kke	46	26278	26293	178 5
548247	該当 なし	該当な し	CGATTTTCCATGCA TA	eed ₁₀ kke	56	26283	26298	178 6

【1 3 7 7】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 3】

548248	該当 なし	該当な し	TGCGATTTTCCATG CA	eekd ₁₀ kke	13	26285	26300	178 7
548249	該当 なし	該当な し	TGTGATGCCGATTTT CC	eekd ₁₀ kke	22	26290	26305	178 8
548250	該当 なし	該当な し	CTTTGTGATGCCGAT TT	eekd ₁₀ kke	0	26293	26308	178 9
548251	該当 なし	該当な し	GCCTTTGTGATGCCG AT	eekd ₁₀ kke	13	26295	26310	179 0
548252	該当 なし	該当な し	ACTCGCCTTTGTGA TG	eekd ₁₀ kke	33	26299	26314	179 1
548253	該当 なし	該当な し	TACTCGCCTTTGTG AT	eekd ₁₀ kke	8	26300	26315	179 2
548254	該当 なし	該当な し	CCCATGCATACTCG CC	eekd ₁₀ kke	39	26308	26323	179 3
548255	該当 なし	該当な し	CCCCATGCATACTC GC	eekd ₁₀ kke	38	26309	26324	179 4
548256	該当 なし	該当な し	GCTCCCCATGCATA CT	eekd ₁₀ kke	25	26312	26327	179 5
548257	該当 なし	該当な し	AGTGCTCCCCATGC AT	eekd ₁₀ kke	2	26315	26330	179 6
548258	該当 なし	該当な し	CAAGTGCTCCCCAT GC	eekd ₁₀ kke	0	26317	26332	179 7
548259	該当 なし	該当な し	GTGATGAAAGTACA GC	eekd ₁₀ kke	45	26335	26350	179 8
548260	該当 なし	該当な し	AGGAGTTTGTGAGA AC	eekd ₁₀ kke	28	3210	3225	179 9
548261	該当 なし	該当な し	TTCAGGGAGTGATG TC	eekd ₁₀ kke	36	3241	3256	180 0
548262	該当 なし	該当な し	CCTATCCGTGTTCA GC	eekd ₁₀ kke	73	3276	3291	180 1
548263	該当 なし	該当な し	CTCTACATACTCAG GA	eekd ₁₀ kke	62	3561	3576	180 2
548264	該当 なし	該当な し	CAGTCCAAAAATCC CT	eekd ₁₀ kke	60	3701	3716	180 3
548265	該当 なし	該当な し	CCTCTTGATTGGG CA	eekd ₁₀ kke	85	3749	3764	180 4
548266	該当 なし	該当な し	TTGGCCAACTCTGT GG	eekd ₁₀ kke	44	3816	3831	180 5
548267	該当 なし	該当な し	GACCTCCAGACTAC TG	eekd ₁₀ kke	34	3848	3863	180 6

【1 3 7 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 4】

548268	該当なし	該当なし	TGTGTCTAGGGAGT TG	eekd ₁₀ kke	52	3898	3913	180 7
548269	該当なし	該当なし	AGCACACAATTACT GG	eekd ₁₀ kke	62	3946	3961	180 8
548270	該当なし	該当なし	CTGCTGGTTTTAGA CC	eekd ₁₀ kke	28	4029	4044	180 9
548271	該当なし	該当なし	TTCACTTACCACAG GA	eekd ₁₀ kke	56	4122	4137	181 0
548272	該当なし	該当なし	GGTGCCACTTGCTT GG	eekd ₁₀ kke	54	4178	4193	181 1
548273	該当なし	該当なし	AATCTCCACCCCG AA	eekd ₁₀ kke	5	4224	4239	181 2
548274	該当なし	該当なし	TACCTGACAAGTGG TC	eekd ₁₀ kke	0	4287	4302	181 3
548275	該当なし	該当なし	GTCCCAAGACATTC CT	eekd ₁₀ kke	40	4350	4365	181 4
548276	該当なし	該当なし	CAGAGTGTCTCTG CG	eekd ₁₀ kke	49	4389	4404	181 5
548277	該当なし	該当なし	GGATTGGACCCAGA CA	eekd ₁₀ kke	57	4511	4526	181 6
548278	該当なし	該当なし	GGTTCCTAGCGGT CC	eekd ₁₀ kke	74	4564	4579	181 7
548279	該当なし	該当なし	CACCTAGAACTATC CA	eekd ₁₀ kke	39	4632	4647	181 8
548280	該当なし	該当なし	CTCCCTCTGTAATG AT	eekd ₁₀ kke	43	4736	4751	181 9
548281	該当なし	該当なし	GGTTGAGGGACAGA CA	eekd ₁₀ kke	0	4944	4959	182 0
548282	該当なし	該当なし	GTGGGTTTGACAT GG	eekd ₁₀ kke	73	4992	5007	182 1
548283	該当なし	該当なし	GGCTTATGCTCCTT CT	eekd ₁₀ kke	56	5017	5032	182 2
548284	該当なし	該当なし	CCCCCTGTAGTTGG CT	eekd ₁₀ kke	35	5051	5066	182 3
548285	該当なし	該当なし	GCTTACTTACATCC CT	eekd ₁₀ kke	52	5132	5147	182 4
548286	該当なし	該当なし	GGGACTACATGCAA TA	eekd ₁₀ kke	47	5166	5181	182 5
548287	該当なし	該当なし	GTCAAAGAGTGTC AC	eekd ₁₀ kke	38	5283	5298	182 6

【1 3 7 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 5】

548288	該当 なし	該当な し	GAATAGCAAGCTCC AA	eekd ₁₀ kke	64	5348	5363	182 7
548289	該当 なし	該当な し	CATGATACCACACC AC	eekd ₁₀ kke	28	5484	5499	182 8
548290	該当 なし	該当な し	GAGCACTCTTATTA GC	eekd ₁₀ kke	31	5546	5561	182 9
548291	該当 なし	該当な し	CCTGTTAGAGTTGG CC	eekd ₁₀ kke	35	5576	5591	183 0
548292	該当 なし	該当な し	AGGACACTGTTTCC AG	eekd ₁₀ kke	38	5627	5642	183 1
548293	該当 なし	該当な し	GTCACCAGAACCAC AT	eekd ₁₀ kke	44	5683	5698	183 2
548294	該当 なし	該当な し	GTGTGCACTTTCTG GT	eekd ₁₀ kke	33	5716	5731	183 3
548295	該当 なし	該当な し	CTCTGATTGGGTCA CC	eekd ₁₀ kke	26	5746	5761	183 4
548296	該当 なし	該当な し	ACCAACAACCTCAGG CC	eekd ₁₀ kke	34	5858	5873	183 5
548297	該当 なし	該当な し	ACTCTCAAGCTCCA CG	eekd ₁₀ kke	32	5889	5904	183 6
548298	該当 なし	該当な し	GGACAATATGTCTC CT	eekd ₁₀ kke	0	5935	5950	183 7
548299	該当 なし	該当な し	CATTGTGCTCAACT GA	eekd ₁₀ kke	35	5961	5976	183 8
548300	該当 なし	該当な し	GCCCATGGTGAATC TG	eekd ₁₀ kke	53	5995	6010	183 9
548301	該当 なし	該当な し	CCTAGTACAAAGTG GC	eekd ₁₀ kke	65	6050	6065	184 0
548302	該当 なし	該当な し	GCCATTTTATCCCT GA	eekd ₁₀ kke	71	6134	6149	184 1
548303	該当 なし	該当な し	GGGCCCCCATGTCC AT	eekd ₁₀ kke	0	6336	6351	184 2

【1 3 8 0】

10

20

30

40

50

【表 1 3 5 - 1】

表 1 4 8

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAG TTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	72	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTT TC	eekd ₁₀ kke	67	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【1 3 8 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3 5 - 2】

548305	該当なし	該当なし	GTTCTTGCTTATCC TC	eed ₁₀ kke	55	6484	6499	184 3
548306	該当なし	該当なし	ATGTGACAGTCAGG GA	eed ₁₀ kke	8	6559	6574	184 4
548307	該当なし	該当なし	TTCTGCAACTGAGC CT	eed ₁₀ kke	6	6587	6602	184 5
548308	該当なし	該当なし	AATGGCAGGTCCTG GC	eed ₁₀ kke	9	6616	6631	184 6
548309	該当なし	該当なし	AGACAGTTGGTGGT TT	eed ₁₀ kke	41	6700	6715	184 7
548310	該当なし	該当なし	GAGGAGTTGGTTTA GT	eed ₁₀ kke	0	6750	6765	184 8
548311	該当なし	該当なし	TGACCACCTCTCGG GT	eed ₁₀ kke	10	6860	6875	184 9
548312	該当なし	該当なし	ATTGGCCCTGAGC CC	eed ₁₀ kke	0	6935	6950	185 0
548313	該当なし	該当なし	GCCTTTGAGGGAGT GG	eed ₁₀ kke	35	7024	7039	185 1
548314	該当なし	該当なし	ACAACCTGTCCATT CC	eed ₁₀ kke	43	7087	7102	185 2
548315	該当なし	該当なし	GTTGTCAACTGGGA CC	eed ₁₀ kke	14	7125	7140	185 3
548316	該当なし	該当なし	CTGTTCAGGTAGCA CA	eed ₁₀ kke	64	7150	7165	185 4
548317	該当なし	該当なし	CCGGGAAAGACTGT CT	eed ₁₀ kke	42	7190	7205	185 5
548318	該当なし	該当なし	ACTGCACCCACAT AT	eed ₁₀ kke	18	7257	7272	185 6
548319	該当なし	該当なし	CCTCATCTCAGTAT GA	eed ₁₀ kke	26	7398	7413	185 7
548320	該当なし	該当なし	GCACACAGACTTGC CC	eed ₁₀ kke	0	7508	7523	185 8
548321	該当なし	該当なし	CTGCATCTGGAATA TG	eed ₁₀ kke	38	7559	7574	185 9
548322	該当なし	該当なし	AGGGAAATTAGAGG CA	eed ₁₀ kke	38	7586	7601	186 0
548323	該当なし	該当なし	CTGTTGCCTGACAT GC	eed ₁₀ kke	43	7696	7711	186 1
548324	該当なし	該当なし	ACATAAATCCCCA CA	eed ₁₀ kke	29	7741	7756	186 2

【1 3 8 2】

10

20

30

40

50

【表 1 3 5 - 3】

548325	該当なし	該当なし	CCCACTGACTGACT AC	eed ₁₀ kke	27	7906	7921	186 3
548326	該当なし	該当なし	TCCTGTGACAGAAC CA	eed ₁₀ kke	27	7988	8003	186 4
548327	該当なし	該当なし	CTACACCTTTCTGC AC	eed ₁₀ kke	6	8221	8236	186 5
548328	該当なし	該当なし	GGTCCTTGAACCCC GT	eed ₁₀ kke	68	8260	8275	186 6
548329	該当なし	該当なし	AGCAGATCTGGGTT GT	eed ₁₀ kke	59	8328	8343	186 7
548330	該当なし	該当なし	GACTAGCTTCTACT AC	eed ₁₀ kke	34	8404	8419	186 8
548331	該当なし	該当なし	ACAATCCCTTAGCC CA	eed ₁₀ kke	73	8457	8472	186 9
548332	該当なし	該当なし	GATGAAATGTGCAC CT	eed ₁₀ kke	46	8491	8506	187 0
548333	該当なし	該当なし	GACTGTGCTATCCG CT	eed ₁₀ kke	58	8550	8565	187 1
548334	該当なし	該当なし	GCTCACTATAGGCC CC	eed ₁₀ kke	69	8656	8671	187 2
548335	該当なし	該当なし	TAGCATCATGCCAC AG	eed ₁₀ kke	51	8684	8699	187 3
548336	該当なし	該当なし	GCACATTAGGAGGT AG	eed ₁₀ kke	1	9039	9054	187 4
548337	該当なし	該当なし	TACCGCTGGGTGCG GT	eed ₁₀ kke	10	9075	9090	187 5
548338	該当なし	該当なし	ATGAACTGTGGCT CG	eed ₁₀ kke	80	9131	9146	187 6
548339	該当なし	該当なし	ACATGTGGGATCAG AG	eed ₁₀ kke	37	9275	9290	187 7
548340	該当なし	該当なし	GATGATCCTCACAT AC	eed ₁₀ kke	35	9316	9331	187 8
548341	該当なし	該当なし	TAGAACCTTCCTCC AC	eed ₁₀ kke	30	9341	9356	187 9
548342	該当なし	該当なし	GGAAGACTTCCCTC TG	eed ₁₀ kke	0	9403	9418	188 0
548343	該当なし	該当なし	TAGTGATAAGAGCT GG	eed ₁₀ kke	78	9472	9487	188 1
548344	該当なし	該当なし	GGCAACTATGTTCT CA	eed ₁₀ kke	76	9536	9551	188 2

【1 3 8 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3 5 - 4】

548345	該当なし	該当なし	CTAACTCCATCACTGC	eekd ₁₀ kke	55	9637	9652	1883
548346	該当なし	該当なし	TCCCAATACTTGCTG	eekd ₁₀ kke	35	9696	9711	1884
548347	該当なし	該当なし	GCTGTTCTAAGCGAGA	eekd ₁₀ kke	31	9976	9991	1885
548348	該当なし	該当なし	TGAGTGATGCCTTCCA	eekd ₁₀ kke	82	10024	10039	1886
548349	該当なし	該当なし	TCCAGAATACTGCCCC	eekd ₁₀ kke	61	10054	10069	1887
548350	該当なし	該当なし	GCGCTAACCTCATAAA	eekd ₁₀ kke	29	10148	10163	1888
548351	該当なし	該当なし	CTGGAACGAGACACA	eekd ₁₀ kke	33	10201	10216	1889
548352	該当なし	該当なし	GAGAGAGATGTTCCCT	eekd ₁₀ kke	47	10240	10255	1890
548353	該当なし	該当なし	CTGCTGGTTGAGAACTC	eekd ₁₀ kke	48	10287	10302	1891
548354	該当なし	該当なし	ATGTCCCCAGTGGAAG	eekd ₁₀ kke	41	10314	10329	1892
548355	該当なし	該当なし	GCATCCTCCCTAGTTG	eekd ₁₀ kke	47	10362	10377	1893
548356	該当なし	該当なし	TGTTGGTCAGCATTCA	eekd ₁₀ kke	63	10411	10426	1894
548357	該当なし	該当なし	GACGACTGCCCTGTGC	eekd ₁₀ kke	69	10436	10451	1895
548358	該当なし	該当なし	ATTTGGGCCTAGTGTG	eekd ₁₀ kke	0	10515	10530	1896
548359	該当なし	該当なし	CCTAGTCCTCAAGTTT	eekd ₁₀ kke	0	10580	10595	1897
548360	該当なし	該当なし	CAAGACATCAGTAGCT	eekd ₁₀ kke	45	10626	10641	1898
548361	該当なし	該当なし	CTTATCAGTCCCAGTC	eekd ₁₀ kke	52	10702	10717	1899
548362	該当なし	該当なし	GACAACCCATCAGTTG	eekd ₁₀ kke	33	10742	10757	1900
548363	該当なし	該当なし	CAGCAGGCTCAAAGTG	eekd ₁₀ kke	37	10915	10930	1901
548364	該当なし	該当なし	TGGCTAAGTCAGGCC	eekd ₁₀ kke	30	10982	10997	1902
548365	該当なし	該当なし	TGTACTCCACCTCACG	eekd ₁₀ kke	55	11017	11032	1903

10

20

30

40

【1 3 8 4】

50

【表 1 3 5 - 5】

548366	該当なし	該当なし	AGCAAGCTAAGTGA GT	eekd ₁₀ kke	5	11199	11214	190 4
548367	該当なし	該当なし	GTTCTTGAGTGTAG AG	eekd ₁₀ kke	52	11260	11275	190 5
548368	該当なし	該当なし	GTGTTTCATACGGAA GC	eekd ₁₀ kke	59	11299	11314	190 6
548369	該当なし	該当なし	GTTGGGATGCCACT CT	eekd ₁₀ kke	50	11335	11350	190 7
548370	該当なし	該当なし	ACGAAGTCTCTTTC CT	eekd ₁₀ kke	53	11385	11400	190 8
548371	該当なし	該当なし	CGATGAGTTGGGCA GG	eekd ₁₀ kke	57	11454	11469	190 9
548372	該当なし	該当なし	GATACCTTTCCACT CC	eekd ₁₀ kke	61	11558	11573	191 0
548373	該当なし	該当なし	TCCCCAAGATTATG TG	eekd ₁₀ kke	16	11596	11611	191 1
548374	該当なし	該当なし	GCACCCTTTTCATT GA	eekd ₁₀ kke	41	12074	12089	191 2
548375	該当なし	該当なし	TCGACTTCTCCTGT CT	eekd ₁₀ kke	27	12199	12214	191 3
548376	該当なし	該当なし	GCCTTTGACCTTTC GC	eekd ₁₀ kke	65	12261	12276	191 4
548377	該当なし	該当なし	GTGTGCTGAGGTTT GC	eekd ₁₀ kke	80	12297	12312	191 5
548378	該当なし	該当なし	GCAAGATGCATGCA GC	eekd ₁₀ kke	49	12393	12408	191 6
548379	該当なし	該当なし	ATCGAACTCTGCTT GA	eekd ₁₀ kke	44	12477	12492	191 7
548380	該当なし	該当なし	GCCCAGTTTTGGCA AC	eekd ₁₀ kke	7	12540	12555	191 8
548381	該当なし	該当なし	CCCACTACCATTTG GG	eekd ₁₀ kke	0	12578	12593	191 9

【1 3 8 5】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 1】

表 1 4 9

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGT TTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTT C	eekd ₁₀ kke	64	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【 1 3 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 2】

548459	該当 なし	該当な し	CAACTATAACAGTAT C	eekd ₁₀ kke	26	15903	15918	192 0
548460	該当 なし	該当な し	CTATACCACGGTAAC T	eekd ₁₀ kke	0	16036	16051	192 1
548461	該当 なし	該当な し	CCTATATCACTGTAA C	eekd ₁₀ kke	0	16127	16142	192 2
548462	該当 なし	該当な し	ACCTATATCACTGTA A	eekd ₁₀ kke	0	16128	16143	192 3
548463	該当 なし	該当な し	TCACTGTACCTATAT C	eekd ₁₀ kke	0	16135	16150	192 4
548464	該当 なし	該当な し	GTCCTATAACTATAT C	eekd ₁₀ kke	0	16174	16189	192 5
548465	該当 なし	該当な し	CTGTACCTATAACTG T	eekd ₁₀ kke	0	16202	16217	192 6
548466	該当 なし	該当な し	CGTCACTGTACCTAT A	eekd ₁₀ kke	71	16207	16222	192 7
548467	該当 なし	該当な し	CATCACTGTACCTAT A	eekd ₁₀ kke	20	16258	16273	192 8
548468	該当 なし	該当な し	CAACATCACTGTACC T	eekd ₁₀ kke	6	16261	16276	192 9
548469	該当 なし	該当な し	TTCCCTACCCCTGGT A	eekd ₁₀ kke	0	16331	16346	193 0
548470	該当 なし	該当な し	GGTGGAATGTCATGG C	eekd ₁₀ kke	56	16404	16419	193 1
548471	該当 なし	該当な し	GCGGAAAACCTGGCCG T	eekd ₁₀ kke	17	16474	16489	193 2
548472	該当 なし	該当な し	CCCAATACAGGGCCA G	eekd ₁₀ kke	0	16513	16528	193 3
548473	該当 なし	該当な し	CCAACCTTCCCAATC T	eekd ₁₀ kke	0	16554	16569	193 4
548474	該当 なし	該当な し	GAAGGTGTGCTGTCG C	eekd ₁₀ kke	33	16602	16617	193 5
548475	該当 なし	該当な し	ATCGAGTCCTGCCTC C	eekd ₁₀ kke	17	16707	16722	193 6
548476	該当 なし	該当な し	GCAAATCCTTCCAGC A	eekd ₁₀ kke	27	16755	16770	193 7
548477	該当 なし	該当な し	GCACGAGCTTGCCTG T	eekd ₁₀ kke	26	16787	16802	193 8
548478	該当 なし	該当な し	GAGCCATCCAGGGTG C	eekd ₁₀ kke	53	16845	16860	193 9

【1 3 8 7】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 3】

548479	該当 なし	該当な し	AGGCCATTTGATCCG A	eekd ₁₀ kke	68	16913	16928	194 0
548480	該当 なし	該当な し	GCCACGCCCTTAGCA G	eekd ₁₀ kke	20	16973	16988	194 1
548481	該当 なし	該当な し	GTTCCCTGAGGAACG G	eekd ₁₀ kke	2	17010	17025	194 2
548482	該当 なし	該当な し	GGCAGTTAGGCCAGG A	eekd ₁₀ kke	53	17068	17083	194 3
548483	該当 なし	該当な し	CTACAGATCATCCCT A	eekd ₁₀ kke	5	17102	17117	194 4
548484	該当 なし	該当な し	CCCCGAGCACCTTC A	eekd ₁₀ kke	41	17207	17222	194 5
548485	該当 なし	該当な し	GTGACCCAAGGGTCG A	eekd ₁₀ kke	17	17252	17267	194 6
548486	該当 なし	該当な し	CGTGGTTAGCCTGAC A	eekd ₁₀ kke	68	17416	17431	194 7
548487	該当 なし	該当な し	TCCATGTCAGAGTTG C	eekd ₁₀ kke	71	17461	17476	194 8
548488	該当 なし	該当な し	CCTCCTTTTGCTTG A	eekd ₁₀ kke	63	17530	17545	194 9
548489	該当 なし	該当な し	TTCCCAGAGGTGAT A	eekd ₁₀ kke	16	17582	17597	195 0
548490	該当 なし	該当な し	TCTGGTTAGCCTCCG A	eekd ₁₀ kke	58	17664	17679	195 1
548491	該当 なし	該当な し	TGGCCAAGCAACCAG T	eekd ₁₀ kke	57	17715	17730	195 2
548492	該当 なし	該当な し	GCCCAATGTCCTAAC C	eekd ₁₀ kke	51	17794	17809	195 3
548493	該当 なし	該当な し	CCACCGCTGCCCGCC A	eekd ₁₀ kke	37	18013	18028	195 4
548494	該当 なし	該当な し	TGTGACCCCCACCG C	eekd ₁₀ kke	39	18022	18037	195 5
548495	該当 なし	該当な し	TTGTGACCCCCACC G	eekd ₁₀ kke	55	18023	18038	195 6
548496	該当 なし	該当な し	ACTGAACCCCTTAG G	eekd ₁₀ kke	0	18571	18586	195 7
548497	該当 なし	該当な し	CCTTCATACCCCTCA C	eekd ₁₀ kke	26	18725	18740	195 8
548498	該当 なし	該当な し	CCGATAACAGACCGG C	eekd ₁₀ kke	71	18795	18810	195 9

【1 3 8 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 4】

548499	該当 なし	該当な し	ATACCCGGAGTCAGG A	eed ₁₀ kke	56	18955	18970	196 0
548500	該当 なし	該当な し	ATTGCTCAGGCCCC T	eed ₁₀ kke	29	19037	19052	196 1
548501	該当 なし	該当な し	CAAGCCACTAACCCA C	eed ₁₀ kke	33	19147	19162	196 2
548502	該当 なし	該当な し	AATTCTTGGACCAAG G	eed ₁₀ kke	25	19234	19249	196 3
548503	該当 なし	該当な し	CCATCTACTCCCCA T	eed ₁₀ kke	9	19291	19306	196 4
548504	該当 なし	該当な し	GCAGCGAGCATTCCA A	eed ₁₀ kke	28	19352	19367	196 5
548505	該当 なし	該当な し	GGACAATGCCTATGC T	eed ₁₀ kke	21	19386	19401	196 6
548506	該当 なし	該当な し	GAAGCCATTCACTGC A	eed ₁₀ kke	32	19436	19451	196 7
548507	該当 なし	該当な し	AAACTCCTCTCAAGG C	eed ₁₀ kke	53	19474	19489	196 8
548508	該当 なし	該当な し	GCACCACCATGCGGT T	eed ₁₀ kke	43	19553	19568	196 9
548509	該当 なし	該当な し	TGCAGGGCTGCGCAG T	eed ₁₀ kke	41	19960	19975	197 0
548510	該当 なし	該当な し	TTAGCCACTCCTCTT G	eed ₁₀ kke	30	20062	20077	197 1
548511	該当 なし	該当な し	AGCTAGCTGACCCCA A	eed ₁₀ kke	16	20092	20107	197 2
548512	該当 なし	該当な し	TCCGCCTTTGGATAC T	eed ₁₀ kke	49	20155	20170	197 3
548513	該当 なし	該当な し	CCTGCTGATTGTGTC T	eed ₁₀ kke	16	20240	20255	197 4
548514	該当 なし	該当な し	TCGAGGACAGCCCC A	eed ₁₀ kke	40	20335	20350	197 5
548515	該当 なし	該当な し	ACCCGTCAGCCTCAG C	eed ₁₀ kke	59	20381	20396	197 6
548516	該当 なし	該当な し	CTTGCCTATTCACCC C	eed ₁₀ kke	49	20544	20559	197 7
548517	該当 なし	該当な し	CGGACAAGCCTTACA G	eed ₁₀ kke	43	20596	20611	197 8
548518	該当 なし	該当な し	CACACTTACCCCGCT C	eed ₁₀ kke	12	20741	20756	197 9

【1 3 8 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 5】

548519	該当なし	該当なし	CCTCCCCCTTGTGTGT C	eekd ₁₀ kke	31	20843	20858	198 0
548520	該当なし	該当なし	CCGCTTCCCTGACTG T	eekd ₁₀ kke	43	20919	20934	198 1
548521	該当なし	該当なし	CAGCTCCCTTACTAG G	eekd ₁₀ kke	61	20958	20973	198 2
548522	該当なし	該当なし	AGGTATTGACCGCCA G	eekd ₁₀ kke	55	21062	21077	198 3
548523	該当なし	該当なし	GGTAAATCCATCCCC T	eekd ₁₀ kke	44	21157	21172	198 4
548524	該当なし	該当なし	GCCCGATCACCTTAG A	eekd ₁₀ kke	45	21220	21235	198 5
548525	該当なし	該当なし	GTCTAACTGGCCTGG C	eekd ₁₀ kke	2	21328	21343	198 6
548526	該当なし	該当なし	CTAAGCTGTGTCTCA T	eekd ₁₀ kke	26	21373	21388	198 7
548527	該当なし	該当なし	TGTTTCAAGTGCCAG A	eekd ₁₀ kke	50	21434	21449	198 8
548528	該当なし	該当なし	TGCAGTGGTCAAGCA T	eekd ₁₀ kke	32	21478	21493	198 9
548529	該当なし	該当なし	GCGATTCTTGCCCTC T	eekd ₁₀ kke	56	21554	21569	199 0
548530	該当なし	該当なし	ATAATAGAGGCAGCC A	eekd ₁₀ kke	50	21592	21607	199 1
548531	該当なし	該当なし	GTCAGAAGGCCTCTT A	eekd ₁₀ kke	21	21753	21768	199 2
548532	該当なし	該当なし	TATTTATCCGACCTC T	eekd ₁₀ kke	34	21881	21896	199 3
548533	該当なし	該当なし	GAGGTGGTTGGAGCT A	eekd ₁₀ kke	9	21926	21941	199 4
548534	該当なし	該当なし	CAGATCCCAATTCTT C	eekd ₁₀ kke	22	22063	22078	199 5
548535	該当なし	該当なし	GAGTCTTTCCAATCC T	eekd ₁₀ kke	13	22142	22157	199 6

【1 3 9 0】

10

20

30

40

50

【表 1 3 7 - 1】

表 1 5 0

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTAGT TTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGTTT C	eekd ₁₀ kke	64	14746	14761	126 7
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	

【 1 3 9 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3 7 - 2】

548536	該当 なし	該当な し	TCTCAATCCCAACCC C	eed ₁₀ kke	0	22168	22183	199 7
548537	該当 なし	該当な し	CCTCAATCCCAACCC A	eed ₁₀ kke	0	22191	22206	199 8
548538	該当 なし	該当な し	TAGTGGCAAGAACCA C	eed ₁₀ kke	0	22627	22642	199 9
548539	該当 なし	該当な し	CGCGCAATGCCTGC C	eed ₁₀ kke	41	22658	22673	200 0
548540	該当 なし	該当な し	GACACCTGCTTGATT A	eed ₁₀ kke	7	22704	22719	200 1
548541	該当 なし	該当な し	GGCACTGGTCATGGA C	eed ₁₀ kke	39	22760	22775	200 2
548542	該当 なし	該当な し	GCGCCATCCTTCAAT C	eed ₁₀ kke	7	22857	22872	200 3
548543	該当 なし	該当な し	GATCCACCCATGACC T	eed ₁₀ kke	32	22997	23012	200 4
548544	該当 なし	該当な し	GCTGTGACTCAGATC A	eed ₁₀ kke	62	23070	23085	200 5
548545	該当 なし	該当な し	CTCTTCGCATGGACA C	eed ₁₀ kke	46	23100	23115	200 6
548546	該当 なし	該当な し	GCCCAAGCCTACATG C	eed ₁₀ kke	35	23430	23445	200 7
548547	該当 なし	該当な し	GTGCGATTAAGCCCC A	eed ₁₀ kke	86	23514	23529	200 8
548548	該当 なし	該当な し	GCTTGTAAGGGAT T	eed ₁₀ kke	54	23631	23646	200 9
548549	該当 なし	該当な し	TGTGCAATCAGGTGG A	eed ₁₀ kke	56	23765	23780	201 0
548550	該当 なし	該当な し	CCGGCCTGGATACAG C	eed ₁₀ kke	0	23831	23846	201 1
548551	該当 なし	該当な し	CGGCCAATGGGAAAG G	eed ₁₀ kke	25	24175	24190	201 2
548552	該当 なし	該当な し	TGGAGGAGTAGGGAA T	eed ₁₀ kke	10	24200	24215	201 3
548553	該当 なし	該当な し	CCCGAAGAGTCAAGT C	eed ₁₀ kke	46	24255	24270	201 4
548554	該当 なし	該当な し	GTGCTGCATTGCATG A	eed ₁₀ kke	42	24290	24305	201 5
548555	該当 なし	該当な し	ACACGCCAGGTGAAA A	eed ₁₀ kke	2	24322	24337	201 6

【1 3 9 2】

10

20

30

40

50

【表 1 3 7 - 3】

548556	該当 なし	該当な し	ATGCATGCCTACCCA A	eed ₁₀ kke	43	24526	24541	201 7
548557	該当 なし	該当な し	GTTACTCTGTGATCC A	eed ₁₀ kke	81	24581	24596	201 8
548558	該当 なし	該当な し	AACATTGTGTAGCTG C	eed ₁₀ kke	75	24640	24655	201 9
548559	該当 なし	該当な し	GAGACTGAAGCCCTC A	eed ₁₀ kke	44	24676	24691	202 0
548560	該当 なし	該当な し	CACTGCCTAGAAAGG C	eed ₁₀ kke	16	24734	24749	202 1
548561	該当 なし	該当な し	TGTAGTATCCAGAGT A	eed ₁₀ kke	46	24930	24945	202 2
548562	該当 なし	該当な し	AGATGACCTGCAGAT G	eed ₁₀ kke	50	24983	24998	202 3
548563	該当 なし	該当な し	AAACCATGAATTAGG T	eed ₁₀ kke	20	25100	25115	202 4
548564	該当 なし	該当な し	TTGCTACTTTACACC A	eed ₁₀ kke	69	25208	25223	202 5
548565	該当 なし	該当な し	GGCATTAGGATAGGC A	eed ₁₀ kke	63	25350	25365	202 6
548566	該当 なし	該当な し	CACTCAGACTGTCTG A	eed ₁₀ kke	0	25413	25428	202 7
548567	該当 なし	該当な し	AGATCCGGAATAACC A	eed ₁₀ kke	67	25459	25474	202 8
548568	該当 なし	該当な し	ATTGACAACCATCCT A	eed ₁₀ kke	27	25496	25511	202 9
548569	該当 なし	該当な し	ACTATTGGTCTACA G	eed ₁₀ kke	41	25559	25574	203 0
548570	該当 なし	該当な し	ATGCCTTGTGCCTAT T	eed ₁₀ kke	74	25706	25721	203 1
548571	該当 なし	該当な し	ACTCTGAGGCCTTAG G	eed ₁₀ kke	59	25794	25809	203 2
548572	該当 なし	該当な し	GCATTACTCAGCATG T	eed ₁₀ kke	63	25836	25851	203 3
548573	該当 なし	該当な し	CCAGTCACCACCATT G	eed ₁₀ kke	65	25862	25877	203 4
548574	該当 なし	該当な し	GGTCTAACTCTAAGG G	eed ₁₀ kke	0	25920	25935	203 5
548575	該当 なし	該当な し	TGTCCTTTAAAGTAT C	eed ₁₀ kke	18	25971	25986	203 6

【1 3 9 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3 7 - 4】

548576	該当 なし	該当な し	TCATGTGGCAACCTG T	eed ₁₀ kke	41	26114	26129	203 7
548577	該当 なし	該当な し	AATCTGCACCTGGCA G	eed ₁₀ kke	42	26428	26443	203 8
548578	該当 なし	該当な し	CATGGCTATTGCTTC C	eed ₁₀ kke	73	26513	26528	203 9
548579	該当 なし	該当な し	GGGCTATATTGCCAG C	eed ₁₀ kke	46	26614	26629	204 0
548580	該当 なし	該当な し	CCAGAGCCTTGATCA G	eed ₁₀ kke	36	26681	26696	204 1
548581	該当 なし	該当な し	GGTGGGTATCTGAG A	eed ₁₀ kke	13	26710	26725	204 2
548582	該当 なし	該当な し	TAGCTCCATGCTGTG T	eed ₁₀ kke	59	26735	26750	204 3
548583	該当 なし	該当な し	GGGAATTTATGCTGC C	eed ₁₀ kke	79	26782	26797	204 4
548584	該当 なし	該当な し	TGATGAAGTTCACCC T	eed ₁₀ kke	47	26840	26855	204 5
548585	該当 なし	該当な し	TAGGCACAGACAACC T	eed ₁₀ kke	33	26869	26884	204 6
548586	該当 なし	該当な し	TCCAACCTACAGGACT C	eed ₁₀ kke	39	26943	26958	204 7
548587	該当 なし	該当な し	TTCTGGGAAACTCTC T	eed ₁₀ kke	45	26969	26984	204 8
548588	該当 なし	該当な し	AGCTCACACCAAAA A	eed ₁₀ kke	10	27006	27021	204 9
548589	該当 なし	該当な し	TCTGTTACCTTGAGG A	eed ₁₀ kke	40	27280	27295	205 0
548590	該当 なし	該当な し	TGGTCATGTCAACTG T	eed ₁₀ kke	35	27550	27565	205 1
548591	該当 なし	該当な し	GTAAGCCTTCACAGG G	eed ₁₀ kke	3	27583	27598	205 2
548592	該当 なし	該当な し	CTCACCAGAGTTGTC C	eed ₁₀ kke	7	27726	27741	205 3
548593	該当 なし	該当な し	CATCCCTGACAGGTC C	eed ₁₀ kke	61	27759	27774	205 4
548594	該当 なし	該当な し	CCCTTCTAACCAAGG A	eed ₁₀ kke	30	27825	27840	205 5
548595	該当 なし	該当な し	GGATGAGATGCATCC A	eed ₁₀ kke	8	28069	28084	205 6

【1 3 9 4】

10

20

30

40

50

【表 1 3 7 - 5】

548596	該当なし	該当なし	ATGGCGGTGAAGCAGC	eekd ₁₀ kke	20	28127	28142	2057
548597	該当なし	該当なし	TGAATACCATCCCCG	eekd ₁₀ kke	50	28171	28186	2058
548598	該当なし	該当なし	GCGCCATCTGCCCTGT	eekd ₁₀ kke	50	28253	28268	2059
548599	該当なし	該当なし	TGGGTGGGAGGAGTGG	eekd ₁₀ kke	19	28311	28326	2060
548600	該当なし	該当なし	TGGTGGTGGGATTGGT	eekd ₁₀ kke	53	28336	28351	2061
						28391	28406	
						28434	28449	
						28446	28461	
						28525	28540	
						28611	28626	
548601	該当なし	該当なし	TTGGTGGTGGGATTGG	eekd ₁₀ kke	18	28337	28352	2062
						28392	28407	
						28435	28450	
						28447	28462	
						28526	28541	
						28612	28627	
548602	該当なし	該当なし	GGTGGTGGAATTGGTG	eekd ₁₀ kke	20	28347	28362	2063
548603	該当なし	該当なし	GAGATTGGTGGTGGG	eekd ₁₀ kke	35	28372	28387	2064
548604	該当なし	該当なし	GTGGTGGGATTGGTGC	eekd ₁₀ kke	22	28432	28447	2065
548605	該当なし	該当なし	TGGCGGGATTGGTGG	eekd ₁₀ kke	12	28479	28494	2066
						28558	28573	2066
548606	該当なし	該当なし	CGGTGGTGGGATTGG	eekd ₁₀ kke	41	28501	28516	2067
						28580	28595	2067
548607	該当なし	該当なし	TCGGTGGTGGGATTGG	eekd ₁₀ kke	34	28502	28517	2068
						28581	28596	2068
548608	該当なし	該当なし	ATCGGTGGTGGGATTGG	eekd ₁₀ kke	25	28503	28518	2069
						28582	28597	2069
548609	該当なし	該当なし	GATCGGTGGTGGGATT	eekd ₁₀ kke	30	28504	28519	2070
						28583	28598	2070
548610	該当なし	該当なし	GGATCGGTGGTGGGATT	eekd ₁₀ kke	2	28505	28520	2071
						28584	28599	2071

【1 3 9 5】

【表 1 3 7 - 6】

548611	該当なし	該当なし	GCGGGATCGGTGGTGG	eekd ₁₀ kke	7	28508	28523	2072
						28587	28602	2072
548612	該当なし	該当なし	GGCGGATCGGTGGTGG	eekd ₁₀ kke	20	28509	28524	2073
						28588	28603	2073

【1 3 9 6】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 1】

表 1 5 1

ISIS 番号	配列 番号 1 開始部 位	配列 番号 1 終止部 位	配列	化学構造	% 阻 害	配列番 号 10 開始部 位	配列番 号 10 終止部 位	配列 番号
531231	該当 なし	該当 なし	TATCACTGTACTAGTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	46	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	

10

【1 3 9 7】

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 2】

						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当 なし	該当 なし	TCCTGCTACTAGTTTC	eekd ₁₀ kke	64	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548382	該当 なし	該当 なし	GAGCAAATACAGTCCA	eekd ₁₀ kke	19	12620	12635	2074
548383	該当 なし	該当 なし	GTCTCGATGGCAAGCT	eekd ₁₀ kke	49	12654	12669	2075
548384	該当 なし	該当 なし	CTCACC GG TACTCTGC	eekd ₁₀ kke	49	12805	12820	2076
548385	該当 なし	該当 なし	TCCTGGAGGCACCAAT	eekd ₁₀ kke	0	12847	12862	2077
548386	該当 なし	該当 なし	AGCCCTGTTTGGTTTT	eekd ₁₀ kke	0	12903	12918	2078
548387	該当 なし	該当 なし	TGAAGGGCGAGGCGCA	eekd ₁₀ kke	22	13261	13276	2079
548388	該当 なし	該当 なし	AAGAGGATGTCAGGCT	eekd ₁₀ kke	4	13357	13372	2080
548389	該当 なし	該当 なし	TTGAGGAAAGACCTGC	eekd ₁₀ kke	11	13399	13414	2081
548390	該当 なし	該当 なし	GCTGAGTGTGACTTAA	eekd ₁₀ kke	43	13455	13470	2082
548391	該当 なし	該当 なし	GTACATGACTCCAGTG	eekd ₁₀ kke	34	13638	13653	2083
548392	該当 なし	該当 なし	GTAGAGCATGGAGCGA	eekd ₁₀ kke	31	13730	13745	2084

【 1 3 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 3】

548393	該当 なし	該当 なし	CGCTTCAGGAAAGCGA	eed ₁₀ kke	26	13828	13843	2085
548394	該当 なし	該当 なし	GGCAGGAGACTCCGTG	eed ₁₀ kke	25	13919	13934	2086
548395	該当 なし	該当 なし	ATCCTTCCCCTCGCAA	eed ₁₀ kke	0	13966	13981	2087
548396	該当 なし	該当 なし	TAATGAGTGGGTAGG	eed ₁₀ kke	0	14007	14022	2088
548397	該当 なし	該当 なし	GGAGCAGTGCAGGTAA	eed ₁₀ kke	1	14065	14080	2089
548398	該当 なし	該当 なし	ATAGGCAATTGTTCT	eed ₁₀ kke	55	14129	14144	2090
548399	該当 なし	該当 なし	AGTCCTACAATTACCA	eed ₁₀ kke	11	14239	14254	2091
548400	該当 なし	該当 なし	GGGCTCCTATTCCACC	eed ₁₀ kke	13	14277	14292	2092
548401	該当 なし	該当 なし	GCCAGCTATGGGAACA	eed ₁₀ kke	71	14333	14348	2093
548402	該当 なし	該当 なし	CCCCATCTCGAAGCCC	eed ₁₀ kke	45	14380	14395	2094
548403	該当 なし	該当 なし	GAGTACATTGGGCCCA	eed ₁₀ kke	25	14418	14433	2095
548404	該当 なし	該当 なし	GAGCCTCCGCTCTC	eed ₁₀ kke	37	14471	14486	2096
548405	該当 なし	該当 なし	CGGACCTTCATCTTCA	eed ₁₀ kke	35	14529	14544	2097
548406	該当 なし	該当 なし	TCTAGAGGCCGCTGC	eed ₁₀ kke	0	14558	14573	2098
548407	該当 なし	該当 なし	CCTATAACTGCTGCTC	eed ₁₀ kke	24	14731	14746	2099
548408	該当 なし	該当 なし	TATCACTGTACTAGTT	eed ₁₀ kke	47	14748	14763	1269
						14819	14834	
						14890	14905	
						14949	14964	
						15009	15024	
						15081	15096	
						15153	15168	
						15224	15239	
						15296	15311	
						15355	15370	
						15415	15430	
						15487	15502	
						15559	15574	
						15617	15632	
						15689	15704	
						15819	15834	
						15891	15906	
						15949	15964	

【 1 3 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 4】

548409	該当 なし	該当 なし	GTATCACTGTACTAGT	eekd ₁₀ kke	81	14749	14764	2100
						14820	14835	
						14891	14906	
						14950	14965	
						15010	15025	
						15082	15097	
						15154	15169	
						15225	15240	
						15297	15312	
						15356	15371	
						15416	15431	
						15488	15503	
						15560	15575	
						15618	15633	
						15690	15705	
						15820	15835	
						15892	15907	
						15950	15965	
548410	該当 なし	該当 なし	AGTATCACTGTACTAG	eekd ₁₀ kke	85	14750	14765	2101
						14821	14836	
						14892	14907	
						14951	14966	
						15011	15026	
						15083	15098	
						15155	15170	
						15226	15241	
						15298	15313	
						15357	15372	
						15417	15432	
						15489	15504	
						15561	15576	
						15619	15634	
						15691	15706	
						15821	15836	
						15893	15908	
						15951	15966	
548411	該当 なし	該当 なし	CAGTATCACTGTACTA	eekd ₁₀ kke	72	14751	14766	2102
						14822	14837	
						14893	14908	
						14952	14967	
						15012	15027	
						15084	15099	
						15156	15171	
						15227	15242	
						15299	15314	
						15358	15373	
						15418	15433	
						15490	15505	

【1 4 0 0】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 5】

						15562	15577	
						15620	15635	
						15692	15707	
						15822	15837	
						15894	15909	
						15952	15967	
548412	該当なし	該当なし	TAACAGTATCACTGTA	eekd ₁₀ kke	17	14754	14769	2103
						14825	14840	
						14896	14911	
						14955	14970	
						15015	15030	
						15087	15102	
						15159	15174	
						15230	15245	
						15302	15317	
						15361	15376	
						15421	15436	
						15493	15508	
						15565	15580	
						15623	15638	
						15695	15710	
						15825	15840	
						15897	15912	
						15955	15970	
548413	該当なし	該当なし	CTAACAGTATCACTGT	eekd ₁₀ kke	55	14755	14770	2104
						14826	14841	
						14897	14912	
						15016	15031	
						15088	15103	
						15231	15246	
						15303	15318	
						15422	15437	
						15494	15509	
						15624	15639	
						15826	15841	
						15956	15971	
548414	該当なし	該当なし	TCTAACAGTATCACTG	eekd ₁₀ kke	20	14756	14771	2105
						14827	14842	
						14898	14913	
						15017	15032	
						15089	15104	
						15232	15247	
						15304	15319	
						15423	15438	
						15495	15510	
						15625	15640	
						15827	15842	
						15957	15972	

【1 4 0 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 6】

548415	該当なし	該当なし	ATAACTCTAACAGTAT	eekd ₁₀ kke	0	14761	14776	2106
						14832	14847	
						14903	14918	
						15022	15037	
						15094	15109	
						15237	15252	
						15309	15324	
						15428	15443	
						15500	15515	
						15630	15645	
						15832	15847	
						15962	15977	
548416	該当なし	該当なし	CTATAACTCTAACAGT	eekd ₁₀ kke	9	14763	14778	2107
						14834	14849	
						14905	14920	
						15024	15039	
						15096	15111	
						15239	15254	
						15311	15326	
						15430	15445	
						15502	15517	
						15632	15647	
						15834	15849	
						15964	15979	
548417	該当なし	該当なし	ACTGTCCTATAACTCT	eekd ₁₀ kke	24	14769	14784	2108
						14840	14855	
548418	該当なし	該当なし	TATATCACTGTCCTAT	eekd ₁₀ kke	39	14775	14790	2109
						14846	14861	
						15180	15195	
						15716	15731	
						16164	16179	
548419	該当なし	該当なし	CCTATATCACTGTCCT	eekd ₁₀ kke	52	14777	14792	2110
						14848	14863	
						15182	15197	
						15718	15733	
548420	該当なし	該当なし	TCCTATATCACTGTCC	eekd ₁₀ kke	58	14778	14793	2111
						14849	14864	
						15183	15198	
						15719	15734	
548421	該当なし	該当なし	CACTGTCCTATATCAC	eekd ₁₀ kke	56	14783	14798	2112
						14854	14869	
						14979	14994	
						15117	15132	
						15188	15203	
						15260	15275	
						15385	15400	
						15523	15538	
						15653	15668	

【1 4 0 2】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 7】

						15724	15739	
						15855	15870	
						15985	16000	
548422	該当 なし	該当 なし	GTATCACTGTCCTATA	eekd ₁₀ kke	69	14787	14802	2113
						14983	14998	
						15121	15136	
						15389	15404	
						15527	15542	
						15989	16004	
548423	該当 なし	該当 なし	AGTATCACTGTCCTAT	eekd ₁₀ kke	72	14788	14803	2114
						14984	14999	
						15050	15065	
						15122	15137	
						15390	15405	
						15456	15471	
						15528	15543	
						15990	16005	
548424	該当 なし	該当 なし	CAGTATCACTGTCCTA	eekd ₁₀ kke	90	14789	14804	2115
						14985	15000	
						15051	15066	
						15123	15138	
						15391	15406	
						15457	15472	
						15529	15544	
						15991	16006	
548425	該当 なし	該当 なし	AACAGTATCACTGTCC	eekd ₁₀ kke	90	14791	14806	2116
						14987	15002	
						15053	15068	
						15125	15140	
						15393	15408	
						15459	15474	
						15531	15546	
						15993	16008	
548426	該当 なし	該当 なし	TATAACAGTATCACTG	eekd ₁₀ kke	14	14794	14809	2117
						14990	15005	
						15056	15071	
						15128	15143	
						15161	15176	
						15363	15378	
						15396	15411	
						15462	15477	
						15534	15549	
						15567	15582	
						15697	15712	
						15899	15914	
						15996	16011	
548427	該当 なし	該当 なし	CTATAACAGTATCACT	eekd ₁₀ kke	24	14795	14810	2118
						14991	15006	

【1 4 0 3】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 8】

						15057	15072	
						15129	15144	
						15162	15177	
						15364	15379	
						15397	15412	
						15463	15478	
						15535	15550	
						15568	15583	
						15698	15713	
						15900	15915	
						15997	16012	
548428	該当 なし	該当 なし	TAACTATAACAGTATC	eekd ₁₀ kke	0	14798	14813	2119
						15060	15075	
						15132	15147	
						15165	15180	
						15466	15481	
						15538	15553	
						15571	15586	
						15701	15716	
						15772	15787	
						16000	16015	
548429	該当 なし	該当 なし	TATAACTATAACAGTA	eekd ₁₀ kke	0	14800	14815	2120
						15062	15077	
						15134	15149	
						15167	15182	
						15468	15483	
						15540	15555	
						15573	15588	
						15703	15718	
						15774	15789	
						16002	16017	
548430	該当 なし	該当 なし	CCTATAACTATAACAG	eekd ₁₀ kke	21	14802	14817	2121
						15064	15079	
						15169	15184	
						15470	15485	
						15542	15557	
						15575	15590	
						15705	15720	
						15776	15791	
						16004	16019	
548431	該当 なし	該当 なし	TACCTATAACTCTAAC	eekd ₁₀ kke	9	14908	14923	2122
						15027	15042	
						15099	15114	
						15242	15257	
						15314	15329	
						15433	15448	
						15505	15520	
						15635	15650	

10

20

30

40

【1 4 0 4】

50

【表 1 3 8 - 9】

						15837	15852	
						15967	15982	
548432	該当 なし	該当 なし	ACTGTACCTATAACTC	eekd ₁₀ kke	43	14912	14927	2123
						15031	15046	
						15246	15261	
						15318	15333	
						15437	15452	
						15509	15524	
						15639	15654	
						15841	15856	
						15971	15986	
548433	該当 なし	該当 なし	TATCACTGTACCTATA	eekd ₁₀ kke	33	14916	14931	2124
						15250	15265	
						15322	15337	
						15375	15390	
						15513	15528	
						15643	15658	
						15786	15801	
						15845	15860	
						15975	15990	
548434	該当 なし	該当 なし	ACAATATCACTGTACC	eekd ₁₀ kke	63	14920	14935	2125
						15326	15341	
						15790	15805	
						16063	16078	
						16141	16156	
548435	該当 なし	該当 なし	AACAATATCACTGTAC	eekd ₁₀ kke	19	14921	14936	2126
						15327	15342	
						15791	15806	
						16064	16079	
548436	該当 なし	該当 なし	ATATCACTGTACCTGT	eekd ₁₀ kke	8	14970	14985	2127
548437	該当 なし	該当 なし	TATATCACTGTACCTG	eekd ₁₀ kke	74	14971	14986	2128
548438	該当 なし	該当 なし	CTATATCACTGTACCT	eekd ₁₀ kke	38	14972	14987	2129
						15253	15268	
						15378	15393	
						15516	15531	
						15646	15661	
						15848	15863	
548439	該当 なし	該当 なし	CCTATATCACTGTACC	eekd ₁₀ kke	46	14973	14988	2130
						15254	15269	
						15379	15394	
						15517	15532	
						15647	15662	
						15849	15864	

【 1 4 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 8 - 1 0】

						15979	15994	
548440	該当 なし	該当 なし	CCTATAACAGTATCAC	eed ₁₀ kke	32	14992	15007	2131
						15365	15380	
						15398	15413	
548441	該当 なし	該当 なし	TCCTATAACAGTATCA	eed ₁₀ kke	42	14993	15008	2132
						15399	15414	
548442	該当 なし	該当 なし	TTCTATAACAGTATC	eed ₁₀ kke	17	14994	15009	2133
						15400	15415	
548443	該当 なし	該当 なし	GTTTCCTATAACAGTA	eed ₁₀ kke	12	14996	15011	2134
						15402	15417	
548444	該当 なし	該当 なし	CTATGTCACGTACCT	eed ₁₀ kke	43	15038	15053	2135
						15444	15459	
548445	該当 なし	該当 なし	CCTATGTCACGTACC	eed ₁₀ kke	62	15039	15054	2136
						15445	15460	
548446	該当 なし	該当 なし	TCCTATGTCACGTAC	eed ₁₀ kke	16	15040	15055	2137
						15446	15461	
548447	該当 なし	該当 なし	CACTGTCCTATGTCAC	eed ₁₀ kke	59	15045	15060	2138
						15451	15466	
548448	該当 なし	該当 なし	TCACTGTCCTATGTCA	eed ₁₀ kke	61	15046	15061	2139
						15452	15467	
548449	該当 なし	該当 なし	ATCACTGTCCTATGTC	eed ₁₀ kke	62	15047	15062	2140
						15453	15468	
548450	該当 なし	該当 なし	CTACCTATAACTCTAA	eed ₁₀ kke	0	15100	15115	2141
548451	該当 なし	該当 なし	GTCCTATAACTATAAC	eed ₁₀ kke	0	15171	15186	2142
						15577	15592	
						15707	15722	
						16006	16021	
						16077	16092	
						16102	16117	
						16155	16170	
548452	該当 なし	該当 なし	TATATCACTGTACCTA	eed ₁₀ kke	65	15252	15267	2143
						15377	15392	
						15515	15530	
						15645	15660	
						15847	15862	
						15977	15992	
548453	該当 なし	該当 なし	TACCTATAACAGTATC	eed ₁₀ kke	12	15367	15382	2144
548454	該当 なし	該当 なし	ACTGTACCTATAACAG	eed ₁₀ kke	17	15371	15386	2145
548455	該当 なし	該当 なし	CACCGTACTAGTTTCC	eed ₁₀ kke	64	15757	15772	2146
548456	該当 なし	該当 なし	TATAACAGTATCACCG	eed ₁₀ kke	52	15768	15783	2147
548457	該当 なし	該当 なし	CTATAACAGTATCACC	eed ₁₀ kke	13	15769	15784	2148
548458	該当	該当	ACCTATAACTATAACA	eed ₁₀ kke	0	15777	15792	2149

【 1 4 0 6 】

【表 1 3 8 - 1 1】

	なし	なし				16249	16264	

【 1 4 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 9 - 1】

表 1 5 2

ISIS番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	配列	化学構造	% 阻害	配列番号 10 開始部位	配列番号 10 終止部位	配列番号
531231	該当なし	該当なし	TATCACTGTACTA GTTTCCT	eeeeed ₁₀ eeee	48	14744	14763	334
						14815	14834	
						14886	14905	
						14945	14964	
						15005	15024	
						15077	15096	
						15220	15239	
						15292	15311	
						15351	15370	
						15411	15430	
						15483	15502	
						15555	15574	
						15613	15632	
						15685	15704	
						15815	15834	
						15887	15906	
						15945	15964	
547747	該当なし	該当なし	TCACTGTACTAGT TTC	eekd ₁₀ kke	88	14746	14761	1267
						14817	14832	
						14888	14903	
						14947	14962	
						15007	15022	
						15079	15094	
						15222	15237	
						15294	15309	
						15353	15368	
						15413	15428	
						15485	15500	
						15557	15572	
						15615	15630	
						15687	15702	
						15817	15832	
						15889	15904	
						15947	15962	
548613	該当なし	該当なし	TGCCGGGATCGGT GGT	eekd ₁₀ kke	39	28510	28525	2150
						28589	28604	
548614	該当なし	該当なし	TGGTGCGGGATC GGT	eekd ₁₀ kke	0	28513	28528	2151
						28592	28607	
548615	該当なし	該当なし	TTGGTGCGGGAT CGG	eekd ₁₀ kke	10	28514	28529	2152
						28593	28608	

【1 4 0 8】

10

20

30

40

50

【表 1 3 9 - 2】

548616	該当なし	該当なし	ATTGGTGGCGGGA TCG	eekd ₁₀ kke	35	28515	28530	2153
548617	該当なし	該当なし	GATTGGTGGCGGG ATC	eekd ₁₀ kke	44	28516	28531	2154
548618	該当なし	該当なし	GTTGGTGGCGGGA TCG	eekd ₁₀ kke	18	28594	28609	2155
548619	該当なし	該当なし	GGTGGTGGCGGG ATC	eekd ₁₀ kke	19	28595	28610	2156
548620	該当なし	該当なし	TGGTTGGTGGCGG GAT	eekd ₁₀ kke	24	28596	28611	2157
548621	該当なし	該当なし	GAACACATCAGGG ATT	eekd ₁₀ kke	33	28638	28653	2158
548622	該当なし	該当なし	TTTCTATGGGCTT GAC	eekd ₁₀ kke	0	28669	28684	2159
548623	該当なし	該当なし	GCTGTCACTTAAG CCA	eekd ₁₀ kke	16	28862	28877	2160
548624	該当なし	該当なし	TCTAGGGCCACAC CTC	eekd ₁₀ kke	24	28892	28907	2161
548625	該当なし	該当なし	GTTCTACACACAG TAC	eekd ₁₀ kke	0	29014	29029	2162
548626	該当なし	該当なし	GCAGTATGTTCAA TCC	eekd ₁₀ kke	36	29202	29217	2163
548627	該当なし	該当なし	CCCACATGTACCA CCG	eekd ₁₀ kke	22	29235	29250	2164
548628	該当なし	該当なし	GTATGGCAGAGCC CCT	eekd ₁₀ kke	9	29285	29300	2165
548629	該当なし	該当なし	CCCATCTTGGGAC TTT	eekd ₁₀ kke	44	29341	29356	2166
548630	該当なし	該当なし	TGGTCCCAAATTG GAG	eekd ₁₀ kke	33	29387	29402	2167
548631	該当なし	該当なし	CTCACAATACTGA GCC	eekd ₁₀ kke	55	29421	29436	2168
548632	該当なし	該当なし	GGAGATATCAGGT GCA	eekd ₁₀ kke	45	29499	29514	2169
548633	該当なし	該当なし	CAAGGCATGTGTG CAC	eekd ₁₀ kke	41	29534	29549	2170
548634	該当なし	該当なし	GCCTTATTCTGTG CAA	eekd ₁₀ kke	0	29583	29598	2171
548635	該当なし	該当なし	AGGTGTGGCGCGC GCC	eekd ₁₀ kke	18	29853	29868	2172
548636	該当なし	該当なし	CTCTATACAGCTG GGC	eekd ₁₀ kke	5	30000	30015	2173
548637	該当なし	該当なし	GCTGATCTTCTAA TGC	eekd ₁₀ kke	38	30063	30078	2174
548638	該当なし	該当なし	CCTCATTGCTCCA CTA	eekd ₁₀ kke	26	30103	30118	2175

【1 4 0 9】

10

20

30

40

50

【表 1 3 9 - 3】

548639	該当なし	該当なし	TGGGAAGAACTA GCA	eekd ₁₀ kke	10	30159	30174	2176
548640	該当なし	該当なし	GAATGTTGCTGTC CCA	eekd ₁₀ kke	32	30194	30209	2177
548641	該当なし	該当なし	GCATCATGCTTAC TGC	eekd ₁₀ kke	23	30225	30240	2178
548642	該当なし	該当なし	GCGGCAGTAGTGA ATC	eekd ₁₀ kke	23	30288	30303	2179
548643	該当なし	該当なし	CCTACCTAATTCC TCC	eekd ₁₀ kke	0	30329	30344	2180
548644	該当なし	該当なし	AACTGGGCAGTCC TTC	eekd ₁₀ kke	14	30418	30433	2181
548645	該当なし	該当なし	CCAGCGCAATTCT GCT	eekd ₁₀ kke	8	30666	30681	2182
548646	該当なし	該当なし	CGTTTCCCTCAAC TCC	eekd ₁₀ kke	24	30750	30765	2183
548647	該当なし	該当なし	CACGGCAAGTCGC GGG	eekd ₁₀ kke	39	30790	30805	2184
548648	該当なし	該当なし	CAGTTGTATCCCT CCC	eekd ₁₀ kke	32	30852	30867	2185
548649	該当なし	該当なし	GCCTCTCAGACGG CAC	eekd ₁₀ kke	0	30906	30921	2186
548650	該当なし	該当なし	CTGATCCCACTTG CCC	eekd ₁₀ kke	21	30991	31006	2187
548651	該当なし	該当なし	AGTCTCTTTCCTA CCC	eekd ₁₀ kke	61	31030	31045	2188
548652	該当なし	該当なし	CCACGATGCTCTG GCC	eekd ₁₀ kke	65	31068	31083	2189
548653	該当なし	該当なし	TCGGCTCCTGGCA GCA	eekd ₁₀ kke	46	31111	31126	2190
548654	該当なし	該当なし	ACCATTCTGACC ATG	eekd ₁₀ kke	34	31151	31166	2191
548655	該当なし	該当なし	CCCGAGGTCACAT AAT	eekd ₁₀ kke	56	31416	31431	2192
548656	該当なし	該当なし	TTACAACAGACCC AGG	eekd ₁₀ kke	35	31497	31512	2193
548657	該当なし	該当なし	AGCAGGTATCTT CAC	eekd ₁₀ kke	26	31548	31563	2194
548658	該当なし	該当なし	GAAGTTCCTGTGT CTT	eekd ₁₀ kke	11	31593	31608	2195
548659	該当なし	該当なし	CCAACCTCTAAGG CTA	eekd ₁₀ kke	17	31721	31736	2196
548660	該当なし	該当なし	ATGCTTACCTTTC TCC	eekd ₁₀ kke	0	31955	31970	2197
548661	該当なし	該当なし	ACGACCCACTCCA TGT	eekd ₁₀ kke	18	32016	32031	2198

10

20

30

40

【1 4 1 0】

50

【表 1 3 9 - 4】

548662	該当なし	該当なし	TGCTTAAAAGTCT CCC	eekd ₁₀ kke	5	32155	32170	2199
548663	該当なし	該当なし	GCCCTAGAAGGGC CCA	eekd ₁₀ kke	20	32219	32234	2200
548664	該当なし	該当なし	GCGGGTGGTCTTG CAC	eekd ₁₀ kke	38	32245	32260	2201
548665	該当なし	該当なし	GCTCCCGGCCATT AGC	eekd ₁₀ kke	8	32312	32327	2202
548666	該当なし	該当なし	TCTCCATAGTGAG ACG	eekd ₁₀ kke	1	32342	32357	2203
548667	該当なし	該当なし	TGGCAAGCTACCT TCT	eekd ₁₀ kke	51	32384	32399	2204
548668	該当なし	該当なし	GGGAGCTTTCATG GCT	eekd ₁₀ kke	68	32506	32521	2205
548669	該当なし	該当なし	AATGCAGGCCAGC ATC	eekd ₁₀ kke	42	32541	32556	2206
548670	該当なし	該当なし	GAAAAGCCCTCCG AGC	eekd ₁₀ kke	15	32590	32605	2207
548671	該当なし	該当なし	CAACAATCCAAAG CCT	eekd ₁₀ kke	3	32674	32689	2208
548672	該当なし	該当なし	CCCCCAGAAATC CCA	eekd ₁₀ kke	40	32708	32723	2209
548673	該当なし	該当なし	GACCTTGCTTCCA TGT	eekd ₁₀ kke	40	32753	32768	2210
548674	該当なし	該当なし	GAGAGACGGCACC CTG	eekd ₁₀ kke	4	32829	32844	2211
548675	該当なし	該当なし	GGGAAGGTAGTGT TAC	eekd ₁₀ kke	8	32898	32913	2212
548676	該当なし	該当なし	GTGAATCAGAGCA GTG	eekd ₁₀ kke	63	32963	32978	2213
548677	該当なし	該当なし	TCACCTGTGAGTA ACC	eekd ₁₀ kke	40	33089	33104	2214
548678	該当なし	該当なし	GAGTTACCTTACA AGC	eekd ₁₀ kke	22	33232	33247	2215
548679	該当なし	該当なし	TCTCAAGCAGCCT ATT	eekd ₁₀ kke	0	33267	33282	2216
548680	該当なし	該当なし	GCCCCTCTTAAAT AGC	eekd ₁₀ kke	9	33446	33461	2217
548681	該当なし	該当なし	GATATCATCATCC CAA	eekd ₁₀ kke	22	33513	33528	2218
548682	該当なし	該当なし	GTATCCCCTTTTC TAT	eekd ₁₀ kke	0	33556	33571	2219
548683	該当なし	該当なし	AGTATCTCATGTG CCT	eekd ₁₀ kke	46	33581	33596	2220
548684	該当なし	該当なし	CAAGACCTTGCTT GCC	eekd ₁₀ kke	24	33658	33673	2221

【1 4 1 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3 9 - 5】

548685	該当なし	該当なし	TAGTCCACTACAC AGC	eekd ₁₀ kke	24	33802	33817	2222
548686	該当なし	該当なし	ACGACAATGGGAT TCA	eekd ₁₀ kke	0	33844	33859	2223
548687	該当なし	該当なし	GAATCTCCCTGAG TCA	eekd ₁₀ kke	20	33888	33903	2224
548688	該当なし	該当なし	TAGAGGGATCCCA GGA	eekd ₁₀ kke	0	34416	34431	2225
548689	該当なし	該当なし	CCAGGTGCAGCAC GGA	eekd ₁₀ kke	12	34483	34498	2226

10

【1 4 1 2】

実施例 1 1 7 : H e p a R G (商標) 細胞中のヒト P K K の用量依存的アンチセンス阻害 P K K m R N A の有意な *i n v i t r o* 阻害を表す上記の試験からギャップマーを選択し、H e p a R G (商標) 細胞中で、様々な用量で試験を行った。ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 個の細胞密度で細胞を播種し、0 . 1 2 μ M 、 0 . 3 7 μ M 、 1 . 1 1 μ M 、 3 . 3 3 μ M 及び 1 0 . 0 0 μ M の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。約 1 6 時間処理を行った後、R N A を細胞から単離し、P K K m R N A レベルを定量的リアルタイム P C R で測定した。ヒト P K K プライマープローブセット R T S 3 4 5 4 を使用して、m R N A レベルを測定した。P K K m R N A レベルを R I B O G R E E N (登録商標) によって測定したときの総 R N A 含量に従って調整した。同様の培養条件を有する一連の実験で、アンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を行った。各実験の結果は、以下に示す別個の表に表す。結果は、未処理の対照細胞に対する P K K の阻害率 (%) として表す。

20

【1 4 1 3】

各オリゴヌクレオチドの半数阻害濃度 (I C 5 0) も表す。P K K m R N A レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞で、用量依存的に有意に減少した。

【1 4 1 4】

30

40

50

【表 1 4 0】

表 1 5 3

ISIS 番号	0. 12 μ M	0. 37 μ M	1. 11 μ M	3. 33 μ M	10. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
486847	0	34	48	71	87	1. 1
530933	15	13	42	67	66	1. 7
530959	12	27	53	80	94	0. 9
530965	8	5	63	83	91	0. 8
530967	30	36	48	82	91	0. 7
530970	1	0	66	76	84	1. 0
530971	12	40	52	66	70	1. 3
530988	0	25	54	86	78	0. 9
530992	0	50	63	83	80	0. 7
531002	6	28	58	82	86	0. 9
531004	0	14	25	71	84	2. 1
531005	14	28	61	73	77	0. 9
531022	0	0	32	62	77	2. 2
531078	10	27	54	69	92	1. 1
531231	23	30	76	89	94	0. 6

10

20

【1 4 1 5】

【表 1 4 1】

表 1 5 4

ISIS 番号	0. 12 μ M	0. 37 μ M	1. 11 μ M	3. 33 μ M	10. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531026	23	26	49	75	85	1. 0
531055	3	28	64	76	81	0. 9
531069	19	39	48	76	83	0. 9
531071	23	37	56	83	83	0. 7
531110	14	29	49	76	85	1. 1
531121	0	13	47	69	79	1. 5
531123	14	43	51	71	64	0. 9
531172	0	16	37	60	60	2. 1
531198	0	35	62	76	60	0. 8
531231	18	0	36	76	84	2. 0
531232	15	26	40	62	76	1. 7
531233	17	27	50	77	84	1. 0
531234	24	21	47	72	82	1. 4
531235	27	55	62	84	95	0. 4
531236	4	28	59	85	93	0. 8

30

40

【1 4 1 6】

実施例 1 1 8 : H e p a R G (商 標) 細胞中のヒト P K K の用量依存的アンチセンス阻害 P K K m R N A の有意な *i n v i t r o* 阻害を表す上記の試験からギャップマーを選択し、H e p a R G (商 標) 細胞中で、様々な用量で試験を行った。ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 個の細胞密度で細胞を播種し、0 . 1 9 μ M 、 0 . 5 6 μ M 、 1 . 6 7 μ M 、 及び

50

5.00 μM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。約16時間処理を行った後、RNAを細胞から単離し、PKK mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRで測定した。ヒトPKKプライマープロブセットRTS3454を使用して、mRNAレベルを測定した。PKK mRNAレベルをRIBOGREEN（登録商標）によって測定したときの総RNA含量に従って調整した。同様の培養条件を有する一連の実験で、アンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を行った。各実験の結果は、以下に示す別個の表に表す。結果は、未処理の対照細胞に対するPKKの阻害率（％）として表す。「該当なし」は、特定の用量の特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、測定を実施しなかったことを示す。

【1417】

各オリゴヌクレオチドの半数阻害濃度（IC₅₀）も表す。PKK mRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞で、用量依存的に有意に減少した。

【1418】

【表142】

表155

ISIS 番号	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC ₅₀ (μM)
531231	32	30	73	89	0.5
546158	5	45	79	83	0.7
546188	36	55	81	83	0.4
546253	1	13	46	81	1.7
546254	51	66	80	91	0.2
546343	28	64	87	87	0.4
546825	46	73	86	88	0.2
546827	32	70	84	90	0.3
546828	39	58	87	93	0.3
546829	3	30	73	88	1.0
546846	36	45	71	82	0.5
547413	0	0	41	83	2.2
547423	37	50	92	90	0.4
547445	41	75	82	88	0.2
547456	12	67	66	80	1.0
547464	21	52	67	97	0.6
547564	51	48	82	90	0.2
547587	20	62	84	86	0.5
548758	41	47	82	94	0.4

【1419】

10

20

30

40

50

【表 1 4 3】

表 1 5 6

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	25	34	84	92	0. 7
546190	33	65	86	該当なし	0. 4
546208	16	45	79	91	0. 7
546216	62	69	88	88	0. 1
546255	32	35	78	87	0. 5
546268	56	50	82	93	0. 1
546301	25	50	53	87	0. 8
546849	23	35	83	91	0. 7
546852	19	40	78	85	0. 8
546889	23	54	78	91	0. 6
546916	43	71	79	89	0. 2
546967	20	39	76	71	0. 7
547273	44	69	87	87	0. 2
547276	35	44	71	77	0. 6
547335	8	52	85	92	0. 7
547340	46	79	88	該当なし	0. 2
547602	18	53	92	87	0. 5
547647	1	70	72	該当なし	0. 8
547694	0	29	67	90	1. 2

10

20

30

【1 4 2 0】

40

50

【表 1 4 4】

表 1 5 7

ISIS 番号	0.19 μ M	0.56 μ M	1.67 μ M	5.00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	58	64	77	98	0.1
546247	0	29	71	88	1.1
546251	31	60	99	89	0.5
546753	28	47	83	96	0.5
546826	17	40	87	97	0.7
546833	8	33	74	94	0.9
546854	23	39	83	94	0.6
546894	15	47	50	93	0.9
546897	40	56	71	95	0.4
546903	15	37	74	98	0.8
546986	31	49	77	89	0.5
547293	53	57	80	86	0.2
547298	32	61	74	90	0.4
547364	38	47	54	89	0.6
547373	20	7	49	86	1.1
547426	19	50	84	93	0.6
547454	19	40	58	92	0.9
547617	52	66	77	93	0.2
548770	26	54	77	91	0.5

10

20

【1 4 2 1】

30

40

50

【表 1 4 5 - 1】

表 1 5 8

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	34	47	72	該当なし	0. 5
546214	0	0	68	85	1. 3
546304	0	6	51	71	2. 1
546739	35	55	57	79	0. 6
546832	19	38	70	95	0. 8
546847	39	57	75	89	0. 4
546855	18	7	30	82	2. 2
546877	0	19	75	80	1. 3
546939	1	66	86	90	0. 6
547349	0	8	66	76	1. 6
547360	8	27	76	76	0. 8
547368	0	0	31	80	2. 5
547483	0	9	49	71	2. 1
547575	0	34	82	93	1. 1
547618	0	0	73	98	1. 3
547622	0	47	79	90	0. 9
547637	10	21	36	82	1. 8
547731	0	0	17	56	5. 0
548752	0	0	51	90	1. 9

【 1 4 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 5 - 2】

表 1 5 9

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	21	45	67	96	0. 7
546195	34	51	79	92	0. 5
546198	7	3	45	92	1. 3
546287	0	15	39	89	1. 7
546358	0	19	71	80	1. 3
546403	0	20	37	41	>5. 0
546410	13	43	52	75	1. 2
546412	0	1	61	62	2. 3
546429	6	10	44	69	2. 3
546834	1	0	30	83	2. 3
547006	0	0	54	77	1. 5
547294	28	59	87	86	0. 4
547337	23	41	55	79	1. 0
547514	18	8	51	80	1. 9
547584	26	34	76	86	0. 7
547585	42	57	70	95	0. 4
547615	20	26	41	84	1. 4
547636	0	24	79	94	1. 1
548744	14	35	63	83	1. 0

【 1 4 2 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 6】

表 1 6 0

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	21	39	90	97	0. 6
546232	49	50	94	97	0. 2
546248	25	66	87	93	0. 4
546835	9	35	68	93	0. 9
546848	0	18	91	97	1. 0
546853	47	64	84	該当なし	0. 2
546870	35	42	80	95	0. 5
546872	32	33	82	94	0. 4
546876	0	50	85	95	0. 8
547275	34	66	82	95	0. 3
547341	36	58	91	95	0. 3
547366	0	45	68	91	1. 2
547453	25	40	54	92	0. 8
547457	41	65	80	85	0. 3
547616	26	50	72	89	0. 6
547632	44	47	81	97	0. 6
547633	12	46	78	該当なし	0. 7
547718	36	12	69	74	1. 6
548757	18	49	82	93	0. 6

【 1 4 2 4】

10

20

30

40

50

【表 1 4 7】

表 1 6 1

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	6	38	74	95	0. 8
546291	22	32	34	72	2. 0
546310	0	36	56	80	1. 3
546896	0	45	82	97	0. 8
546980	0	18	29	80	2. 2
547009	0	9	21	63	3. 6
547019	0	6	54	86	1. 6
547277	2	32	34	62	2. 8
547288	0	0	0	38	>5. 0
547374	0	15	24	44	>5. 0
547493	0	26	64	77	1. 3
547520	0	25	66	64	1. 1
547712	0	5	21	62	3. 8
547722	0	15	32	73	2. 4
547728	0	2	16	61	4. 4
547780	0	10	36	55	3. 9
548743	25	57	73	88	0. 5
548753	0	23	49	84	1. 5
548756	0	4	16	86	>5. 0

【 1 4 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 8】

表 1 6 2

ISIS 番号	0. 19 μ M	0. 56 μ M	1. 67 μ M	5. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	25	55	89	97	0. 5
546188	27	69	88	97	0. 4
546216	23	78	95	98	<0. 2
546254	40	63	84	95	0. 3
546268	0	71	92	92	0. 5
546343	37	32	83	95	0. 4
546825	38	82	該当なし	99	0. 2
546827	23	74	98	96	0. 4
546828	0	64	89	97	0. 2
546846	26	49	85	該当なし	0. 5
546967	22	45	74	92	0. 7
547273	0	60	82	83	0. 6
547340	34	84	96	該当なし	0. 3
547423	78	92	該当なし	該当なし	<0. 2
547445	80	87	98	91	<0. 2
547564	46	66	90	97	0. 2
547587	38	64	91	97	0. 3
547602	1	9	52	93	1. 4
548758	0	72	79	該当なし	0. 6

【 1 4 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 4 9】

表 1 6 3

ISIS 番号	0.19 μ M	0.56 μ M	1.67 μ M	5.00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	7	39	56	97	1.0
546190	21	34	76	98	0.7
546208	5	33	70	97	0.9
546251	19	45	91	97	0.6
546255	5	39	82	96	0.8
546739	4	62	84	86	0.6
546753	17	31	70	91	0.9
546849	13	45	84	98	0.7
546889	25	9	73	92	1.4
546897	16	17	69	97	0.8
546916	0	27	73	97	1.0
546986	7	28	69	86	1.1
547276	6	3	53	68	2.2
547293	0	45	65	70	1.3
547298	0	12	67	87	1.7
547335	0	13	73	95	1.3
547426	18	35	80	95	0.7
547617	17	37	79	98	0.7
548770	9	0	61	92	1.7

【1 4 2 7】

10

20

30

40

50

【表 150】

表 164

ISIS 番号	0.19 μ M	0.56 μ M	1.67 μ M	5.00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
531231	6	56	68	97	0.8
546195	0	27	91	94	0.9
546232	0	74	95	96	0.2
546248	0	59	73	89	0.8
546832	36	49	85	97	0.4
546847	14	44	83	95	0.7
546853	4	49	74	92	0.8
546870	36	34	61	91	1.0
546872	42	13	59	99	1.4
546896	35	60	83	該当なし	0.4
546939	16	71	96	95	0.4
547275	56	16	80	86	1.2
547294	4	70	84	91	0.6
547341	45	44	81	95	0.6
547457	33	42	70	83	0.6
547584	0	21	64	92	1.3
547585	0	46	89	93	0.8
547632	0	0	63	91	1.6
548743	22	47	74	96	0.6

【1428】

実施例 119: HepaRG (商標) 細胞中のヒト PKK の用量依存的アンチセンス阻害
 PKK mRNA の有意な *in vitro* 阻害を表す上記の試験のギャップマーを選択し、HepaRG (商標) 細胞中で様々な用量で試験を行った。ウェルあたり 20,000 個の細胞密度で細胞を播種し、0.11 μ M、0.33 μ M、1.00 μ M、及び 3.00 μ M の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。約 16 時間処理を行った後、RNA を細胞から単離し、PKK mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR で測定した。ヒト PKK プライマープローブセット RTS3454 を使用して、mRNA レベルを測定した。PKK mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) によって測定したときの総 RNA 含量に従って調整した。同様の培養条件を有する一連の実験でアンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を行った。各実験の結果は、以下に示す別個の表に表す。結果は、未処理の対照細胞に対する PKK の阻害率 (%) として表す。「該当なし」は、特定の用量の特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、測定を実施しなかったことを示す。

【1429】

各オリゴヌクレオチドの半数阻害濃度 (IC₅₀) も表す。PKK mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞で、用量依存的に有意に減少した。

【1430】

10

20

30

40

50

【表 1 5 1】

表 1 6 5

ISIS 番号	0. 11 μ M	0. 33 μ M	1. 00 μ M	3. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
547747	24	29	81	89	0. 4
547769	12	17	80	96	0. 6
547824	45	73	78	該当なし	0. 1
547835	44	27	53	79	0. 9
547843	0	52	80	91	0. 4
547857	36	66	77	93	0. 2
547870	0	44	80	97	0. 6
547943	33	70	87	90	0. 2
547946	0	47	74	該当なし	0. 5
547947	24	58	81	93	0. 3
547998	55	73	91	91	0. 1
548004	24	47	80	92	0. 3
548010	0	11	49	64	1. 4
548047	50	62	76	95	0. 1
548147	59	94	80	該当なし	0. 0
548338	41	58	79	95	0. 2
548348	19	46	67	91	0. 4
548409	21	60	90	93	0. 3
548557	5	47	82	95	0. 4

【1 4 3 1】

10

20

30

40

50

【表 1 5 2】

表 1 6 6

ISIS 番号	0. 11 μ M	0. 33 μ M	1. 00 μ M	3. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
547747	8	61	90	92	0. 3
547807	26	71	61	94	0. 4
547922	67	75	81	92	0. 0
547927	56	64	92	88	0. 1
547948	60	80	88	97	0. 0
547979	56	58	94	97	0. 1
548005	53	49	71	95	0. 4
548024	28	57	84	82	0. 3
548043	14	60	90	92	0. 3
548055	43	57	50	88	0. 3
548106	53	54	82	94	0. 1
548109	50	92	79	85	0. 1
548155	49	50	70	81	0. 3
548180	11	59	71	88	0. 4
548278	3	59	78	93	0. 4
548343	61	67	88	92	0. 0
548558	53	61	78	95	0. 1
548570	20	40	70	94	0. 4
548583	43	46	93	88	0. 2

【 1 4 3 2】

10

20

30

40

50

【表 1 5 3】

表 1 6 7

ISIS 番号	0. 11 μ M	0. 33 μ M	1. 00 μ M	3. 00 μ M	IC ₅₀ (μ M)
547747	3	44	72	90	0. 5
547849	36	52	67	該当なし	0. 3
547851	16	46	83	該当なし	0. 4
547859	29	56	83	78	0. 3
547862	26	71	69	該当なし	0. 3
547877	29	66	83	該当なし	0. 2
547942	25	51	91	該当なし	0. 3
547997	39	68	該当なし	82	0. 2
548046	7	35	64	77	0. 7
548048	49	66	86	92	0. 1
548061	26	61	59	該当なし	0. 4
548070	26	35	48	63	1. 1
548125	33	50	81	73	0. 3
548195	5	23	61	76	0. 8
548265	47	69	78	67	0. 1
548410	31	58	85	82	0. 2
548424	17	67	86	72	0. 3
548425	41	57	68	80	0. 2
548547	30	41	76	90	0. 4

【1 4 3 3】

10

20

30

40

50

【表 1 5 4】

表 1 6 8

ISIS番号	0.11 μM	0.33 μM	1.00 μM	3.00 μM	IC ₅₀ (μM)
547747	16	59	85	96	0.3
547808	19	22	48	71	1.1
547861	7	40	75	84	0.5
548069	6	0	27	66	1.9
548128	14	29	49	66	1.1
548170	0	8	26	65	2.0
548174	20	18	29	62	2.0
548197	33	37	51	75	0.8
548201	0	7	70	85	0.8
548217	22	24	54	71	0.9
548220	0	0	0	6	>3
548247	16	50	62	82	0.5
548422	0	32	71	93	0.7
548479	2	52	82	97	0.4
548486	20	48	77	92	0.4
548521	21	0	3	1	>3
548655	0	0	8	33	>3
548667	0	37	73	86	0.7
548668	10	30	61	84	0.7

【1 4 3 4】

実施例 1 2 0：トランスジェニックマウスにおけるヒト P K K を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性

ヒト K L K B 1 遺伝子配列の 3 7 , 3 9 0 塩基対フラグメント（染色体 4：位置 1 8 7 1 4 8 6 7 2 - 1 8 7 1 7 9 6 2 5、寄託番号：NC_000004.11）を含むトランスジェニックマウスは、上述の試験から選択した I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置を行い、このモデルにおける有効性を評価した。

【1 4 3 5】

処置

トランスジェニックマウスの群に、I S I S 5 4 6 2 3 2、I S I S 5 4 6 2 5 1、I S I S 5 4 6 2 5 4、I S I S 5 4 6 3 4 3、I S I S 5 4 6 8 2 8、I S I S 5 4 7 4 5 5、I S I S 5 4 7 4 5 7、I S I S 5 4 7 9 2 7、及び I S I S 5 4 8 0 4 8 を、2.5 mg/kg/週、5.0 mg/kg/週、10 mg/kg/週または 20 mg/kg/週で、3 週間週に 2 回、皮下注射した。トランスジェニックマウスの 1 つの群には、P B S を 3 週間皮下注射した。最後の投与から 4 8 時間後にマウスを安楽死させ、次の分析のために臓器及び血漿を採取した。

【1 4 3 6】

RNA 分析

I S I S オリゴヌクレオチドの標的の減少への効果を評価するために、ヒト P K K のリアルタイム P C R 分析のために、RNA を肝組織から抽出した。結果は、P B S 対照に対する P K K mRNA の阻害率 (%) として表す。表 1 6 9 に示すように、I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理は、P B S 対照に比べ、P K K mRNA が有意

に減少した。

【 1 4 3 7 】

【表 1 5 5】

表 1 6 9

P B S 対照に対するトランスジェニックマウスの肝中の P K K m R N A の阻害率 (%)

ISIS 番号	用量	%阻害
547927	20	71
	10	93
	5	52
	2.5	35
547455	20	62
	10	45
	5	69
	2.5	0
546232	20	84
	10	30
	5	53
	2.5	57
546254	20	83
	10	84
	5	55
	2.5	31
546343	20	86
	10	66
	5	該当なし
	2.5	46
548048	20	80
	10	72
	5	77
	2.5	7
546828	20	83
	10	32
	5	62
	2.5	77
546251	20	79
	10	66
	5	51
	2.5	13
547457	20	62
	10	45
	5	69
	2.5	0

【 1 4 3 8 】

タンパク質の分析

すべての群で血漿 P K K タンパク質レベルを評価した。結果は、P B S 対照に対する P K K タンパク質の阻害率 (%) として表す。表 1 7 0 に示すように、I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処理は、P B S 対照に比べて、P K K タンパク質レベルが有意に減少した。

【 1 4 3 9 】

【表 1 5 6】

表 1 7 0

トランスジェニックマウスにおける P B S 対照に対する P K K タンパク質レベルの減少率

ISIS 番号	用量	%阻害
547927	20	80
	10	該当なし
	5	21
	2.5	25
547455	20	78
	10	32
	5	0
	2.5	0
546232	20	79
	10	33
	5	6
	2.5	0
546254	20	76
	10	51
	5	36
	2.5	0
546343	20	79
	10	38
	5	該当なし
	2.5	0
548048	20	98
	10	89
	5	70
	2.5	23
546828	20	93
	10	36
	5	25
	2.5	0
546251	20	69
	10	52
	5	30
	2.5	22
547457	20	60
	10	31
	5	4
	2.5	0

【1 4 4 0】

実施例 1 2 1：カニクイザルにおけるヒト P K K を標的とする I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

上述の試験から選択した I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで、カニクイザルに処置を行った。アンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性と耐容性を評価した。試験対象のヒトアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アカゲザルのゲノム配列（ヌクレオチド 2 3 5 8 0 0 0 ～ 2 3 9 1 0 0 0 を切り捨てられ、配列番号 1 8 として本明細書で示された G E N B A N K 寄託番号 NW_0 0 1 1 1 8 1 6 7. 1）と交差反応性であった。配列番号 1 8 に対する各オリゴヌクレオチドの標的開始部位を、表 1 7 1 に表す。「ミスマッチ」

は、オリゴヌクレオチドがアカゲザルの配列とミスマッチするヌクレオチドの数を示している。ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザルの配列との間の相補性が大きいほど、ヒトオリゴヌクレオチドがアカゲザルの配列と交差反応する可能性が大きい。「該当なし」は、オリゴヌクレオチドが、アカゲザルの配列と3つより多いミスマッチがあることを示している。

【1441】

【表157】

表171

配列番号18と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド

ISIS 番号	標的開 始部位	ミスマ ッチ	配列	化学構造	配列番号
547927	22059	1	ATGGTCCGACACACAA	Deoxy, MOE and cEt	1548
546232	該当なし	該当なし	AGGAACTTGGTGTGCCACTT	5-10-5 MOE	526
547455	27391	0	ATATCATGATTCCTTCTGA	5-10-5 MOE	657
546254	23858	1	TGCAAGTCTCTGGCAAACA	5-10-5 MOE	570
546343	30532	0	CCCCCTTCTTATAGCCAGC	5-10-5 MOE	705
548048	27397	0	CGATATCATGATTCCTTCTGA	Deoxy, MOE and cEt	1666
546828	13632	1	ACAGTATCACTGTACTAGTT	5-10-5 MOE	904
546251	23846	0	GGCAAACATTCACCTCTTA	5-10-5 MOE	566
547457	27397	0	AAGGCGATATCATGATTCCTTCTGA	5-10-5 MOE	660

【1442】

処置

試験を実施する前に、サルを30日間隔離し、その間に健康全般を毎日観察した。サルは2～4歳で、体重は2～4kgであった。4匹のランダムに割り付けられた雄のカニクイザルの10の群に、ISISオリゴヌクレオチドまたはPBSを皮下注射した。試験の第1週に4つの用量からなる投与計画（loading regimen）（1、3、5、7日目）で、40mg/kgの用量のPBS溶液またはISISオリゴヌクレオチドを最初に投与し、次に14日目（2～13週）に、週に1回の維持投与計画（maintenance regimen）を開始した。背中4部位に時計回りに、1用量につき1部位、皮下注射を行った。注射部位は、ケタミンで鎮静させながら、いれずみで印をつけ、最小3cmの間隔を置いた。

【1443】

試験期間中、サルの病気または苦痛の兆候を最小1日1回観察した。処置、外傷または病気によるわずかな痛みまたは苦痛を示したサルは、すぐに担当の獣医師と試験責任者に報告した。健康状態が良くないサルや瀕死の状態のサルは、さらなるモニタリングと可能な安楽死をすることにした。例えば、ISIS 547445で処理した2匹のサルは、物静かな行動、側臥位、刺激に対する反応の喪失、呼吸の減少があったために安楽死させた。実施例に記述のプロトコルは、Institutional Animal Care and Use Committee（IACUC）によって承認された。

【1444】

標的の減少

RNA分析

87または88日目、最後の投与から48時間後に、プライマープロベセットRTS 3455（配列番号23として本明細書で設計した順方向配列CCTGTGTGGAGGGTCACTCA、配列番号24として本明細書で設計した逆方向配列CCACTATA GATGCGCCAAACATC、配列番号25として本明細書で設計したプローブ配列

CCC ACT G C T T T G A T G G G C T T C C C) を使用して、P K K のリアルタイム P C R 分析のために、R N A を肝組織から抽出した。得られたものはハウスキーピング遺伝子シクロフィリンに正規化した。結果を P B S 対照に対する P K K m R N A の阻害率 (%) として表す。表 1 7 2 に示すように、I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置によって、P B S 対照に比べて、P K K m R N A が有意に減少した。

【1 4 4 5】

【表 1 5 8】

表 1 7 2

カニクイザルにおける P B S 対照と比較した P K K m R N A の阻害率 (%)

ISIS 番号	%阻害
546232	88
546251	90
546254	88
546343	74
546828	45
547455	90
547457	89
547927	54
548048	95

10

20

【1 4 4 6】

タンパク質分析

約 0.9 mL の血液を、投与前、1 7 日目、3 1 日目、4 5 日目、5 9 日目、7 3 日目の各時間に、すべての対象動物から採取し、3.2% のクエン酸ナトリウムを含む管に置いた。管を遠心分離 (室温で 1 0 分間 3 0 0 0 回転) にかけて、血漿を得た。血漿中の P K K タンパク質レベルを E L I S A によって測定した。結果は表 1 7 3 に表し、P B S 対照レベルと比較した阻害率 (%) として表した。結果は、I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドが P K K タンパク質レベルを有意に減少させたことを示す。

30

【1 4 4 7】

【表 1 5 9】

表 1 7 3

対照レベルに対するカニクイザルの血漿中の P K K タンパク質レベルの減少 (%)

	17 日目	31 日目	45 日目	59 日目	73 日目
ISIS 546232	53	58	72	75	70
ISIS 546251	71	75	75	81	77
ISIS 546254	38	51	63	74	73
ISIS 546343	56	74	69	70	70
ISIS 546828	0	8	23	39	39
ISIS 547455	26	33	43	58	58
ISIS 547457	68	75	79	76	80
ISIS 547927	8	0	15	10	18
ISIS 548048	90	93	95	95	95

40

【1 4 4 8】

50

耐容性試験

肝機能

ISISオリゴヌクレオチドの肝機能への影響を評価するために、サルを一晩絶食にした。約1.5mLの血液試料を全試験群から採取した。血液は、血漿を分離するために抗凝固剤のない管に集めた。管を最短90分間室温に保管し、その後10分間、3,000回転で遠心分離にかけた。様々な肝機能マーカーのレベルをToshiba 120FR NEO化学分析器(Toshiba Co., Japan)を用いて測定した。結果は表174に表し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの予測の範囲を超えて、肝機能に影響することはなかった。

【1449】

【表160】

表174

カニクイザルの血漿中の肝機能マーカー

	アルブミン (g/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
PBS	4.2	48	60
ISIS 546232	4.1	63	140
ISIS 546251	3.7	51	58
ISIS 546254	3.8	68	54
ISIS 546343	4.3	49	76
ISIS 546828	3.7	75	67
ISIS 547455	3.8	56	61
ISIS 547457	4.0	54	52
ISIS 547927	4.2	59	61
ISIS 548048	4.2	44	47

【1450】

血液学

カニクイザルの体内のISISオリゴヌクレオチドが血液学的数値に及ぼす影響を評価するために、約1.2mLの血液試料を、投与前、87日目または88日目に、試験対象の動物それぞれから採取し、K₂-EDTAを含む管に保管した。試料は、赤血球細胞(RBC)数、白血球細胞(WBC)数、血小板数、ヘモグロビン含有量、ヘマトクリットについて、ADVIA 2120i血液学的検査器(SIEMENS、USA)を用いて分析した。分析データを表175に表す。

【1451】

データによると、この投与では、オリゴヌクレオチドの大部分が、アンチセンスオリゴヌクレオチドの予測の範囲を超えて、血液学的数値に変化を及ぼさなかった。

【1452】

【表 1 6 1】

表 1 7 5

カニクイザルの血液学値

	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	血小板 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	ヘモグロビン (g/dL)	HCT (%)
PBS	5.4	458	13	13.1	43
ISIS 546232	5.4	391	11	12.9	42
ISIS 546251	5.7	419	8	12.9	43
ISIS 546254	5.3	436	11	12.4	41
ISIS 546343	5.5	373	14	12.6	42
ISIS 546828	6.0	408	11	12.9	43
ISIS 547455	4.5	448	13	10.2	34
ISIS 547457	6.4	367	10	13.8	45
ISIS 547927	5.2	461	45	12.5	41
ISIS 548048	5.9	393	11	13.4	44

【1 4 5 3】

腎機能

ISISオリゴヌクレオチドの腎機能に及ぼす影響を評価するために、サルを一晩絶食にした。約1.5 mLの血液試料を全試験群から採取した。血液は、血漿を分離するために、抗凝固剤のない管に集めた。管を最短90分間室温に保管し、10分間、3,000回転の遠心分離にかけた。Toshiba 120FR NEO化学分析器 (Toshiba Co., Japan) を使用して、BUNとクレアチニンのレベルを測定した。結果はmg/dLの単位で表176に表した。血漿の化学データによると、ISISオリゴヌクレオチドの大部分が、アンチセンスオリゴヌクレオチドの予測の範囲を超えて、腎機能に影響を及ぼさなかった。特に、ISIS 546254による処理は、サルの腎機能に関して良好な耐容性であった。

【1 4 5 4】

尿検査によっても腎機能を評価した。新鮮な尿を湿った氷の上の清潔なケージパン (cage pan) を使用して、すべての動物から採取した。新鮮な尿を集める前に、一晩食べ物を与えず、水だけを与えた。Toshiba 120FR NEO 自動化学分析器 (Toshiba Co., Japan) を用いて、総タンパク質レベルとクレアチニンレベルを測定し、クレアチニンに対するタンパク質の比を計算した。その結果を表177に表す。

【1 4 5 5】

10

20

30

40

50

【表 1 6 2】

表 1 7 6

カニクイザルの血漿BUNとクレアチニンレベル (mg/dL)

	BUN	クレアチニン
PBS	22. 8	0. 9
ISIS 546232	22. 7	1. 0
ISIS 546251	25. 4	1. 1
ISIS 546254	25. 7	0. 9
ISIS 546343	26. 2	1. 0
ISIS 546828	24. 7	0. 9
ISIS 547455	29. 4	0. 9
ISIS 547457	24. 3	1. 0
ISIS 547927	22. 3	1. 0
ISIS 548048	21. 9	0. 9

【 1 4 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 3】

表 1 7 7

カニクイザルの尿タンパク質／クレアチニンの比

	比
ISIS 546232	0.03
ISIS 546251	0.12
ISIS 546254	0.04
ISIS 546343	0.01
ISIS 546828	0.03
ISIS 547455	0.70
ISIS 547457	0.03
ISIS 547927	0.04
ISIS 548048	0.03
PBS	0.06

10

20

【1 4 5 7】

C 反応性タンパク質レベルの分析

カニクイザルの ISIS オリゴヌクレオチドの炎症効果を評価するために、サルを一晩絶食にした。約 1.5 mL の血液試料を全試験群から採取した。血液は、血漿を分離するために抗凝固剤のない管に集めた。管を最短 90 分間室温に保管し、10 分間、3,000 回転で遠心分離にかけた。C 反応性タンパク質 (CRP) は、肝臓で合成され、炎症のマーカーとして使用され、Toshiba 120FR NEO 化学分析器 (Toshiba Co., Japan) を使用して測定した。相補的 C3 も同様に測定し、データはベースライン値の割合として表す。結果は表 1 7 8 に表し、ISIS オリゴヌクレオチドによる処理が、サルに炎症を引き起こさなかったことを示している。

30

【1 4 5 8】

40

50

【表 1 6 4】

表 1 7 8

カニクイザルの血漿中のC反応性タンパク質及びC 3 レベル

	CRP (mg/dL)	C3 (ベー スライン の%)
PBS	0. 2	73
ISIS 546232	0. 5	50
ISIS 546251	0. 7	62
ISIS 546254	0. 8	61
ISIS 546343	0. 2	60
ISIS 546828	0. 6	56
ISIS 547455	1. 9	64
ISIS 547457	0. 3	53
ISIS 547927	0. 2	73
ISIS 548048	0. 2	69

【 1 4 5 9】

実施例 1 2 2：マウス初代培養肝細胞中のマウス P K K m R N A のアンチセンス阻害

マウス P K K 核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、P K K m R N A に及ぼす効果について *i n v i t r o* 試験を行った。ウェルあたり 1 0 , 0 0 0 細胞の密度で培養されたマウスの初代培養肝細胞に、サイトフェクチン試薬を使用して、1 2 . 5 n M、2 5 . 0 n M、5 0 . 0 n M、1 0 0 . 0 n M、及び 2 0 0 . 0 n M のアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理を行った後、R N A を細胞から単離し、マウス P K K m R N A レベルを、マウスプライマープローブセット R T S 3 3 1 3 (配列番号 2 2 2 8 として本明細書で設計した順方向配列 T G C C T G C T G T T C A G C T T T C T C、配列番号 2 2 2 9 として本明細書で設計した逆方向配列 T G G C A A A G T C C C T G T A A T G C T、配列番号 2 2 3 0 として本明細書で設計したプローブ配列 C G T G A C T C C A C C C A A A G A G A C A A A T A A A C G) を用いて、定量的リアルタイム P C R によって測定した。P K K m R N A レベルは、R I B O G R E E N によって測定したときの R N A 総含量に従って調整した。

【 1 4 6 0】

キメラのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーとして設計した。このギャップマーは長さが 2 0 ヌクレオチドであり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドから成り、それぞれ 5 ヌクレオシドを含むウイングによって、(5 ' 位と 3 ' 位の) 両側で隣り合っている。5 ' ウイングセグメント中の各ヌクレオシドと 3 ' ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは、2 ' - O - メトキシエチル修飾を有している。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体にわたりすべて、5 - メ

チルシトシンである。結果は、PKK mRNAレベルが用量依存的に有意に減少したことを示している。

【1461】

ある特定の例では、ISIS 482584 (GGCATATTGGTTTTTGGAAAT、配列番号2244)は、用量依存的にPKK mRNAを減少させ、84 nMの半数阻害濃度(IC50)を得た(表179参照)。ISIS 482584は、配列番号11 (GENBANK寄託番号NM_008455.2)に対して標的化され、標的開始部位1586と標的終止部位1605を有する。「標的開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「標的終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。

10

【1462】

【表165】

表179

ISIS 482584によるマウスのPKK mRNAレベルの用量依存的阻害

用量	%阻害
12.5 nM	0
25.0 nM	47
50.0 nM	27
100.0 nM	60
200.0 nM	82

20

【1463】

実施例123: BALB/cマウスにおけるPKK mRNAのアンチセンス阻害

PKK mRNAに対するISIS 482584の効果について、*in vivo*試験を行った。

【1464】

処置

雄BALB/cマウスの6つの群を、2.5 mg/kg、5.0 mg/kg、10.0 mg/kg、20.0 mg/kg、40.0 mg/kg、または80.0 mg/kgのISIS 482584を、3週間にわたって週に2回(週の用量は5.0 mg/kg、10.0 mg/kg、20.0 mg/kg、40.0 mg/kg、80.0 mg/kg、または160.0 mg/kg)、皮下投与をして処置した。BALB/cマウスの対照群を、PBSを3週間にわたって週に2回皮下投与して処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSの最後の投与から2日後に、10 mg/kgのキシラジンで混合した150 mg/kgのケタミンを腹腔内注射することによって、全群のマウスに麻酔をかけた。肝臓をRNA分析のために回収した。

30

【1465】

RNA分析

PKKのリアルタイムPCRを実施するために肝臓組織からRNAを抽出した。PKK mRNAレベルは、マウスプライマープローブセットを使用して測定した(配列番号2231として本明細書で設計した順方向配列ACAAGTGCAATTTTACAGACCAGAGTAC、配列番号2232として本明細書で設計した逆方向配列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT、配列番号2233として本明細書で設計したプローブ配列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC)。結果はPBS対照に対するPKKの阻害率(%)として表す。表180に示すように、ISIS 482584による処置は、PBS対照に比べ、PKK mRNAを用量依存的に有意に減少させた。

40

【1466】

50

【表 166】

表 180

BALB/c マウスの肝臓中の P K K mRNA の用量依存的減少

用量 (mg/kg/wk)	%阻害
5	3
10	42
20	68
40	85
80	91
160	94

10

【1467】

タンパク質分析

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを含む管に血漿を集めた。試料は、4～12%勾配 SDS-ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) で実行し、次にマウス P K K 抗体 (R & D Systems) による免疫ブロット法を実行した。ブロットを二次的フルオロフォア標識抗体 (L I - C O R) でインキュベートし、O d y s s e y I m a g e r (L I - C O R) に撮像した。結果は、P B S 対照に対する P K K の阻害率 (%) として表す。表 181 に示すように、I S I S 482584 の処置は、P B S 対照に比べ、P K K 血漿タンパク質を用量依存的に有意に減少させた。

20

【1468】

【表 167】

表 181

BALB/c マウスの血漿中の P K K タンパク質の用量依存的減少

用量 (mg/kg/wk)	%阻害
5	5
10	24
20	47
40	76
80	81
160	n. d.

30

n. d. = データなし

【1469】

実施例 124：血管浮腫マウスモデルにおけるマウス P K K のアンチセンス阻害の i n v i v o 効果

40

遺伝性血管浮腫 (H A E) は、局所的膨張及び皮下組織中の血管透過性の増加を特徴とする (M o r g a n, B. P. N. E n g l. J. M e d. 363: 581-83, 2010)。補体系のタンパク質である C 1 阻害因子の欠損によって引き起こされる。C 1 - I N H 欠損の確立されたマウスモデルと C a p t o p r i l 誘導性浮腫 (両者とも H A E の特徴である血管透過性を引き起こす) の 2 つのマウスモデルを本試験に使用した。血管透過性の回復は、高分子キニノゲン (H M W K) の血漿レベルの増加を伴う。

【1470】

最初のモデルでは、浮腫は血圧降下薬として知られている C a p t o p r i l による処置により誘発され、マウスの血管透過性を増加させ、遺伝性血管浮腫の病理を再現する。

50

【1471】

第二のモデルでは、浮腫は、マウスC1阻害因子mRNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであるISIS 461756による処置により誘発され、マウスの血管透過性を増加させ、遺伝性血管浮腫の病理を再現する。ISIS 461756（配列番号2245；AAAGTGGTTGATACCCCTGGG）は、NM_009776.3（配列番号2243）のヌクレオチド1730-1749標的とする5'-10-5MOEギャップマーである。

【1472】

PKKのアンチセンスオリゴヌクレオチド阻害因子であるHOE-140とISIS 482584の効果は、Captopril及び血管透過性のISIS 461756誘発性マウスモデルで評価した。マウス群のいくつかは、血管拡張と血管透過性をブロックする、ブラジキニンB2受容体の選択的アンタゴニストであるHOE-140で処理し、（Cruden and Newby, Expert Opin. Pharmacol. 9: 2383-90, 2008）。他のマウスはPKK mRNA発現を阻害するISIS 482584で処置した。HOE-140による処置効果を、ISIS 482584による処理効果と比較した。

【1473】

処置

このアッセイについての様々な処置群を表182に表す。

【1474】

群1は、PBSを4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した4匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。群1には他のいかなる処置も行わず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1475】

群2は、PBSを4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。処置期間の最後に、20µgのCaptoprilを腹腔内投与した。群2は、Captopril誘発性血管透過性のPBS対照群とした。

【1476】

群3は、PBSを4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。14日目に、C1阻害因子ISIS 461756を標的とする50mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、2週間にわたって週に2回腹腔内投与した。処置期間の最後に、20µgのCaptoprilを腹腔内投与した。群3は、CaptoprilとISIS 461756誘発性血管透過性についてのPBS対照群とした。

【1477】

群4は、PBSを4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。14日目に、C1阻害因子ISIS 461756を標的とする50mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、2週間にわたって週に2回腹腔内投与した。処置期間の最後に、20µgのCaptoprilを腹腔内投与した。その後、30µgのHOE-140も投与した。群4はHOE-140の血管透過性の阻害についての陽性対照とした。

【1478】

群5は、40mg/kgの対照オリゴヌクレオチドISIS 141923、マウス標的としては知られていない5'-10-5MOEギャップマー、（CCTTCCCTGAAGGTTCTCTC、配列番号2246）を、4週間にわたって週に2回皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。14日目に、C1阻害因子ISIS 461756を標的とする50mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドを皮下投与し、2週間にわたって週に2回腹腔内投与した。処置期間の最後に、20µgのCaptoprilを腹腔内投与した。群5はCaptoprilとISIS

10

20

30

40

50

4 6 1 7 5 6 誘発性血管透過性についての対照群とした。

【1 4 7 9】

群6は、40mg/kgのISIS 482584を4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。処理期間の最後に、20μgのCaptoprilを腹腔内投与した。群6は、PKK ASOのCaptopril誘発性血管透過性に対する影響を検討するための実験処置群とした。

【1 4 8 0】

群7は、40mg/kgのISIS 482584を4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した8匹のC57BL/6J-Tyrc-2Jマウスから成った。14日目に、C1阻害因子ISIS 461756を標的とする50mg/kgのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、2週間にわたって週に2回皮下投与した。処置期間の最後に、20μgのCaptoprilを腹腔内投与した。群7は、PKK ASOのCaptopril及びISIS 461756誘発性血管透過性に対する影響を検討するための実験処置群とした。

【1 4 8 1】

全群に30mg/kgのエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から30分後に、マウスを殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。血液試料は、心臓穿刺で採取した。

【1 4 8 2】

【表168】

表182

処置群

群番号	処置	Captopril	ISIS 461756	HOE-140
1. (N=4)	PBS	No	No	No
2. (N=8)	PBS	Yes	No	No
3. (N=8)	PBS	Yes	Yes	No
4. (N=8)	PBS	Yes	Yes	Yes
5. (N=8)	ISIS 141923	Yes	Yes	No
6. (N=8)	ISIS 482584	Yes	No	No
7. (N=8)	ISIS 482584	Yes	Yes	No

【1 4 8 3】

血管透過性の定量

足、結腸、耳及び腸から採取した組織は、別個にホルムアミドに一晩おき、エバンスブルーを浸出した。耳及び足の組織を含むホルムアミド溶液を55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD600nmで測定し、表183に表す。浮腫を表しているマウスにはより多くの染液を取り込み、高いOD値を示している。

【1 4 8 4】

表183に示すように、ISIS 482584の処置によって、Captoprilで処置したマウス（群6）とCaptoprilとISIS 461756で処置したマウス（群7）のマウスは、それぞれのPBS群（群2と3）に比べて、血管透過性を防いでいる。群6と7のマウスの血管透過性の測定値もまた、血管透過性はCaptoprilとISIS 461756で誘発された、対照オリゴヌクレオチドISIS 141923で処置したマウス（群5）に比べ、大部分の組織で減少した。両処置群（群6と7）の結腸と足の組織中の血管透過性の測定値は、PBSでのみ処置されたマウス（群1）で観

察されたときの基礎レベルと同等であった。ISIS 482584で処置したマウスの血管透過性の減少は、このアッセイで陽性対照であったブラジキニン2受容体アンタゴニスト、HOE 140で処置されたマウスに見られた血管透過性と同等であった。

【1485】

したがって、PKK mRNAのアンチセンス阻害は、HAEの徴候である血管透過性の治療と予防に利益をもたらす。

【1486】

【表169】

表183

血管透過性を測定するためのエバンスブルーのOD_{600nm}

群番号	処置	Captopril	ISIS 461756	HOE-140	結腸	腸	足	耳
1	PBS	No	No	No	0.26	0.16	0.11	0.02
2	PBS	Yes	No	No	0.49	0.29	0.12	0.07
3	PBS	Yes	Yes	No	0.49	0.34	0.11	0.12
4	PBS	Yes	Yes	Yes	0.14	0.18	0.07	0.09
5	ISIS 141923	Yes	Yes	No	0.44	0.29	0.14	0.08
6	ISIS 482584	Yes	No	No	0.27	0.30	0.07	0.14
7	ISIS 482584	Yes	Yes	No	0.21	0.34	0.07	0.06

【1487】

高分子キニノゲン (HMWK) の定量

血液試料からのHMWKのウエスタンブロット法を、図1に表す。

【1488】

図1に示すように、群1と2の試料は、群6と7に比べ、HMWKのレベルが低く、このことは血管透過性が群6と7では逆転していることを示している。図1ではまた、群1と2の試料は、群6と7に比べ、HMWK切断産物が増加している。したがって、HMWKの欠損は、HMWKのPKK切断によって、(ブラジキニン及びHkaを含む)切断産物に引き起こされる。

【1489】

実施例125：マウスにおけるマウスPKKのアンチセンス阻害が基礎の透過性及びCaptopril誘発性透過性に及ぼすin vivo効果

基礎の透過性は、ナイーブ、未処置のマウスに起こる血管透過性のレベルである。基礎またはCaptopril誘発性のいずれかの血管透過性の予防におけるISIS 482584の効果を評価した。

処置

【1490】

このアッセイの様々な処置群を表184に表す。

【1491】

群1は、8匹のマウスから成り、4週間にわたって週に2回、PBSを皮下に投与して処置した。群1に他のいかなる治療薬も投与せず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1492】

群2は、8匹のマウスから成り、4週間にわたって週に2回、PBSを皮下に投与して処置した。処理期間の最後に、20 µgのCaptoprilを腹腔内投与した。群2は

Captopril誘発性血管透過性についての陰性対照群とした。

【1493】

群3は、8匹のマウスから成り、4週間にわたって週に2回、PBSを皮下に投与して処置した。処置期間の最後に、30 μ gのHOE-140を腹腔内投与した。群3は基礎の血管透過性の阻害についての陽性対照とした。

【1494】

群4は、8匹のマウスから成り、4週間にわたって週に2回、PBSを皮下に投与して処置した。処置期間の最後に、20 μ gのCaptoprilを腹腔内投与した。また、30 μ gのHOE-140を腹腔内投与した。群4は、Captopril誘発性血管透過性の阻害についての陽性対照とした。

【1495】

群5は、8匹のマウスから成り、40mg/kgのISIS 482584を4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した。群5は、ISIS 482584の基礎の血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1496】

群6は、8匹のマウスから成り、40mg/kgのISIS 482584を4週間にわたって週に2回、皮下投与して処置した。処置期間の最後に、20 μ gのCaptoprilを腹腔内投与した。群6は、ISIS 482584のCaptopril誘発性血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1497】

全群に30mg/kgのエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から30分後に、マウスを殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。

【1498】

【表170】

表184

処置群

群番号	処置	Captopril	HOE-140
1. (N=8)	PBS	No	No
2. (N=8)	PBS	Yes	No
3. (N=8)	PBS	No	Yes
4. (N=8)	PBS	Yes	Yes
5. (N=8)	ISIS 482584	No	No
6. (N=8)	ISIS 482584	Yes	No

【1499】

血管透過性の定量

足、結腸、腸及び耳から採取した組織は、別個にホルムアミドに一晩おき、エバンスブルーを浸出した。足及び耳の組織を含むホルムアミド溶液を55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD600nmで測定し、表185に表す。浮腫を表しているマウスには染液をより多く取り込み、高いOD値を示している。

【1500】

表185に示すように、ISIS 482584で処置されたマウスは、PBS対照に比べ、血管透過性が減少した（群5対群1）。ISIS 482584での処置による血管透過性の減少は、HOE-140での処置（陽性対照とした群3）によって生じたもの

と同等であった。ISIS 482584で処置されたマウスは、PBS対照に比べ、大部分の組織でCaptopril誘発性血管透過性の減少を示した（群6対群2）。ISIS 482584での処置によるCaptopril誘発性血管透過性の減少は、HOE-140での処理（陽性対照とした群4）によって生じたものと同等であった。

【1501】

【表171】

表185

血管透過性を測定するためのエバンスブルー染色のOD_{600nm}

群番号	処置	Captopril	HOE-140	結腸	足	腸	耳
1	PBS	No	No	0.27	0.08	0.23	0.06
2	PBS	Yes	No	0.61	0.08	0.24	0.01
3	PBS	No	Yes	0.18	0.06	0.21	0.03
4	PBS	Yes	Yes	0.29	0.03	0.14	0.00
5	ISIS 482584	No	No	0.19	0.07	0.22	0.04
6	ISIS 482584	Yes	No	0.37	0.05	0.22	0.00

【1502】

実施例126：マウスPKKのアンチセンス阻害がCaptopril誘発性血管透過性に及ぼす用量依存的効果

ISIS 482584の用量を変化させたときのCaptopril誘発性血管透過性に与える効果を評価した。

【1503】

処置

このアッセイの様々な処置群は、表186に表す。

【1504】

群1は、4匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した。群1には他のいかなる治療薬も投与せず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1505】

群2は、8匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した。処置期間の最後に、20μgのCaptoprilを腹腔内投与した。群2は、Captopril誘発性血管透過性の対照群とした。

【1506】

群3は、4匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した。処置期間の最後に、20μgのCaptoprilを腹腔内投与した。また、30μgのIcatibant（HOE-140）を腹腔内投与した。群4は、Captopril誘発性血管透過性の阻害の陽性対照とした。

【1507】

群4、5、6、7、8及び9は、8匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回、それぞれにISIS 482584を2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg、または80mg/kg（週に5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg、80mg/kg、または160mg/kgに対応する）皮下投与した。処置期間の最後に、20μgのCaptoprilを腹腔内投与した。群4～9は、ISIS 482584の用量の変化がCaptopril誘発性血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1508】

全群に 30 mg / kg のエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から 30 分後に、マウスを 殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。血液試料は、心臓穿刺で採取した。

【1509】

【表172】

表186

処置群

群番号	処置	用量 (mg/kg/ 週)	Captopril	HOE-140
1. (N=4)	PBS	-	No	No
2. (N=8)	PBS	-	Yes	No
3. (N=4)	PBS	-	Yes	Yes
4. (N=8)	ISIS 482584	160	Yes	No
5. (N=8)	ISIS 482584	80	Yes	No
6. (N=8)	ISIS 482584	40	Yes	No
7. (N=8)	ISIS 482584	20	Yes	No
8. (N=8)	ISIS 482584	10	Yes	No
9. (N=8)	ISIS 482584	5	Yes	No

【1510】

血管透過性の定量化

採取した組織は、別個にホルムアミド溶液に一晩おき、エバンスブルーを浸出した。足及び耳の組織を含むホルムアミド溶液を 55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD 600 nmで測定し、表187に表す。浮腫を表しているマウスは染液をよりおおく取り込み、高いOD値を示している。

【1511】

表187に示すように、より高用量のISIS 482584（群4、5及び6）を投与されたマウスでは、対応するPBS対照群（群2）に比べ、Captopril誘発性血管透過性のレベルが減少した。これらの処置群（群4及び5）のマウスの血管透過性の減少は、血管透過性の基礎レベル（群1に示すように）ならびにHOE-140（群3）を投与されたマウスの血管透過性の基礎レベルと同等であった。

【1512】

10

20

30

40

50

【表 173】

表 187

血管透過性を測定するためのエバンスブルーのOD_{600nm}

群番号	処置	用量 (mg/kg)	Captopril	HOE-140	結腸	足	腸	耳
1	PBS	-	No	No	0.16	0.07	0.13	0.01
2	PBS	-	Yes	No	0.39	0.12	0.18	0.07
3	PBS	-	Yes	Yes	0.15	0.03	0.10	0.04
4	ISIS 482584	160	Yes	No	0.26	0.10	0.15	0.05
5	ISIS 482584	80	Yes	No	0.21	0.04	0.17	0.03
6	ISIS 482584	40	Yes	No	0.36	0.10	0.20	0.05
7	ISIS 482584	20	Yes	No	0.40	0.11	0.20	0.07
8	ISIS 482584	10	Yes	No	0.41	0.10	0.19	0.05
9	ISIS 482584	5	Yes	No	0.41	0.10	0.17	0.05

【1513】

血管漏出の定量

心臓穿刺によって採取された血液は、すぐに、氷冷した3倍体積のエタノールと混合した。溶液を4℃で20分間、15,000gの遠心分離にかけ、細胞片と沈殿した血漿タンパク質を取り除いた。10kDaのMWCOフィルターによる限外濾過によってエタノール抽出物をさらに精製した。エタノール抽出血漿溶液の色彩強度を、OD_{620nm}で測定した。結果は、PBS対照群1のOD値に対する増加率または減少率として、表188に表す。浮腫を発現しているマウスの組織は、血漿からより多くの染液を漏出しており、そのため、血管漏出の減少により、高いODを示す処置群に対し、ODが低いことが予想された。160mg/kg/週及び80mg/kg/週のISIS 482584を投与されたマウス（群4及び5）は、Captoprilを投与されたPBS陰性対照（群2）に比べ、血管漏出が低かった。群4及び5の結果は、HOE-140を投与された陽性群（群3）と同等であった。

【1514】

10

20

30

40

50

【表 174】

表 188

血管漏出を比較するための P B S 基礎対照と比較したときのエバンスブルーの OD_{620nm} の割合 (%)

群番号	処置	用量 (mg/kg)	Captopril	HOE-140	血漿
2	PBS	-	Yes	No	-43
3	PBS	-	Yes	Yes	5
4	ISIS 482584	160	Yes	No	91
5	ISIS 482584	80	Yes	No	40
6	ISIS 482584	40	Yes	No	-31
7	ISIS 482584	20	Yes	No	-26
8	ISIS 482584	10	Yes	No	-20
9	ISIS 482584	5	Yes	No	-23

【1515】

実施例 127：マウスにおけるマウス P K K のアンチセンス阻害が基礎透過性に及ぼす用量依存的効果

ISIS 482584 の用量を変化させたときの血管透過性に及ぼす効果を評価した。

【1516】

処置

このアッセイの様々な処置群は、表 189 に表す。

【1517】

群 1 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回 P B S を皮下投与して処置した。群 1 には他のいかなる治療薬も投与せず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1518】

群 2 は、4 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回 P B S を皮下投与して処置した。処置の最後に、30 μ g の H O E - 1 4 0 を腹腔内投与した。群 2 は基礎血管透過性の阻害についての陽性対照とした。

【1519】

群 3、4、5、6、7、及び 8 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回、それぞれに、ISIS 482584 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、または 80 mg/kg（週に 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg、または 160 mg/kg に対応する）皮下投与して処置した。群 4～9 は、ISIS 482584 の用量の変化が基礎血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1520】

全群に 30 mg/kg のエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から 30 分後に、マウスを 殺し、結腸、足、及び耳を回収し、透過性の欠損について検討した。血液試料は、心臓穿刺で採取した。

【1521】

【表175】

表189

処理群

群番号	処置	用量 (mg/kg/週)	HOE-140
1. (N=8)	PBS	–	No
2. (N=4)	PBS	–	Yes
3. (N=8)	ISIS 482584	160	No
4. (N=8)	ISIS 482584	80	No
5. (N=8)	ISIS 482584	40	No
6. (N=8)	ISIS 482584	20	No
7. (N=8)	ISIS 482584	10	No
8. (N=8)	ISIS 482584	5	No

【1522】

血管透過性の定量

足、結腸及び耳から採取した組織は、別個にホルムアミドに一晩おき、エバンスブルーを浸出した。足及び耳の組織を含むホルムアミド溶液を55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD600nmで測定し、表190に表す。高いOD値は高い透過性と関連している。

【1523】

表190に示すように、ISIS 482584を投与されたマウス（群3～8）の大部分の組織は、全ての用量で、PBS対照（群1）に比べ、基礎血管透過性が減少した。ISISオリゴヌクレオチド処置群の基礎血管透過性の減少は、HOE-140を投与された陽性対照群（群2）で示されたものと同等であった。

【1524】

10

20

30

40

50

【表 1 7 6】

表 1 9 0

血管透過性を測定するためのエバンスブルーのOD_{600nm}

群番号	処置	用量 (mg/kg/週)	HOE-140	結腸	足	耳
1	PBS	-	No	0.27	0.17	0.013
2	PBS	-	Yes	0.24	0.09	0.047
3	ISIS 482584	160	No	0.25	0.11	0.019
4	ISIS 482584	80	No	0.24	0.09	0.014
5	ISIS 482584	40	No	0.27	0.11	0.011
6	ISIS 482584	20	No	0.26	0.11	0.009
7	ISIS 482584	10	No	0.31	0.10	0.015
8	ISIS 482584	5	No	0.32	0.11	0.009

10

【1 5 2 5】

血管漏出の定量

心臓穿刺によって採取された血液は、すぐに、氷冷した3倍体積のエタノールと混合した。溶液は4℃で20分間、15,000gで遠心分離にかけ、細胞片と沈殿した血漿タンパク質を取り除いた。エタノール抽出物は、10kDaのMWCOフィルターによる限外濾過によってさらに精製した。エタノール抽出血漿溶液の色彩強度は、OD_{620nm}で測定した。結果は、群1PBS対照のOD値に対する増加率または減少率として表191に表す。処置群は、血管漏出の減少により高いOD値を表しうることが予想された。ISISオリゴヌクレオチド処置群のすべてのマウスが、PBS陰性対照に比べ、有意に血管漏出が減少した。

20

【1 5 2 6】

【表 1 7 7】

表 1 9 1

血管漏出を測定するためのPBS基礎対照と比較したときのエバンスブルーのOD_{620nm}の割合

群番号	処置	用量(mg/kg/週)	HOE-140	血漿
2. (N=8)	ISIS 482584	160	No	95
3. (N=8)	ISIS 482584	80	No	93
4. (N=8)	ISIS 482584	40	No	83
5. (N=8)	ISIS 482584	20	No	56
6. (N=8)	ISIS 482584	10	No	36

30

40

【1 5 2 7】

高分子キニノゲン(HMWK)の定量

50

血液試料からのHMWKのウエスタンブロット法を、図2及び表192及び193に示す。

【1528】

表192に示すように、482584の処置群は、PBS対照に比べ、HMWKのレベルが高く、用量依存的に増加している。PKKアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、HMWKの安定性をもたらしている。したがって、ISIS 482584処置群では、用量依存的に、血管透過性が減少している。表193に示すように、ISIS 482584の処置群は、PBS対照に比べ、HMWK切断産物が少なく、用量依存的に減少している。そのため、HMWKの減少は、HMWKのPKK切断によって、（ブラジキニン及びHkaを含む）切断産物に引き起こされる。データは濃度計によって測定された強度単位で表している。

【1529】

【表178】

表192

濃度計によるHMWKの定量化

群番号	処置	用量 (mg/kg/週)	強度単位
1	PBS	-	89
3	ISIS 482584	160	21358
4	ISIS 482584	80	7279
5	ISIS 482584	40	873
6	ISIS 482584	20	608
7	ISIS 482584	10	507

【1530】

【表179】

表193

濃度計によるHMWK切断産物の定量化

群番号	処置	用量 (mg/kg/週)	強度単位
1	PBS	-	401738
3	ISIS 482584	160	19936
4	ISIS 482584	80	204482
5	ISIS 482584	40	388135
6	ISIS 482584	20	403360
7	ISIS 482584	10	414774

【1531】

実施例128：マウスにおけるPKKを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとCaptopril誘発性血管透過性の因子12の併用療法

Captopril誘発性血管透過性モデルにおいて、ISIS 410944、因子12を標的とする5'-10'-5' MOEギャップマー（GCATGGGACAGAGATGGTGC；配列番号2247）であるISIS 482584の用量を変化させてマウスに処置を行った。

【1532】

処置

このアッセイの様々な処置群は、表194に表す。

【1533】

群1は、4匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した

。群1には他のいかなる治療薬も投与せず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1534】

群2は、8匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した。処置期間の最後に、20 μ gのCaptoprilを腹腔内投与した。群2は、Captopril誘発性血管透過性の対照群とした。

【1535】

群3は、4匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回PBSを皮下投与して処置した。処置期間の最後に、20 μ gのCaptoprilを腹腔内投与した。また、30 μ gのHOE-140を腹腔内投与した。群3は、Captopril誘発性血管透過性の阻害の陽性対照とした。

【1536】

群4、5、6、7、及び8は、8匹のマウスから成り、3週間にわたって週2回、それぞれに、ISIS 482584とISIS 41094を2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg（週に5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg、80mg/kgに対応する）皮下投与した。処置期間の最後に、20 μ gのCaptoprilを腹腔内投与した。群4～8は、ISIS 410944とISIS 482584の用量の変化がCaptopril誘発性血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1537】

全群に30mg/kgのエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から30分後に、マウスを殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。

【1538】

10

20

30

40

50

【表 180】

表 194
処理群

群番号	処置	各 ASO の用量 (mg/kg/週)	Captopril	HOE-140
1. (N=4)	PBS	-	No	No
2. (N=8)	PBS	-	Yes	No
3. (N=4)	PBS	-	Yes	Yes
4. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	80	Yes	No
5. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	40	Yes	No
6. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	20	Yes	No
7. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	10	Yes	No
8. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	5	Yes	No

【1539】

血管透過性の定量

足、結腸、及び耳から採取した組織は、ホルムアミドに一晩おき、エバンスブルーに浸出した。足及び耳の組織を含むホルムアミド溶液を 55℃ に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD 600 nm で測定し、表 195 に表す。より高い OD 値は、より高い透過性レベルに関連している。

【1540】

表 195 に示すように、ISIS 482584 と ISIS 410944 の併用で処置されたマウス（群 3～8）の組織の大部分が、全ての用量で、PBS 対照（群 1）に比べ、血管透過性が減少した。ISIS オリゴヌクレオチド処置群の血管透過性の減少は、基礎 PBS 対照（群 1）、ならびに HOE 140 で処置された陽性対照（群 2）で示された血管透過性と同等であった。PKK と因子 12 アンチセンスオリゴヌクレオチドの組み合わせでは、透過性が相乗的に減少した。予想したように、血管漏出の対応する相乗的な減少も観察した。

【1541】

10

20

30

40

50

【表 181】

表 195

血管透過性を測定するためのエバンスブルー染色のOD_{600nm}

群番号	処置	各 ASO の 用量 (mg/kg/ 週)	Capto pril	HOE-14 0	結腸	足	腸	耳
1	PBS	-	No	No	0.24	0.11	0.13	0.01
2	PBS	-	Yes	No	0.38	0.15	0.11	0.05
3	PBS	-	Yes	Yes	0.23	0.06	0.15	0.04
4	ISIS 482584+ISI S 410944	80	Yes	No	0.19	0.07	0.11	0.04
5	ISIS 482584+ISI S 410944	40	Yes	No	0.19	0.07	0.12	0.03
6	ISIS 482584+ISI S 410944	20	Yes	No	0.22	0.08	0.12	0.04
7	ISIS 482584+ISI S 410944	10	Yes	No	0.38	0.13	0.13	0.05
8	ISIS 482584+ISI S 410944	5	Yes	No	0.53	0.12	0.13	0.03

【1542】

実施例 129：マウスにおける基礎血管透過性についての P K K を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドと因子 12 の併用療法

基礎血管透過性において、I S I S 410944、因子 12 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、I S I S 482584 の用量を変化させてマウスに処置を行った。

【1543】

処置

このアッセイの様々な処置群は、表 196 に表す。

【1544】

群 1 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回 P B S を皮下投与して処置した。群 1 には他のいかなる治療薬も投与せず、血管透過性の基礎レベルを測定するための対照群とした。

【1545】

群 2 に、4 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回 P B S を皮下投与して処置した。処置期間の最後に、30 μg の H O E - 1 4 0 を腹腔内投与した。群 2 は、基礎血管透過性の阻害の陽性対照とした。

【1546】

群 3、4、5、6、及び 7 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回、それぞれに、I S I S 482584 と I S I S 410944 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、または 40 mg/kg（週に 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg に対応する）皮下投与

した。群3～7は、ISIS 410944とISIS 482584が基礎誘発性血管透過性に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1547】

全群に30mg/kgのエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から30分後に、マウスを殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。

【1548】

【表182】

表196

処置群

群番号	処置	用量 (mg/kg/ 週)	HOE-140
1. (N=8)	PBS	－	No
2. (N=4)	PBS	－	Yes
3. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	80	No
4. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	40	No
5. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	20	No
6. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	10	No
7. (N=8)	ISIS 482584+ISIS 410944	5	No

【1549】

血管透過性の定量

足、結腸、腸及び耳から採取した組織は、ホルムアミドに一晩おき、エバンスブルーを浸出した。足及び耳の組織を含むホルムアミド溶液を55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD600nmで測定し、表197に表す。より高いOD値は、より高い透過性レベルに関連している。

【1550】

表197に示すように、ISIS 482584とISIS 410944の組み合わせで処置されたマウスの大部分の組織は、全ての用量（群2～7）で、PBS対照（群1）に比べ、血管透過性が減少した。ISISオリゴヌクレオチド処置群の血管透過性の減少は、HOE140で処置された陽性対照（群2）で示された血管透過性の減少と同等であった。PKKと因子12アンチセンスオリゴヌクレオチドの組み合わせでは、透過性が相乗的に減少した。予想したように、血管漏出の対応する相乗的な減少も観察した。

【1551】

10

20

30

40

50

【表 183】

表 197

血管透過性を測定するためのエバンスブルーのOD_{600nm}

群番号	処置	用量 (mg/kg/ 週)	HOE-140	結腸	足	腸	耳
1	PBS	-	No	0.19	0.08	0.10	0.004
2	PBS	-	Yes	0.14	0.04	0.08	0.008
3	ISIS 482584+ISIS 410944	80	No	0.14	0.04	0.09	0.01
4	ISIS 482584+ISIS 410944	40	No	0.15	0.05	0.10	0.006
5	ISIS 482584+ISIS 410944	20	No	0.15	0.04	0.10	0.007
6	ISIS 482584+ISIS 410944	10	No	0.15	0.06	0.10	0.004
7	ISIS 482584+ISIS 410944	5	No	0.14	0.05	0.13	0.002

【1552】

実施例 130: ISIS 482584 による因子 12 タンパク質活性化の阻害

PKK mRNA のアンチセンス阻害の因子 12 タンパク質活性化への影響を評価した。

【1553】

処置

このアッセイの様々な処理群は、表 198 に表す。

【1554】

群 1 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回 PBS を皮下投与して処置した。群 1 には他のいかなる治療薬も投与せず、因子 12 の活性化を測定するための対照群とした。

【1555】

群 2、3、4、5、及び 6 は、8 匹のマウスから成り、3 週間にわたって週 2 回、それぞれに、ISIS 482584 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、または 40 mg/kg（週に 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg に対応する）皮下投与した。群 2～6 は、ISIS 482584 が因子 12 の活性化に及ぼす効果を検討するための実験処置群とした。

【1556】

処置期間の最後に、血漿は、血漿中の因子 12 について Spectrozyme（登録商標）因子 12 a をベースとするアミド分解アッセイから採取した。

【1557】

10

20

30

40

50

【表 184】

表 198
処置群

群番号	処置	用量 (mg/kg/ 週)
1. (N=8)	PBS	—
2. (N=8)	ISIS 482584	80
3. (N=8)	ISIS 482584	40
4. (N=8)	ISIS 482584	20
5. (N=8)	ISIS 482584	10
6. (N=8)	ISIS 482584	5

10

【1558】

血漿中の因子12の活性化についてのアッセイ

96ウェルのポリプロピレンマイクロプレート中の85 μ LのPBSおよび1 μ g/mLのデキストラン硫酸(500 kDa)に、血漿(5 μ L)を添加し、溶液を室温で5分間インキュベートした。Spectrozyme(登録商標)FXIIa(10 μ Lの2 mM溶液)と0.2 mMのKALLISTOP(商標)溶液を添加し、吸光速度(absorbance kinetic)を405 nmで測定した。因子12の活性化は、吸光度蓄積(absorbance accumulation)の線形位相で測定した。結果は、PBS対照試料で測定された因子12の活性化の割合として、表199に表す。表199に見られるように、ISIS 482584によるPKKの阻害は、基質による因子12の活性化の減少をもたらし、このことはPKKが、適切な因子12の活性化に必要なであることを示唆している。

20

【1559】

【表 185】

表 199

PBS対照と比較したときの因子12活性化の割合

30

用量 (mg/kg/wk)	% F12 活性化
80	14
40	24
20	47
10	63
5	82

40

【1560】

実施例131：マウスPKKのアンチセンス阻害がC1-INHアンチセンスオリゴヌクレオチド誘発性血管透過性に及ぼすin vivo効果

マウスC1阻害因子mRNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであるISIS 461756によって誘発される血管透過性は、マウスの血管透過性を増加させ、遺伝性血管浮腫の病理を再現する。このモデルへのISIS 482584の効果を評価した。

50

【1561】

処置

8匹のマウスから成る一群は、40mg/kgのISIS 482584を、3週間にわたって週に2回（週の用量は80mg/kg）、投与した。8匹のマウスから成る第二の群は、40mg/kgの対照オリゴヌクレオチド、ISIS 141923で、3週間にわたって週に2回（週の用量は80mg/kg）皮下投与して処置した。8匹のマウスから成る第三の群3は、PBSを3週間にわたって週に2回投与することによって処置した。14日目に、全群に12.5mg/kgのISIS 461756を3週間にわたって週に2回（週の用量は25mg/kg）を投与した。マウスの対照群は、PBSを3週間にわたって週に2回投与したが、ISIS 461756は投与しなかった。

10

【1562】

処置の最後に、全群に30mg/kgのエバンスブルー溶液を尾静脈に注入した。エバンスブルー溶液注入から30分後に、マウスを殺し、結腸、足、耳及び腸を回収した。また、RNA分析のために肝臓を回収した。

【1563】

RNA分析

RNAは、C1-INH及びPKK mRNAのRT-PCR分析のために、肝臓から単離した。C1-INHのためのプライマープロブセットは、RTS3218（配列番号2234として本明細書で指定した順方向配列GAGTCCCCCAGAGCCTACAGT、配列番号2235として本明細書で指定した逆方向配列TGTCATTTGTTATTGTGATGGCTACA、配列番号2236として本明細書で設計したプローブ配列CTGCCCTCTACCTGGCCAACAACCA）である。PKKのためのプライマープロブセットは、RTS3287（配列番号2237として指定した順方向配列ACAAGTGCATTTTACAGACCAGAGTAC、配列番号2238として設計した逆方向配列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT、配列番号2239として指定したプローブ配列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC）である。結果は、ISIS 461756で処置をしていないPBS対照と比較したときの阻害率（%）として、表200に表す。データは、ISIS 461756がC1-INH mRNA発現を有意に減少させ、ISIS 482584による処置がPKK発現を有意に減少させたことを示している。

20

【1564】

【表186】

表200

未処置のPBSと比較したときのISIS 461756で処理したマウスのmRNA発現の阻害率（%）

処理	C1-INH mRNA	PKK mRNA
PBS	76	0
ISIS 141923	79	0
ISIS 482584	77	78

40

【1565】

血管透過性の定量

足、結腸、及び腸から採取した組織は、ホルムアミド溶液に一晩おき、エバンスブルーを浸出した。足の組織を含むホルムアミド溶液を55℃に加熱し、一晩放置した。染液が浸透したホルムアミド溶液の色彩強度は、OD600nmで測定した。データは、ISIS 461756で処置をしていないPBS対照と比較したときの増加率または減少率（%）として、表201に表す。データは、ISIS 482584による処置が、ISIS 461756によって誘発される血管透過性を防いだことを示している。

50

【1566】

【表187】

表201

未処置のPBSと比較したときのISIS 461756で処置したマウスの血管透過性の変化率

処理	結腸	足	腸
PBS	13	70	27
ISIS 141923	2	80	14
ISIS 482584	-23	2	-25

10

【1567】

実施例132: FeCl₃誘発性下大静脈血栓症モデルにおけるマウスPKKのアンチセンス阻害の*in vivo*効果

PKKの*in vitro*及び*in vivo*の有意な阻害を示したISIS 482584を、FeCl₃誘発性下大静脈血栓症マウスモデルで評価した。

【1568】

処置

8匹の雄BALB/cマウスの3つの群に、10mg/kg、20mg/kg、または40mg/kgのISIS 482584を、3週間にわたって週2回（週の用量は20mg/kg、40mg/kg、または80mg/kg）皮下投与した。12匹のBALB/cマウスの2つの対照群にそれぞれ、PBSで処置、3週間にわたって週2回皮下投与して処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSの最後の投与から2日後に、10mg/kgのキシラジンと混合した150mg/kgのケタミンを腹腔内注射することによって、全群のマウスに麻酔をかけた。第1の対照群を除き、麻酔をかけたマウスの全群で、FeCl₃によって血栓形成が誘発した。

20

【1569】

FeCl₃処理を行ったマウスにおいて、10%のFeCl₃溶液を事前に浸したフィルター紙（2×4mm）を、大静脈に直接適用することによって、血栓の形成が誘発された。暴露から3分後に、フィルター紙を取り除いた。フィルター紙の適用から30分後に、血小板の分析のために、血栓を含む静脈の全長を切除した。肝臓はRNA分析のために回収した。

30

【1570】

血小板組成の定量

血小板因子4（PF-4）のリアルタイムPCRを使用して、血栓形成の測定値として、大静脈の血小板を定量した。PF-4 mRNAレベルは、マウスプライマープローブセットmPF4__LTS__00086（配列番号2240として本明細書で指定した順方向配列AGACCCATTTCCTCAAGGTAGAACT、配列番号2241として本明細書で指定した逆方向配列CGCAGCGACGCTCATG、配列番号2242として本明細書で指定したプローブ配列TCTTTGGGTCCAGTGGCACCCCTCTT）を使用して測定した。結果は、2つのPBS処理対照群と比較したときの、ISISオリゴヌクレオチド処置マウスのPF-4の割合として表す。表202に示すように、ISIS 482584による処置は、PBS対照に比べ、PF-4の有意な減少をもたらした。そのため、当該化合物によるPKKの減少は、血栓の形成の阻害に有用である。

40

【1571】

50

【表 188】

表 202

FeCl₃誘発性下大静脈血栓症モデルにおけるPF-4リアルタイムPCRによる血栓形成の分析

	用量 (mg/kg/ 週)	PF-4
PBS-FeCl ₃	-	0
PBS+FeCl ₃	-	100
ISIS 482584	20	62
	40	34
	80	25

10

【1572】

実施例 133：尾の出血アッセイにおけるマウスPKKのアンチセンス阻害の *in vivo* 効果

ISIS 482584 による処置が、マウスに過剰な出血または大量の出血を引き起こすかどうかを観察するために、尾の出血を測定した。

20

【1573】

処置

10匹の雄BALB/cマウスの群を、10mg/kg、20mg/kg、または40mg/kgのISIS 482584を、3週間にわたって週2回（週の用量は20mg/kg、40mg/kg、または80mg/kg）を皮下投与して処置した。8匹のBALB/cマウスの対照群を、PBSを3週間にわたって週2回、皮下投与して処置した。

【1574】

尾の出血アッセイ

ISISオリゴヌクレオチドまたはPBSの最後の処置から2日後に、マウスを尾を出血させるためのチャンバーに固定した。マウスにイソフランでチャンバーにおいて麻酔をかけた。その後、尾の小さい部分（切片から約4mm）を滅菌ハサミで切り出した。切り出した尾は、37℃に温めた約10mLの0.9%のNaCl緩衝液で満たされた15mLのFalcon管にすぐに置いた。血液は40分かけて採取した。出血前と出血後の管の生理食塩水の重さを測った。結果は表203に示す。

30

【1575】

ISIS 482584 による処置は、出血に有意に影響しなかった。これらのデータは、本明細書で提供される当該化合物の出血能力は低いことを示唆している。実施例 19の結果で得られたこれらのデータは、本明細書に記載の当該化合物でのPKKの阻害は、関連する出血のリスクを有せずに抗血栓の活性を提供するのに有用であることを示唆している。

40

【1576】

50

【表 189】

表 203

ISIS 482584による処置後の尾の出血アッセイ

	用量 (mg/kg/ 週)	出血 (mL)
PBS	-	0.03
ISIS 482584	20	0.03
	40	0.14
	80	0.07

10

【1577】

実施例 134: FeCl₃ 誘発性腸間膜血栓症モデルにおけるマウス P K K のアンチセンス阻害の *in vivo* 効果

FeCl₃ 誘発性腸間膜血栓症マウスモデルで ISIS 482584 を評価した。

【1578】

処置

Swiss-Webster マウス 6~8 匹の群を、40 mg/kg の ISIS 482584 を、3 週間にわたって週 2 回皮下注射して処置した（週の用量は 80 mg/kg）。Swiss-Webster マウス 6 匹の対照群を、PBS を 3 週間にわたって週 2 回皮下注射して処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは PBS の最後の投与から 2 日後に、25 mg/kg のキシラジンで混合した 75 mg/kg のケタミンを腹腔内注射することによって、全群のマウスに麻酔をかけた。

20

【1579】

用量 5 mg/kg のローダミン 6 G 染色を皮下注射し、血小板を染色した。用量 1 mg/kg の Alexa-647 標識化抗フィブリノーゲン抗体を尾静脈に注射し、フィブリンを染色した。腹部を正中切開によって開口した。内臓の腸間膜をガラスカバーグラスに広げ、腸間膜細動脈（70~120 μm）を、顕微鏡で観察することにより位置確認した。6% の FeCl₃ 溶液を事前に浸した綿糸（2 x 0.3 mm）を、標的の血管に直接適用することによって、血栓形成が誘発された。3 分間の暴露の後、糸を取り除き、両方の染液の色彩強度を、適切なフィルターで、蛍光顕微鏡検査法（Olympus Fluoview 1000 共焦点レーザー顕微鏡）によって 70 分間記録した。

30

【1580】

対照及び処置群の血小板凝集の結果を任意単位（a.u.）で表 204 に表す。血小板凝集は、PBS で処置したマウスに比べ、80 mg/kg/週 の ISIS 482584 で処置したマウスで減少した。対照及び処置群のフィブリン形成の結果を任意単位（a.u.）で表 205 に表す。フィブリン形成は、PBS で処置したマウスに比べ、用量 80 mg/kg/週 の ISIS 482584 で処置したマウスで減少した。したがって、これらの結果は、ISIS 482584 が血栓形成を阻害することを示唆している。

40

【1581】

50

【表 190】

表 204

FeCl₃誘発性腸間膜血栓症モデルにおける蛍光強度 (a. u.) のリアルタイム測定による血小板凝集の分析

時間 (秒)	PBS	80 mg/kg/週
752	54	74
1018	315	11
1284	485	7
1550	654	0
1815	1079	0
2081	1164	0
2347	1452	0
2613	1440	38
2879	1689	148
3144	1716	129
3410	1845	169
3676	1865	131
3944	2055	87

10

20

【1582】

【表 191】

表 205

FeCl₃誘発性腸間膜血栓症モデルにおける蛍光強度 (a. u.) のリアルタイム測定によるフィブリン形成の分析

時間 (秒)	PBS	80 mg/kg/週
752	9	54
1018	86	7
1284	203	1
1550	319	10
1815	521	16
2081	598	15
2347	831	61
2613	959	88
2879	1157	141
3144	1236	150
3410	1374	173
3676	1629	160
3944	1822	128

30

40

【1583】

実施例 135：狭窄誘発性下大静脈血栓症モデルにおけるマウス PKK のアンチセンス阻害の *in vivo* 効果

狭窄誘発性下大静脈 (IVC) 血栓症モデルで ISIS 482584 を評価した。血流の減少及び内皮損傷が、このモデルの特徴であり、St. Thomas モデルとしても知

50

られている。

【1584】

処置

BALB/cマウス6～8匹の4つの群を、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kgまたは40mg/kgのISIS 482584を3週間にわたって週2回皮下注射して処置した（週の用量は10mg/kg、20mg/kg、40mg/kgまたは80mg/kg）。BALB/cマウス8匹の対照群を、3週間にわたって週2回PBSを皮下注射して処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSの最後の投与から2日後に、2.5%の吸入用のイソフルランで麻酔をかけた。マウスのIVCを、左腎静脈の下、正中切開によって露わにし、鈍的解剖によって腹部大動脈から分離した。6-0シルクタイ（silk tie）（Ethicon、UK）をちょうど左腎静脈のシアノ血管の後ろに配置し、金属製4-0縫合糸（Ethicon、UK）をIVCにわたって長軸方向に配値し、シルクタイを頂上で縛った。金属製縫合糸はその後取り除いた。2つの神経血管手術用クリップ（Braun Medical Inc, PA）を、結紮下の2つに分かれた位置にそれぞれ20秒間置き、その後、取り除いた。腹腔の内容物を置き換え、腹腔を閉じた。24時間後、IVCをあらわにし、血栓形成を確認した。形成された血栓のすべてを採取し、10%のホルマリンに24時間固定した。

【1585】

血栓の重さを測り、結果は、ミリグラムで表206に表す。結果によって示されるように、ISIS 482584の用量を増加させながらの処置は、結果的に対応する血栓の重量の減少をもたらした。この結果は、PKKの阻害が血栓形成の阻害に有用であることを示している。

【1586】

【表192】

表206

狭窄誘発性下大静脈血栓症モデルにおける血栓の重量

	用量 (mg/kg/週)	重量 (mg)
PBS	-	10
ISIS 48258 4	10	8
	20	6
	40	5
	80	3

【1587】

実施例136：GalNAc3共役基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドによるマウスPKKの阻害

以下の表に示すように、PKK mRNAの効果について、ISIS 482584とISIS 722059のin vivo試験を行った。

【1588】

10

20

30

40

50

【表 193】

表 207

GalNAc₃共役基を含むISIS 722059及びその親ISIS 482584

ISIS 番号	配列 (5' ~3')	化学	配列 番号
482584	G _{cs} G _{cs} C _{cs} A _{cs} T _{cs} A _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{cs} G _{cs} A _{cs} A _{cs} T _c	共役基なし、完全 PS	2244
722059	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·G _{cs} G _{cs} C _{co} A _{co} T _{cs} A _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{co} G _{co} A _{cs} A _{cs} T _c	5'-GalNAc ₃ -7 及び 混合 PS/PO	2244

10

下付き文字：「e」は2'-MOE修飾ヌクレオシドを示す。「d」はβ-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示す。「s」はホスホロチオエートヌクレオシド間結合(PS)を示す。「o」はリン酸ジエステルヌクレオシド間結合(PO)を示す。「o」は-O-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は5-メチルシトシンを示す。「GalNAc₃-7」の構造は実施例48に示している。

【1589】

処置

20

C57BL/6J-Tyrc-2Jマウス4匹からなる4つの群を、5.0mg/kg、10.0mg/kg、20.0mg/kg、または40.0mg/kgのISIS 482584を、3週間にわたって週2回皮下注射して処置した(週の用量は10.0mg/kg、20.0mg/kg、40.0mg/kg、または80.0mg/kg)。BALB/cマウス4匹からなる4群を、それぞれ、1.0mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、または8.0mg/kgのISIS 722059を、3週間にわたって週2回皮下注射して処置した(週の用量は2.0mg/kg、4.0mg/kg、8.0mg/kg、または16.0mg/kg)。BALB/cマウス4匹の対照群を、PBSを3週間にわたって週2回皮下注射した。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはPBSの最後の投与から3日後に、全群のマウスに、誘導のために空気中に2.5%蒸発させたイソフルラン、次にメンテナンスのためにノーゾコーンによる1~2%のイソフルランによって麻酔をした。その後、頸椎脱臼した。安楽死の後、RNA分析のために肝臓を回収した。

30

【1590】

RNA分析

PKKのリアルタイムPCRのためにRNAを肝組織から抽出した。PKK mRNAレベルを、マウスプライマープロブセットを使用して測定した(配列番号2231として本明細書で指定した順方向配列ACAAGTGCATTTTACAGACCAAGAGTAC、配列番号2232として本明細書で指定した逆方向配列GGTTGTCCGCTGACTTTATGCT、配列番号2233として本明細書で指定したプロブ配列AAGCACAGTGCAAGCGGAACACCC)。結果は、PBS対照に対するPKKの阻害率(%)として表す。以下の表208に示すように、GalNAc₃共役基を含むISIS 722059は、親アンチセンスオリゴヌクレオチド、ISIS 482584より、有意に強力にPKK mRNAを減少させた。この結果は、上述の実施例の結果と一致しており、マウスとヒトの両方の多くの標的遺伝子で、GalNAc₃共役基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、親アンチセンスオリゴヌクレオチドより有意に強力であった。したがって、GalNAc₃共役基を含むヒトPKKアンチセンスオリゴヌクレオチドは、同様に、共役基を含まない親アンチセンスオリゴヌクレオチドより、強力にヒトPKK mRNAを減少させることが予想される。

40

【1591】

50

【表 194】

表 208

PBS 対照に対する肝臓の PKK mRNA の阻害率 (%)

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	%阻害	ED ₅₀ (mg/kg/週)
482584	10	42.6	17.2
	20	53.3	
	40	71.4	
	80	90.8	
722059	2	50.1	2.09
	4	76.7	
	8	80.8	
	16	86.1	

10

【1592】

実施例 137: GalNAc₃ 共役基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒト PKK の阻害

以下の表に示すように、ヒト PKK mRNA に対する効果について、ISIS 546254 と ISIS 721744 の *in vitro* 試験を行った。

20

【1593】

【表 195】

表 209

GalNAc₃ 共役基を含む ISIS 721744 及びその親 ISIS 546254

ISIS 番号	配列 (5' ~ 3')	化学	配列番号
546254	T _{es} G _{es} C _{es} A _{es} A _{es} G _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} C _{ds} A _{es} A _{es} A _{es} C _{es} A _e	共役基なし、完全 PS	570
721744	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·T _{es} G _{es} C _{eo} A _{eo} A _{es} G _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} C _{ds} A _{eo} A _{eo} A _{es} C _{es} A _e	5'-GalNAc ₃ -7 _{a-o} · 及び混合 PS/PO	570

30

下付き文字: 「e」は 2'-MOE 修飾ヌクレオチドを示す。「d」は β-D-2'-デオキシリボヌクレオチドを示す。「s」はホスホロチオエートヌクレオチド間結合 (PS) を示す。「o」はリン酸ジエステルヌクレオチド間結合 (PO) を示す。上付き文字「m」は 5-メチルシトシンを示す。「GalNAc₃-7」の構造は実施例 48 に示している。「GalNAc₃-7_{a-o}」は、切断可能部分が -O-P(=O)(OH)- である GalNAc₃-7 共役基を示す。

40

【1594】

肝臓の *in vitro* の生理学的微小環境を模倣するために、間質細胞を含む初代ヒト肝細胞共培養物 (HepatoPac kit HPHU-TX-96S、Hepregen、Medford、MA) を、製造者の指示に従って使用した。以下の表に挙げる濃度の Isis オリゴヌクレオチドまたは PBS を、トランスフェクション試薬の非存在下で、各ウェルに添加した。96 時間後、細胞を溶解し、RNA を細胞から単離した。PKK mRNA レベルは、プライマープローブセット RTS3454 を使用して、定量的リアルタイム PCR によって測定し、RIBOGREEN (登録商標) によって測定する総 RNA 含量に正規化した。結果は、PBS 処理細胞に対する PKK mRNA レベルの阻

50

害率（％）として以下の表に表し、 IC_{50} 値は、4値ロジスティックモデル（JMP Software、Cary、NC）を使用して計算した。結果は、オリゴヌクレオチドを細胞に人工的に移行することを促進するための試薬またはエレクトロポレーション技術を使用しない自由な取り込み条件下で、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドが、GalNAc共役体を含まない親オリゴヌクレオチドより、有意に強力であったことを示している。

【1595】

【表196】

表210

PBS対照に対するPKK mRNAの阻害率（％）

ISIS 番号	濃度 (μM)	阻害 (％)	IC_{50} (μM)
546254	0.1	30	2.12
	0.3	25	
	1.0	24	
	3.0	63	
	10.0	85	
721744	0.03	34	0.07
	0.1	52	
	0.3	81	
	1.0	92	
	3.0	98	

出願時の請求の範囲

〔1〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号30～2226の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔2〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号570の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔3〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号705の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔4〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号1666の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14

、少なくとも 15、または少なくとも 16 の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔5〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 20 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 570 の核酸塩基配列を有する、化合物。

〔6〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 20 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 705 の核酸塩基配列を有する、化合物。

〔7〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 16 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 1666 の核酸塩基配列を有する、化合物。

〔8〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 62、72、103、213、312、334-339、344、345、346、348、349、351、369、373、381、382、383、385、387-391、399、411、412、414、416、444、446-449、452、453、454、459、460、462-472、473、476、477、479、480、481、484、489-495、497、500、504、506、522、526、535、558、559、560、564、566、568-571、573、576、577、578、587、595、597-604、607、608、610、613、615、618、619、622、623、624、633、635、636、638、639、640、642、643、645、652、655-658、660、661、670、674-679、684、685、698、704、705、707、708、713、716、717、728、734、736、767、768、776、797、798、800、802、810、815、876、880、882、883、886、891、901-905、908-911、922、923、924、931、942、950-957、972、974、978、979、980、987-991、1005、1017-1021、1025、1026、1029、1030、1032、1034、1035、1037、1040、1041、1045、1046、1051、1054、1059、1060、1061、1064、1065、1066、1075、1076、1087、1089、1111、1114、1116、1117、1125、1133、1153、1169、1177、1181、1182、1187、1196、1200、1214、1222、1267、1276、1277、1285、1286、1289、1290、1291、1303、1367、1389、1393、1398-1401、1406、1407、1408、1411、1419-1422、1426、1430、1431、1432、1434-1437、1439、1440、1443、1444、1451、1452、1471、1516、1527、1535、1537、1538、1539、1540、1541、1563、1564、1567、1568、1616、1617、1623、1629、1664、1665、1666、1679、1687、1734、1804、1876、1886、1915、2008、2018、2100、2101、2115、及び 2116 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 個の連続する核酸塩基配列を有する、化合物。

〔9〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは P K K の少なくとも 80% の mRNA の阻害を達成する、請求項 8 に記載の化合物。

〔10〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基から成り、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 62、72、103、213、334

10

20

30

40

50

－ 3 3 9、3 4 4、3 4 6、3 4 8、3 4 9、3 5 1、3 8 1、3 8 2、3 8 3、3 8 5
、3 8 9、3 9 0、3 9 1、4 4 6、4 4 8、4 5 2、4 5 3、4 5 4、4 6 6－ 4 7 3
、4 7 6、4 8 1、4 8 4、4 9 1、4 9 2、4 9 4、4 9 5、4 9 7、5 0 4、5 2 6
、5 5 8、5 5 9、5 6 6、5 6 8－ 5 7 1、5 7 6、5 7 8、5 8 7、5 9 5、5 9 7
、5 9 8、6 0 0－ 6 0 4、6 0 7、6 1 0、6 1 3、6 1 8、6 1 9、6 2 4、6 3 5
、6 3 8、6 3 9、6 4 5、6 5 2、6 5 6、6 5 7、6 5 8、6 6 0、6 7 4、6 7 5
、6 7 6、6 8 4、6 9 8、7 0 4、7 0 5、7 0 7、7 1 3、7 1 6、7 6 8、8 7 6
、8 8 0、9 0 1－ 9 0 5、9 0 8－ 9 1 1、9 2 2、9 2 3、9 2 4、9 3 1、9 4 2
、9 5 1、9 5 4－ 9 5 7、9 7 2、9 7 4、9 7 8、9 7 9、9 8 7、9 8 8、9 9 0
、1 0 0 5、1 0 1 9、1 0 2 0、1 0 2 1、1 0 2 5、1 0 3 2、1 0 3 7、1 0 4 0
、1 0 4 1、1 0 4 5、1 0 5 4、1 0 5 9、1 0 6 0、1 0 6 1、1 0 6 4、1 0 6 5
、1 0 6 6、1 0 7 5、1 1 1 1、1 1 1 6、1 1 1 7、1 1 2 5、1 1 3 3、1 1 5 3
、1 1 6 9、1 1 7 7、1 2 0 0、1 2 2 2、1 2 6 7、1 2 8 5、1 2 9 0、1 2 9 1
、1 3 0 3、1 3 6 7、1 3 9 8、1 3 9 9、1 4 0 1、1 4 0 6、1 4 0 8、1 4 1 1
、1 4 1 9、1 4 2 0、1 4 2 1、1 4 2 6、1 4 3 0、1 4 3 1、1 4 3 2、1 4 3 4
－ 1 4 3 7、1 4 4 0、1 4 4 3、1 4 4 4、1 4 5 1、1 5 3 7－ 1 5 4 0、1 5 6 3
、1 6 1 6、1 6 7 9、1 6 8 7、1 8 0 4、2 0 0 8、2 1 0 1、2 1 1 5、及び 2 1
1 6 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なく
とも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、または
少なくとも 1 6 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

10

20

〔 1 1 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは P K K の少なくとも 8 5 % の m R N A の阻害を達成する
、請求項 1 0 に記載の化合物。

〔 1 2 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 1 2 ～ 3 0
個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 3 3 4、3 4 6、3 5 1、3 8 2、3 9
0、3 9 1、4 4 6、4 4 8、4 5 2、4 5 3、4 6 8、4 6 9、4 7 0、4 7 1、4 7
2、4 7 6、4 8 1、4 9 1、4 9 5、5 0 4、5 5 8、5 6 6、5 6 8、5 7 0、5 7
1、5 7 8、5 8 7、5 9 7、5 9 8、6 0 0、6 0 4、6 1 3、6 3 5、6 3 8、6 4
5、6 5 6、6 5 8、6 6 0、6 7 4、6 7 5、6 8 4、7 0 4、7 0 5、8 8 0、9 0
1－ 9 0 5、9 0 9、9 2 2、9 3 1、9 5 1、9 5 4、9 5 6、9 9 0、1 0 0 5、1
0 2 0、1 0 3 2、1 0 3 7、1 0 4 0、1 0 4 1、1 0 4 5、1 0 5 4、1 0 7 5、1
1 1 1、1 1 2 5、1 1 3 3、1 1 5 3、1 2 0 0、1 2 6 7、1 2 9 1、1 3 0 3、1
3 9 8、1 3 9 9、1 4 0 1、1 4 0 6、1 4 2 0、1 4 2 6、1 4 3 0、1 4 3 1、1
4 3 4、1 4 3 5、1 4 3 6、1 4 4 0、1 4 4 3、1 4 5 1、1 5 3 7－ 1 5 4 0、2
1 1 5、及び 2 1 1 6 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なく
とも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なく
とも 1 5、または少なくとも 1 6 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化
合物。

30

〔 1 3 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは P K K の少なくとも 9 0 % の m R N A の阻害を達成する
、請求項 1 2 に記載の化合物。

40

〔 1 4 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 1 2 ～ 3 0
個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 3 3 4、3 9 1、4 4 8、4 6 8、4 6
9、5 6 8、5 7 0、5 9 8、6 3 5、6 5 8、6 7 4、6 8 4、7 0 5、9 0 1、9 0
3、9 0 4、9 2 2、9 9 0、1 2 6 7、1 2 9 1、1 4 2 0、1 4 3 0、1 4 3 1、1
4 3 4、1 4 3 5、1 4 3 6、1 5 3 7、1 5 3 8、及び 1 5 4 0 の核酸塩基配列のいづ
れかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2
、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、または少なくとも 1 6 の連続する

50

核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔15〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは P K K の少なくとも 95 % の mRNA の阻害を達成する、請求項 14 に記載の化合物。

〔16〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12 ～ 30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 334、338、346、349、382、383、390、448、452、453、454、495、526、559、570、587、598、635、660、705、901、903、904、908、923、931、955、974、988、990、1020、1039、1040、1111、1117、1267、1291、1349、1352、1367、1389、1393、1399、1401、1408、1411、1426、1499、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1624、1643、1661、1665、1666、1673、1679、1695、1720、1804、1817、1876、1881、1886、1940、1947、2008、2018、2019、2031、2044、2100、2101、2115、及び 2116 のいずれかの核酸塩基配列の少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

10

20

〔17〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは 0.4 以下の IC₅₀ (μM) を達成する、請求項 16 に記載の化合物。

〔18〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12 ～ 30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 334、346、349、382、453、454、495、526、570、587、598、635、660、901、903、904、931、955、990、1020、1111、1267、1349、1352、1367、1389、1399、1408、1411、1426、1516、1535、1544、1548、1563、1564、1568、1569、1598、1616、1617、1623、1643、1661、1665、1666、1673、1695、1804、1876、1881、2019、2044、2100、2101、2115、及び 2116 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

30

〔19〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは 0.3 以下の IC₅₀ (μM) を達成する、請求項 18 に記載の化合物。

〔20〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12 ～ 30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 334、346、382、453、495、526、570、587、598、635、901、904、931、955、1020、1111、1349、1352、1389、1426、1516、1535、1544、1548、1564、1569、1598、1616、1617、1665、1666、1804、1876、1881、2019、2044、2101、及び 2116 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、または少なくとも 16 の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

40

〔21〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、0.2 以下の IC₅₀ (μM) を達成する請求項 20

50

に記載の化合物。

〔 2 2 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号334、495、587、598、635、1349、1352、1389、1516、1544、1548、1569、1598、1617、1665、1666、1804、1881、及び2019の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、または少なくとも16個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、化合物。

〔 2 3 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、0.2以下のIC₅₀ (μM)を達成する、請求項22に記載の化合物。

〔 2 4 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基27427～27466の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔 2 5 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基33183～33242の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔 2 6 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基30570～30610の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔 2 7 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基27427～27521の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔 2 8 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基33085～33248の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔 2 9 〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは12～30個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号10の核酸塩基30475～30639

10

20

30

40

50

の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または少なくとも 20 の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔30〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 10 の核酸塩基 27362～27525 の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または少なくとも 20 の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

10

〔31〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 10 の核酸塩基 33101～33241 の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または少なくとも 20 の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

〔32〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、配列番号 10 の核酸塩基 30463～30639 の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または少なくとも 20 の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

20

〔33〕

修飾オリゴヌクレオチド及び共役基を含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは 12～30 個の連結されたヌクレオシドから成り、PKK 核酸のエクソン 9、エクソン 12、またはエクソン 14 の長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または少なくとも 20 の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、化合物。

30

〔34〕

前記修飾オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列は、配列番号 10 と少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 相補的である、請求項 24～33 に記載の化合物。

40

〔35〕

一本鎖修飾オリゴヌクレオチド及び共役基からなる、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔36〕

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合は修飾ヌクレオシド間結合である、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔37〕

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 36 に記載の化合物。

〔38〕

50

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔39〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔40〕

修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも3つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔41〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも4つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔42〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも5つのホスホヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔43〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも6つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔44〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも7つのホスホジエステルヌクレオシド間結合を含む、請求項36に記載の化合物。

〔45〕

前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合及びホスホロチオエートヌクレオシド間結合から選択される、請求項38～44のいずれかに記載の化合物。

〔46〕

各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である、請求項37に記載の化合物。

〔47〕

少なくとも1つのヌクレオシドは修飾核酸塩基を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔48〕

前記修飾核酸塩基は5-メチルシトシンである、請求項39に記載の化合物。

〔49〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾糖を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔50〕

前記修飾糖は2'-修飾糖、BNA、またはTHPである、請求項49に記載の化合物。〔51〕

前記修飾糖は、2'-O-メトキシエチル、2'-O-メチル、拘束エチル、LNA、または3'-フルオロHNAのいずれかである、請求項50に記載の化合物。

〔52〕

少なくとも1つの2'-O-メトキシエチルヌクレオシド、2'-O-メチルヌクレオシド、拘束エチルヌクレオシド、LNAヌクレオシド、または3'-フルオロHNAヌクレオシドを含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔53〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは
10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
5個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、
5個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント、
を含む、前記請求項に記載の化合物であって、前記ギャップセグメントは5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントの間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは

10

20

30

40

50

修飾糖を含む、前記化合物。

〔 5 4 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは 2 0 個の連結されたヌクレオシドからなる、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔 5 5 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは 1 9 個の連結されたヌクレオシドからなる、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔 5 6 〕

前記修飾オリゴヌクレオチドは 1 8 個の連結されたヌクレオシドからなる、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔 5 7 〕

共役基及び以下の式 $Tes\ Ges\ mCes\ Aes\ Aes\ Gds\ Tds\ mCds\ Tds\ mCds\ Tds\ Tds\ Gds\ Gds\ mCds\ Aes\ Aes\ Aes\ mCes$ Ae に従う修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物であって、

A = アデニン、

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、化合物。

〔 5 8 〕

共役基及び以下の式 $mCes\ mCes\ mCes\ mCes\ mCes\ Tds\ Tds\ mCds\ Tds\ Tds\ Tds\ Tds\ Ads\ Tds\ Ads\ Gds\ mCes$

$mCes\ Aes\ Ges\ mCe$ に従う修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物であって、

A = アデニン、

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、化合物。

〔 5 9 〕

共役基及び以下の式 $mCes\ Ges\ Aks\ Tds\ Ads\ Tds\ mCds\ Ads\ Tds\ Gds\ Ads\ Tds\ Tds\ mCks\ mCks\ mCe$ に従う修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物であって、

A = アデニン、

mC = 5' - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシメチル修飾ヌクレオシド、

k = c E t 修飾ヌクレオシド、

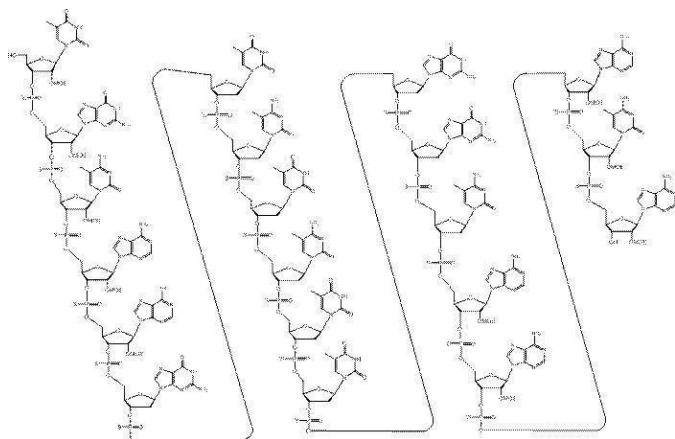
d = 2' - デオキシヌクレオシド、及び

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、化合物。

〔 6 0 〕

以下の式に従う共役基及び修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物。

【化１００１】

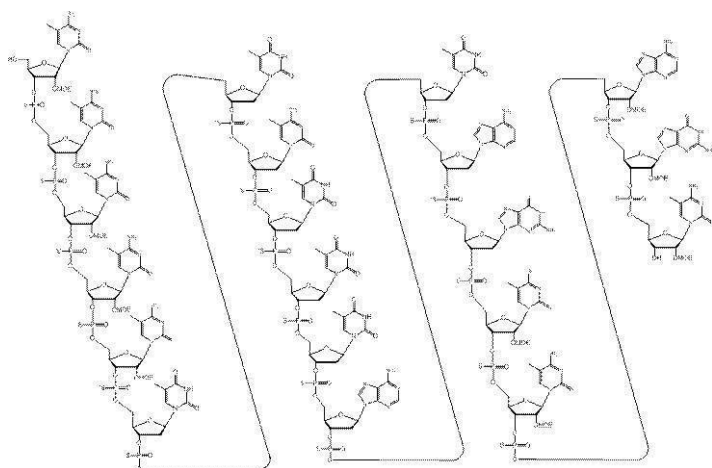


10

〔 6 1 〕

以下の式に従う共役基及び修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物。

【化１００２】

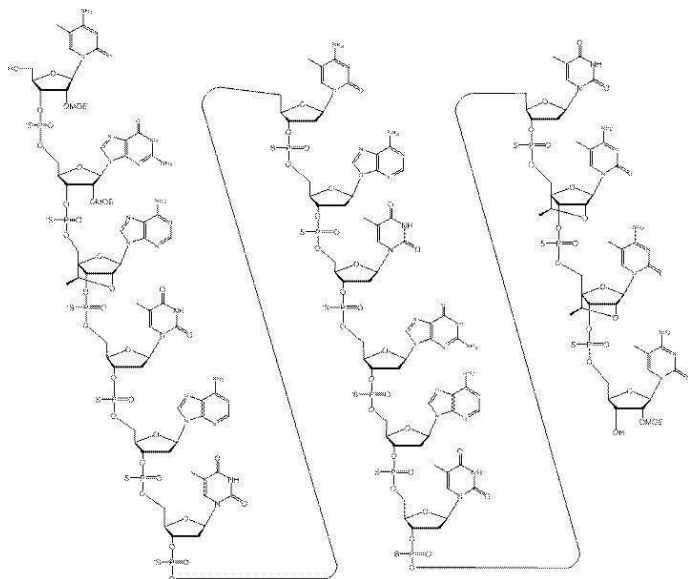


20

〔 6 2 〕

以下の式に従う共役基及び修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物。

【化１００３】



40

〔 6 3 〕

前記共役基は、前記修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端の前記修飾オリゴヌクレオチドに

50

連結されている、請求項 1～62 のいずれかに記載の化合物。

〔64〕

前記共役基は、前記修飾オリゴヌクレオチドの 3' 末端の前記修飾オリゴヌクレオチドに連結されている、請求項 1～62 のいずれかに記載の化合物。

〔65〕

前記共役基は 1 つだけリガンドを含む、請求項 1～64 のいずれかの化合物。

〔66〕

前記共役基は 2 つだけリガンドを含む、請求項 1～64 のいずれかに記載の化合物。

〔67〕

前記共役基は 3 つ以上のリガンドを含む、請求項 1～64 のいずれかの化合物。

10

〔68〕

前記共役基は 3 つだけリガンドを含む、請求項 1～64 のいずれかに記載の化合物。

〔69〕

各リガンドは、多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコイル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- α -D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロノニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、L-4-チオリボースのなかから選択される、請求項 65～68 のいずれか一項に記載の化合物。

20

30

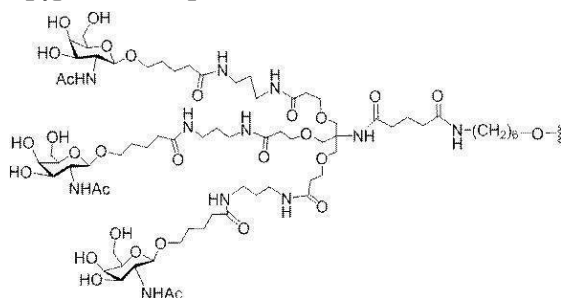
〔70〕

各リガンドは、N-アセチルガラクトサミンである、請求項 69 に記載の化合物。

〔71〕

前記共役基は以下を含む、請求項 1～64 のいずれかに記載の化合物。

〔化1004〕



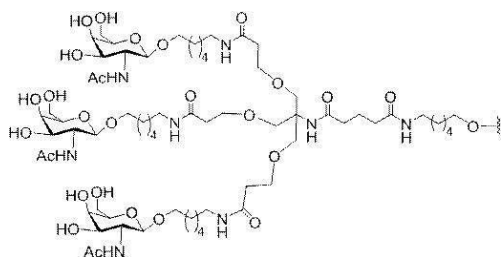
40

〔72〕

前記共役基は以下を含む、請求項 1～64 のいずれかに記載の化合物。

50

【化 1 0 0 5】

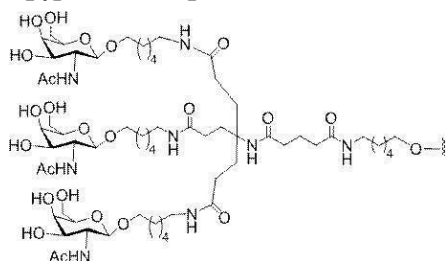


〔 7 3 〕

10

前記共役基は以下を含む、請求項 1 ～ 6 4 のいずれかに記載の化合物。

【化 1 0 0 6】

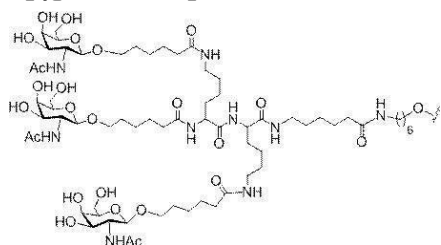


20

〔 7 4 〕

前記共役基は以下を含む、請求項 1 ～ 6 4 のいずれかに記載の化合物。

【化 1 0 0 7】

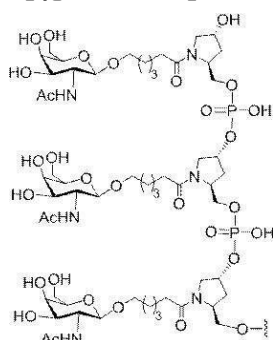


30

〔 7 5 〕

前記共役基は以下を含む、請求項 1 ～ 6 4 のいずれかに記載の化合物。

【化 1 0 0 8】



40

〔 7 6 〕

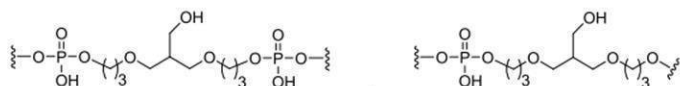
前記共役基は、少なくとも 1 つのリン共役基または中性の共役基を含む、請求項 6 4 ～ 7 0 のいずれかに記載の化合物。

〔 7 7 〕

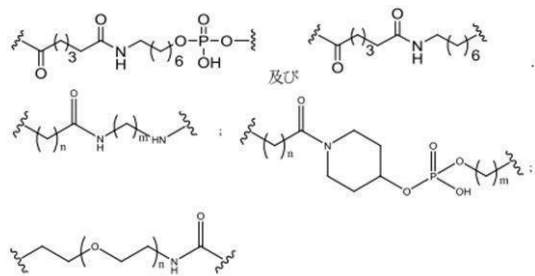
前記共役基は以下のなかから選択される構造を含み、

50

【化1009-1】



【化1009-2】



10

n は 1 ～ 12 であり、

m は 1 ～ 12 である、

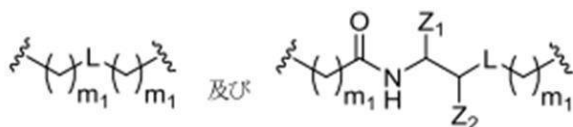
請求項 1 ～ 76 のいずれかに記載の化合物。

〔78〕

前記共役基は、以下のなかから選択される構造を有するテザーを有し、

【化10010】

20



L はリン共役基または中性連結基のいずれかであり、

Z_1 は $C(=O)OR_2$ であり、

Z_2 は、 H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R_2 は H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

各 m_1 は独立して 0 ～ 20 であり、少なくとも 1 つの m_1 は各テザーにつき 0 よりも大きい、

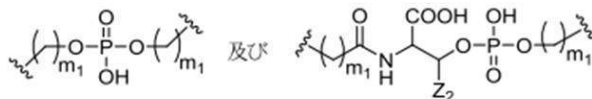
30

請求項 1 ～ 76 のいずれかに記載の化合物。

〔79〕

共役基は以下のなかから選択される構造を有するテザーを有し、

【化10011】



Z_2 は H または CH_3 であり、

40

各 m_1 は独立して 0 ～ 20 であり、少なくとも 1 つの m_1 は各テザーにつき 0 よりも大きい、

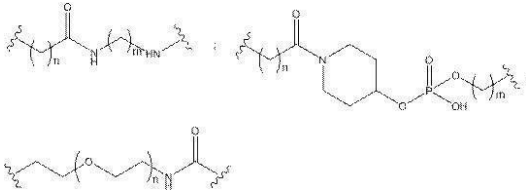
請求項 78 に記載の化合物。

〔80〕

前記共役基は、以下のなかから選択される構造を有するテザーを有し、

50

【化 1 0 0 1 2】



;

n は 1 ～ 1 2 であり、

m は 1 ～ 1 2 である、

請求項 6 4 ～ 7 0 のいずれかに記載の化合物。

10

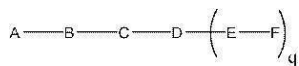
〔 8 1 〕

前記共役基は修飾オリゴヌクレオチドに共有結合で結合されている、請求項 1 ～ 8 0 のいずれかに記載の化合物。

〔 8 2 〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化 1 0 0 1 3】



20

ここで、

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は切断可能部分であり、

C は共役リンカーであり、

D は分岐基であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、

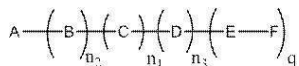
q は 1 ～ 5 の整数である、

請求項 1 ～ 8 1 のいずれかに記載の化合物。

〔 8 3 〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化 1 0 0 1 4】



ここで、

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は切断可能部分であり、

C は共役リンカーであり、

D は分岐基であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、

各 n は独立して 0 または 1 であり、

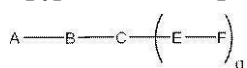
q は 1 ～ 5 の整数である、

請求項 1 ～ 8 1 のいずれかに記載の化合物。

〔 8 4 〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化 1 0 0 1 5】



50

ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Bは切断可能部分であり、

Cは共役リンカーであり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

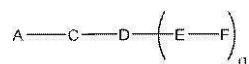
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔85〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化10016】



10

ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Cは共役リンカーであり、

Dは分岐基であり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

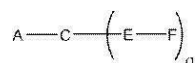
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔86〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化10017】



20

ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Cは共役リンカーであり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

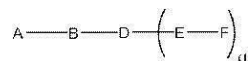
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔87〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化10018】



30

40

ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Bは切断可能部分であり、

Dは分岐基であり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

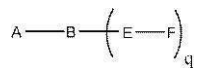
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔88〕

50

以下の式によって表される構造を有し、
【化 1 0 0 1 9】



ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Bは切断可能部分であり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

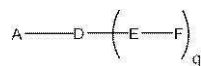
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔 8 9 〕

以下の式によって表される構造を有し、

【化 1 0 0 2 0】



ここで、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Dは分岐基であり、

各Eはテザーであり、

各Fはリガンドであり、

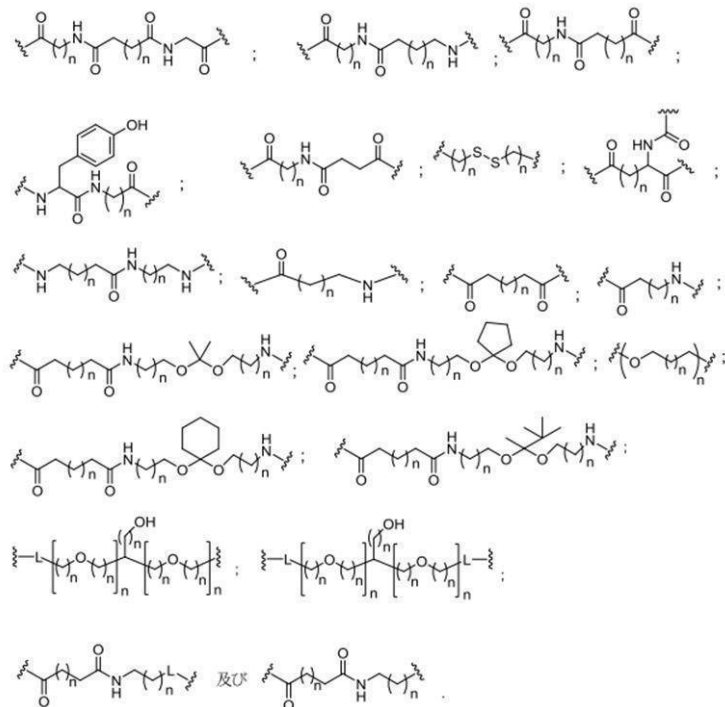
qは1～5の整数である、

請求項1～81のいずれかに記載の化合物。

〔 9 0 〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【化 1 0 0 2 1】



ここで、各Lは、独立して、リン共役基または中性の共役基であり、

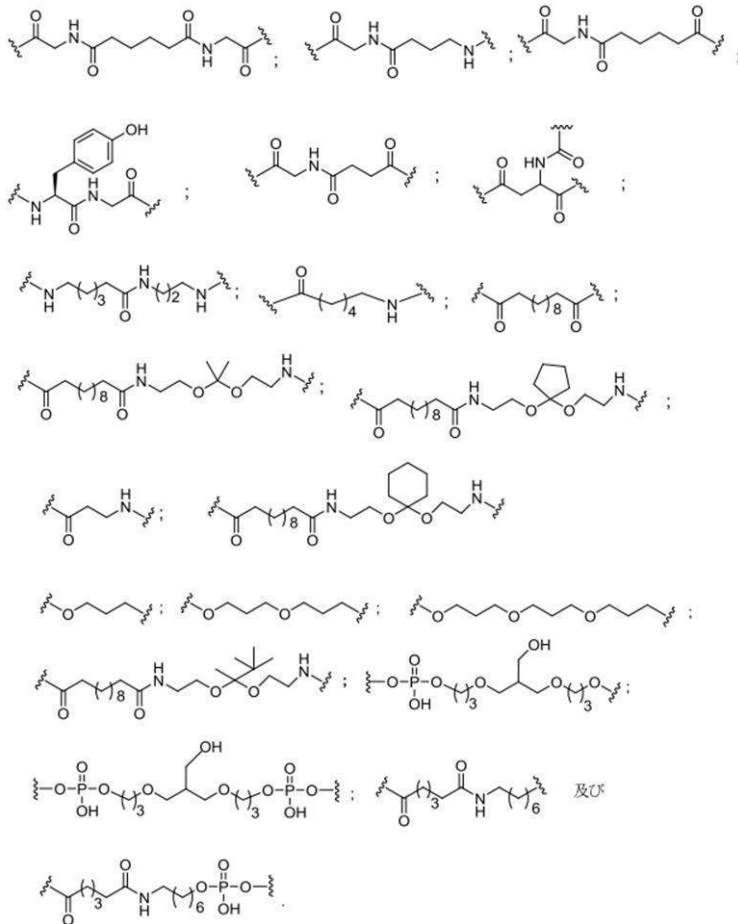
各nは独立して1～20である、

請求項 8 2 ～ 8 9 のいずれかに記載の化合物。

〔 9 2 〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 3 ～ 9 0 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 2 2 〕



10

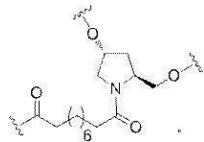
20

30

〔 9 3 〕

前記共役リンカーは以下の構造を有する、請求項 8 3 ～ 9 0 のいずれかに記載の化合物：

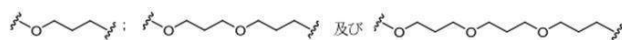
【化 1 0 0 2 3 〕



〔 9 4 〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 3 ～ 9 0 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 2 4 〕



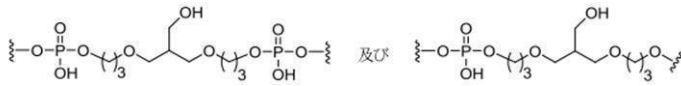
40

〔 9 5 〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 3 ～ 9 0 のいずれかに記載の化合物：

50

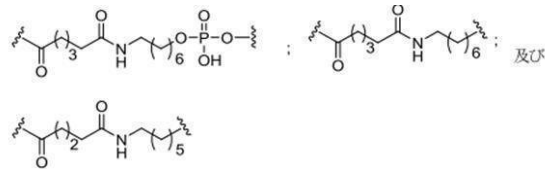
【化 1 0 0 2 5】



〔 9 6 〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 3 ～ 9 0 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 2 6】



10

〔 9 7 〕

前記共役リンカーはピロリジンを含む、請求項 8 3 ～ 9 6 のいずれかに記載の化合物。

〔 9 8 〕

前記共役リンカーはピロリジンを含まない、請求項 8 3 ～ 9 6 のいずれかに記載の化合物。

〔 9 9 〕

前記共役リンカーは P E G を含む、請求項 8 3 ～ 9 8 のいずれかに記載の化合物。

20

〔 1 0 0 〕

前記共役リンカーはアミドを含む、請求項 8 3 ～ 9 9 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 1 〕

前記共役リンカーは、少なくとも 2 つのアミドを含む、請求項 8 3 ～ 9 9 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 2 〕

前記共役リンカーはアミドを含まない、請求項 8 3 ～ 9 9 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 3 〕

前記共役リンカーはポリアミドを含む、請求項 8 3 ～ 1 0 2 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 4 〕

前記共役リンカーはアミンを含む、請求項 8 3 ～ 1 0 3 のいずれかに記載の化合物。

30

〔 1 0 5 〕

前記共役リンカーは、2 つ以上のジスルフィド結合を含む、請求項 8 3 ～ 1 0 4 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 6 〕

前記共役リンカーはタンパク質結合部分を含む、請求項 8 3 ～ 1 0 5 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 0 7 〕

前記タンパク質結合部分は脂質を含む、請求項 1 0 6 に記載の化合物。

〔 1 0 8 〕

前記タンパク質結合部分は、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3-ビス- O (ヘキサデシル) グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O 3- (オレオイル) リトコール酸、O 3- (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、ビタミン (例えば、葉酸、ビタミン A、ビタミン E、ビオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物 (例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム溶解成分、ステロイド (例えば、ウバオール、h e c i g e n i n、ジオスゲニン)、テルペン (例えば、トリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデリノール誘導体化リトコール酸)、またはカチオン性脂質のなかから選択

40

50

される、請求項 106 に記載の化合物。

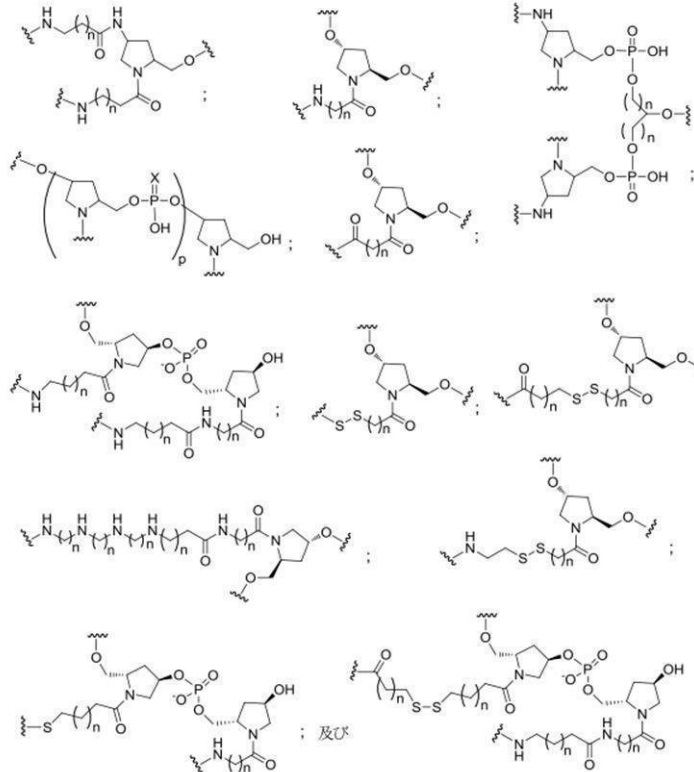
〔109〕

前記タンパク質結合部分は、C16～C22 長鎖の飽和もしくは不飽和脂肪酸、コレステロール、コール酸、ビタミン E、アダマンタンまたは 1-ペンタフルオロプロピルのなかから選択される請求項 106 に記載の化合物。

〔110〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【化 10027】



10

20

30

ここで、各 n は独立して 1～20 であり、 p は 1 から 6 である、請求項 82～109 のいずれかに記載の化合物。

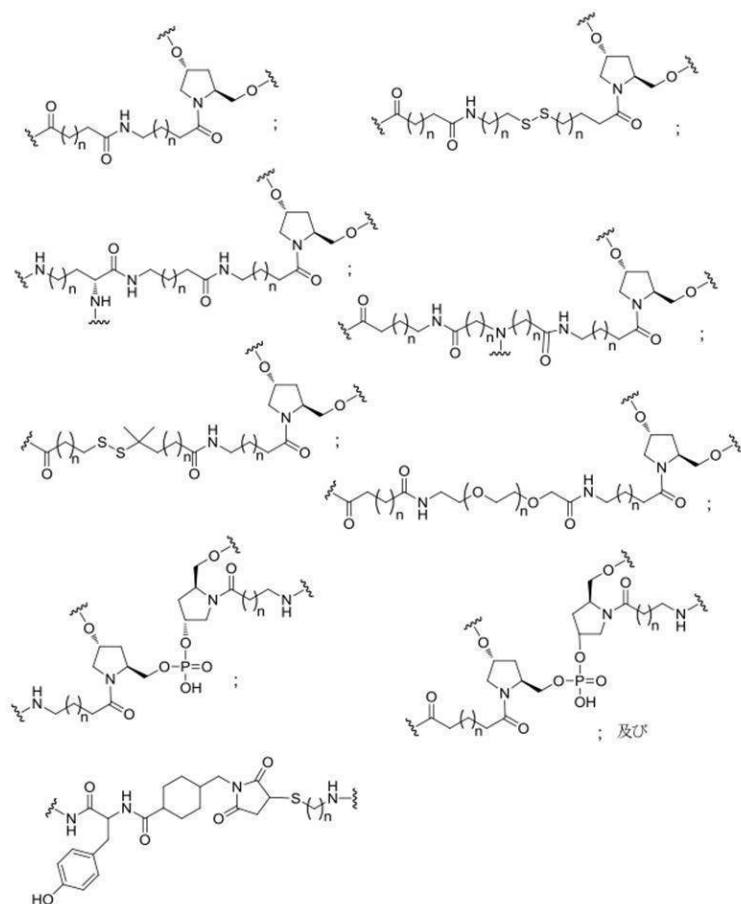
〔111〕

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

40

50

【化 1 0 0 2 8】



10

20

ここで、各 n は独立して 1 ～ 20 である、
請求項 82 ～ 110 のいずれかに記載の化合物。

【 1 1 2】

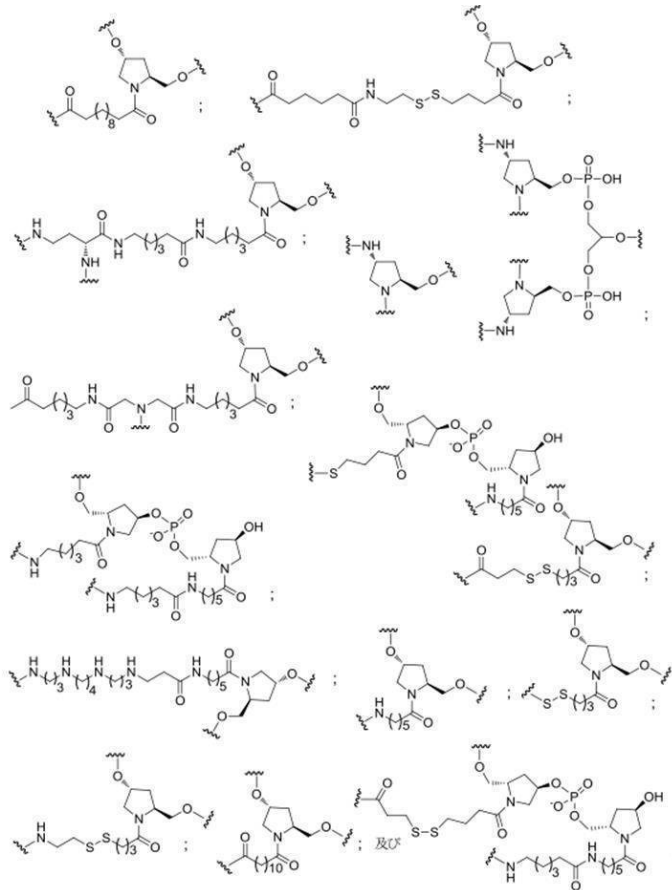
前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 82 ～ 110 の
いずれかに記載の化合物：

30

40

50

【化 1 0 0 2 9】



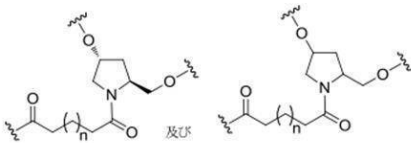
10

20

【 1 1 3】

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【化 1 0 0 3 0】



30

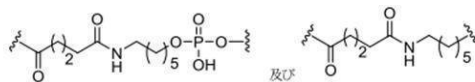
n は 1 ～ 2 0 である、

請求項 8 2 ～ 1 1 0 のいずれかに記載の化合物。

【 1 1 4】

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 0 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 3 1】

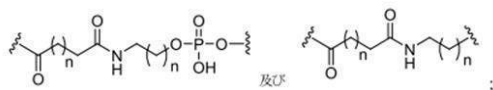


40

【 1 1 5】

前記共役リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【化 1 0 0 3 2】



ここで、各 n は独立して、0、1、2、3、4、5、6、または 7 である、

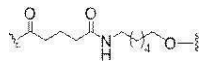
50

請求項 8 2 ～ 1 1 0 のいずれかに記載の化合物。

{ 1 1 6 }

前記共役リンカーは、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 0 のいずれかに記載の化合物：

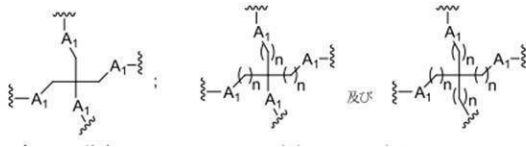
【化 1 0 0 3 3】



{ 1 1 7 }

前記分枝基は、以下の構造の 1 つを有し、

【化 1 0 0 3 4】



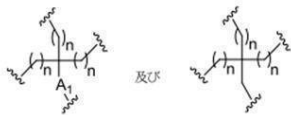
ここで、各 A_1 は独立して O、S、C=O または NH であり、
各 n は独立して 1 ～ 20 である、

請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物。

{ 1 1 8 }

前記分枝基は以下の構造の 1 つを有し、

【化 1 0 0 3 5】



各 A_1 は独立して O、S、C=O または NH であり、

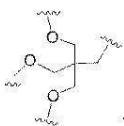
各 n は独立して 1 ～ 20 である、

請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物。

{ 1 1 9 }

前記分枝基は、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：

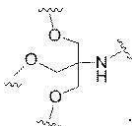
【化 1 0 0 3 6】



{ 1 2 0 }

前記分枝基は以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：

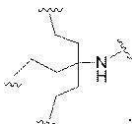
【化 1 0 0 3 7】



{ 1 2 1 }

前記分枝基は、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 3 8】



10

20

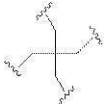
30

40

50

〔 1 2 2 〕

前記分枝基は、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：
【化 1 0 0 3 9】

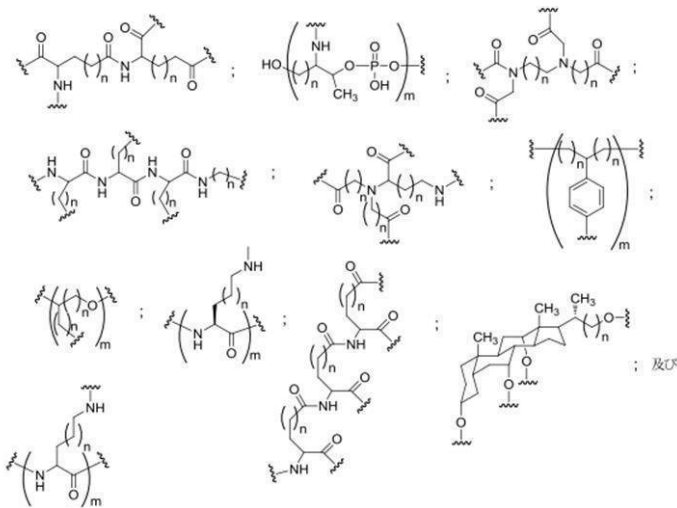


〔 1 2 3 〕

前記分岐基はエーテルを含む、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 2 4 〕

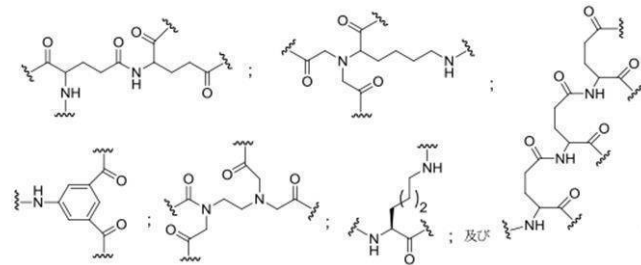
前記分枝基は、以下の構造を有し、
【化 1 0 0 4 0】



ここで、各 n は独立して 1 ～ 2 0 であり、
 m は 2 から 6 である、
請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物。

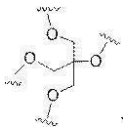
〔 1 2 5 〕

前記分枝基は、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：
【化 1 0 0 4 1】



〔 1 2 6 〕

前記分枝基は、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 1 6 のいずれかに記載の化合物：
【化 1 0 0 4 2】



〔 1 2 7 〕

前記分岐基は以下を含み、

10

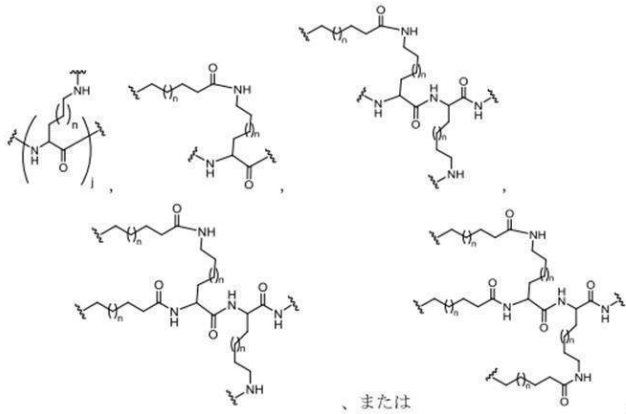
20

30

40

50

【化10043】



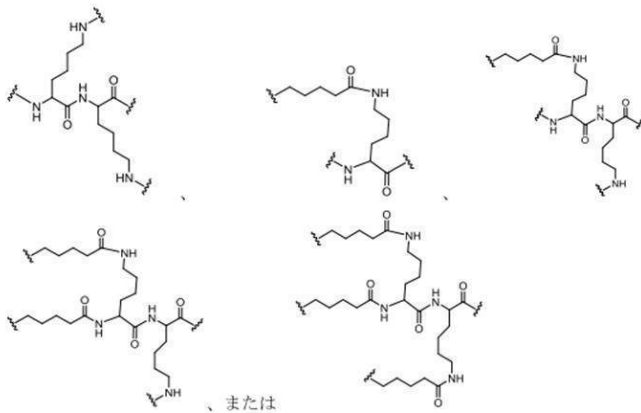
10

ここで、各 j は1から3の整数であり、
 前記各 n は1から20の整数である、
 請求項82～116のいずれかに記載の化合物。

〔128〕

前記分岐基は以下を含む請求項82～116のいずれかに記載の化合物：

【化10044】

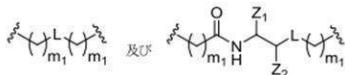


20

〔129〕

各テザーは、以下のなかから選択され、

【化10045】



ここで、 L は、リン共役基及び中性の共役基から選択され、

Z_1 は $C(=O)OR_2$ であり、

Z_2 は、 H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

R_2 は H 、 C_1-C_6 アルキルまたは置換 C_1-C_6 アルキルであり、

各 m_1 は独立して0～20であり、少なくとも1つの m_1 は各テザーにつき0よりも大きい、

請求項82～128のいずれかに記載の化合物。

〔130〕

各テザーは、以下のなかから選択され、

【化10046】



40

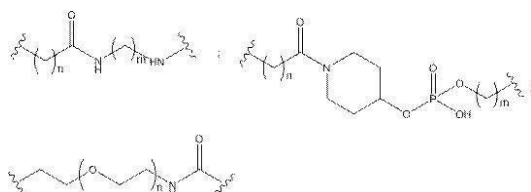
50

Z₂ は H または C H₃ であり、
各 m₂ は独立して 0 ～ 20 であり、少なくとも 1 つの m₂ は各テザーにつき 0 よりも大きい、
請求項 82 ～ 128 のいずれかに記載の化合物。

(1 3 1)

各テザーは、以下のなかから選択され、

【化 1 0 0 4 7】



n は 1 ～ 12 であり、
m は 1 ～ 12 である、
請求項 82 ～ 128 のいずれかに記載の化合物。

[1 3 2]

少なくとも1つのテザーはエチレングリコールを含む、請求項82～128のいずれかに記載の化合物。

[1 3 3]

少なくとも1つのテザーはアミドを含む、請求項82～128または130のいずれかに記載の化合物。

(1 3 4)

少なくとも1つのテザーはポリアミドを含む、請求項82～128または130のいずれかに記載の化合物。

(1 3 5)

少なくとも1つのテザーはアミンを含む、請求項82～128または130のいずれかに記載の化合物。

(1 3 6)

少なくとも2つのテザーは互いに異なっている、請求項82～128または130のいずれかに記載の化合物。

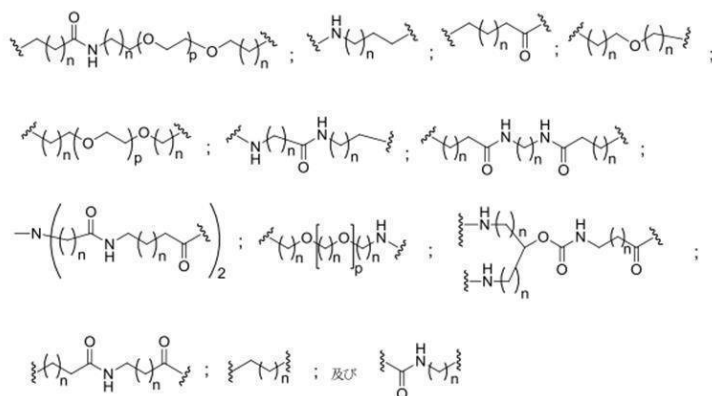
[1 3 7]

テザーの全ては互いに同じである、請求項 82～128 または 130 のいずれかに記載の化合物。

[1 3 8]

各テザーは、以下のなかから選択され、

【化 1 0 0 4 8】



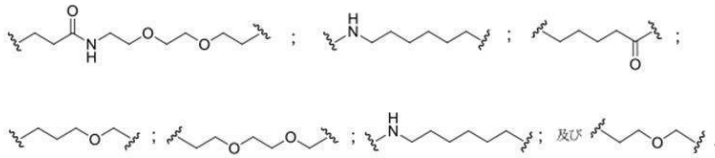
ここで、各 n は独立して $1 \sim 20$ であり、
各 p は 1 から約 6 である、

請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 3 9 〕

各テザーは、以下のなかから選択される、請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 4 9 〕

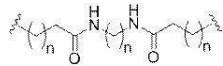


10

〔 1 4 0 〕

各テザーは、以下の構造を有し、

【化 1 0 0 5 0 〕



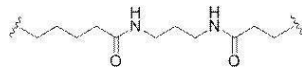
各 n は独立して 1 ～ 2 0 である、

請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 4 1 〕

各テザーは、以下の構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 5 1 〕



20

〔 1 4 2 〕

前記テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【化 1 0 0 5 2 〕



30

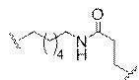
各 n は独立して、0、1、2、3、4、5、6、または 7 である、

請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 4 3 〕

前記テザーは、以下のなかから選択される構造を有する、請求項 8 2 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の化合物：

【化 1 0 0 5 3 〕



〔 1 4 4 〕

前記リガンドはガラクトースである、請求項 1 4 0 ～ 1 4 3 のいずれかに記載の化合物。

〔 1 4 5 〕

前記リガンドはマンノースー 6 -リン酸である、請求項 1 4 0 ～ 1 4 3 のいずれかに記載の化合物。

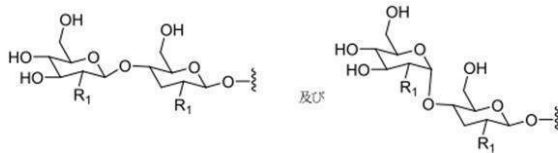
〔 1 4 6 〕

各リガンドは以下のなかから選択され、

40

50

【化１００５４】

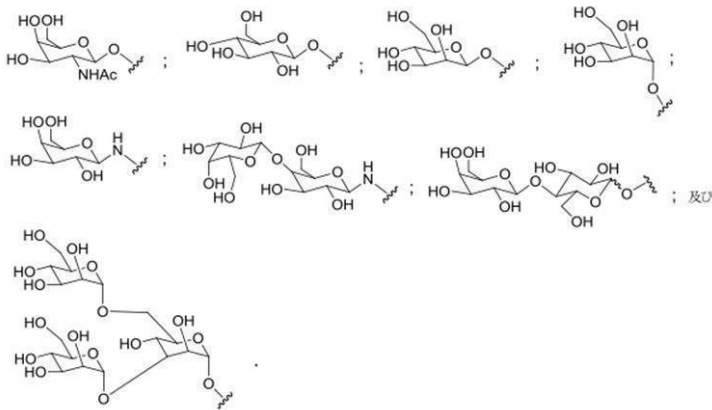


各 R₁ は OH 及び NHCOOH から選択される、
請求項 140～143 のいずれかに記載の化合物。

〔１４７〕

各リガンドは以下のなかから選択される、請求項 140～143 のいずれかに記載の化合物：

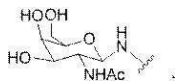
【化１００５５】



〔１４８〕

各リガンドは以下の構造を有する、請求項 140～143 のいずれかに記載の化合物：

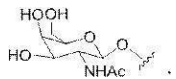
【化１００５６】



〔１４９〕

各リガンドは以下の構造を有する、請求項 140～143 のいずれかに記載の共役されるアンチセンス化合物：

【化１００５７】



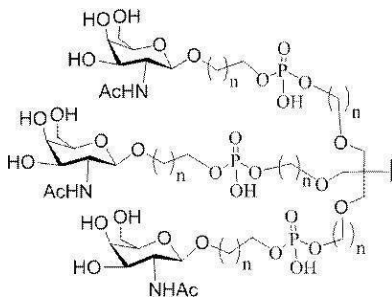
〔１５０〕

前記共役基は細胞標的化部分を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔１５１〕

前記共役基は以下の構造を有する細胞標的化部分を含み、

【化１００５８】



10

20

30

40

50

(1 5 2)

【化 1 0 0 5 9】



【化 1 0 0 6 0】



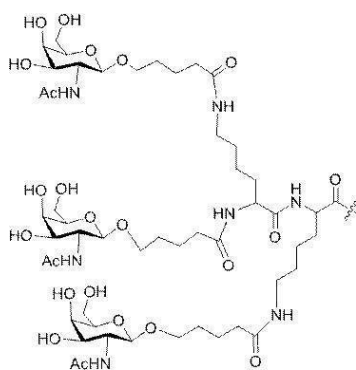
(1 5 4)

【化 1 0 0 6 1】



前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 150 に記載の化合物：

【化１００６２】

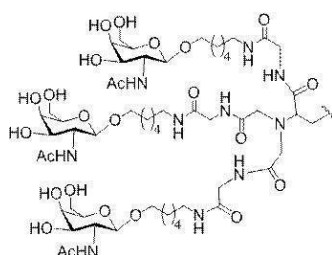


10

〔１５６〕

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項１５０に記載の化合物：

【化１００６３】

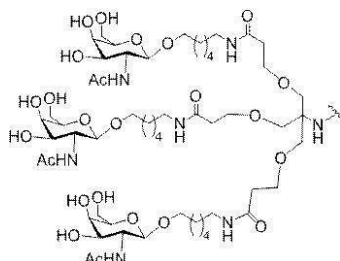


20

〔１５７〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項１５０に記載の化合物：

【化１００６４】

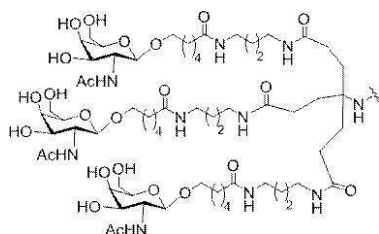


30

〔１５８〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項１５０に記載の化合物：

【化１００６５】



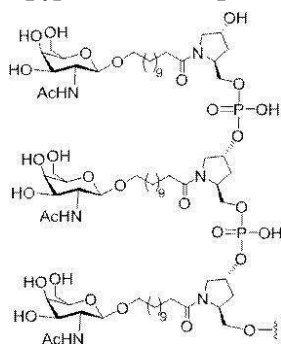
40

〔１５９〕

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項１５０に記載の化合物：

50

【化10066】

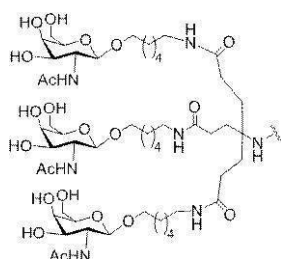


10

〔160〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項150に記載の化合物：

【化10067】

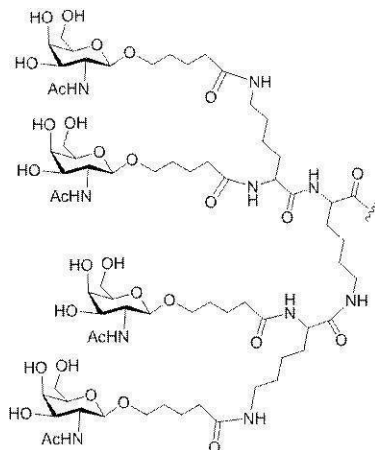


20

〔161〕

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項150に記載の化合物：

【化10068】

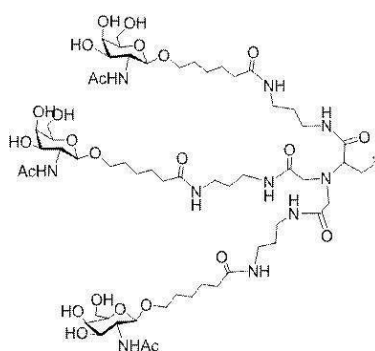


30

〔162〕

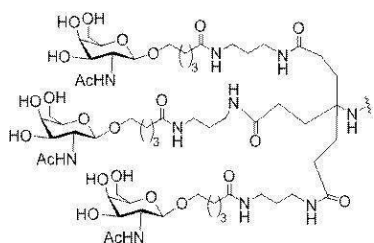
前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項150に記載の化合物：

【化10069】



50

【化 1 0 0 7 4】

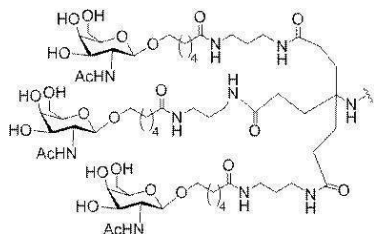


(1 6 8)

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項１５０に記載の化合物：

10

【化 1 0 0 7 5】

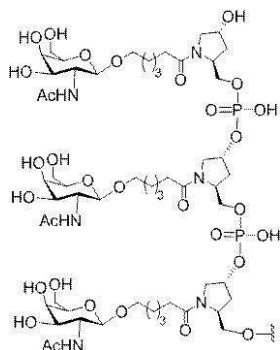


[1 6 9]

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 150 に記載の化合物：

20

【化 1 0 0 7 6】

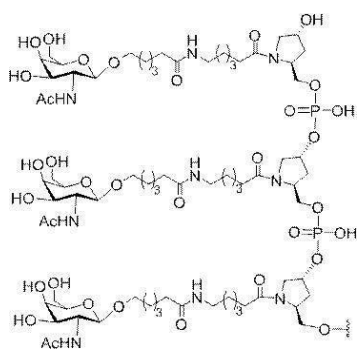


30

$$\{170\}$$

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 150 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 7】

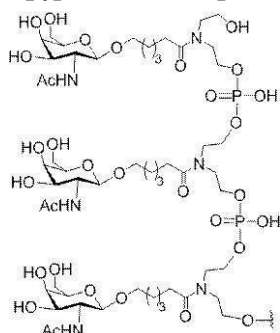


40

(1 7 1)

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 150 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 8】

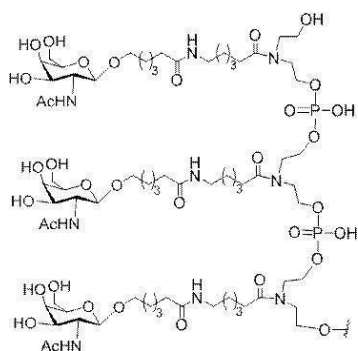


10

〔 1 7 2 〕

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 1 5 0 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 9】

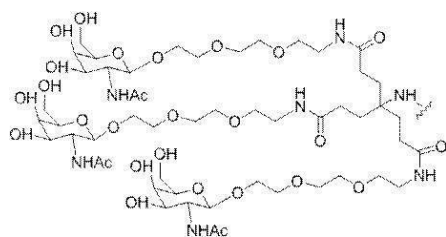


20

〔 1 7 3 〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項 1 5 0 に記載の化合物：

【化 1 0 0 8 0】

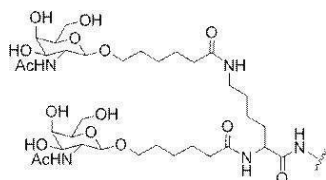


30

〔 1 7 4 〕

前記細胞標的化部分は以下を含む、請求項 1 5 0 に記載の化合物：

【化 1 0 0 8 1】

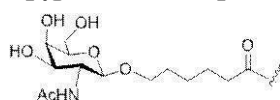


40

〔 1 7 5 〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有する、請求項 1 5 0 に記載の化合物：

【化 1 0 0 8 2】

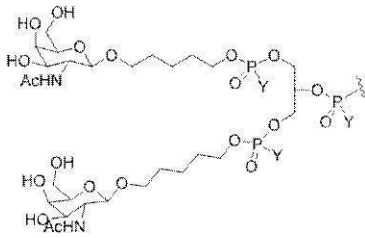


〔 1 7 6 〕

50

前記細胞標的化部分は以下を含み、

【化１００８３】



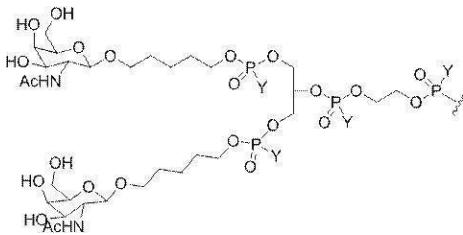
各 Y は、O、S、置換もしくは非置換 C₁－C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される、請求項 150 に記載の化合物。

10

〔１７７〕

前記共役基は以下を含み、

【化１００８４】



20

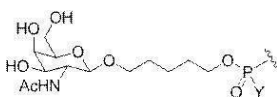
；

各 Y は、O、S、置換もしくは非置換 C₁－C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される、請求項 150 に記載の化合物。

〔１７８〕

前記細胞標的化部分は以下の構造を有し、

【化１００８５】



30

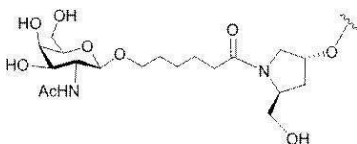
；

各 Y は、O、S、置換もしくは非置換 C₁－C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される、請求項 150 に記載の化合物。

〔１７９〕

前記共役基は以下を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物：

【化１００８６】

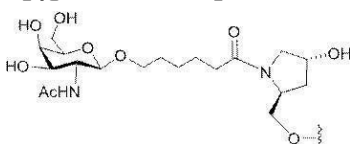


40

〔１８０〕

前記共役基は以下を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物：

【化１００８７】

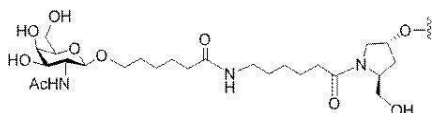


〔１８１〕

50

前記共役基は以下を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物：

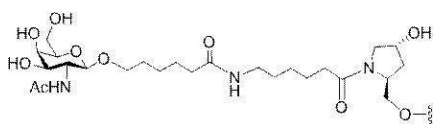
【化10088】



〔182〕

前記共役基は以下を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物：

【化10089】



10

〔183〕

前記共役基は、ホスホジエステル、アミド、またはエステルのなかから選択される切断可能部分を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔184〕

前記共役基は、ホスホジエステル切断可能部分を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔185〕

前記共役基は、切断可能部分を含まず、前記共役基は、前記共役基と前記オリゴヌクレオチドの間にホスホロチオエート結合を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

20

〔186〕

前記共役基はアミド切断可能部分を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

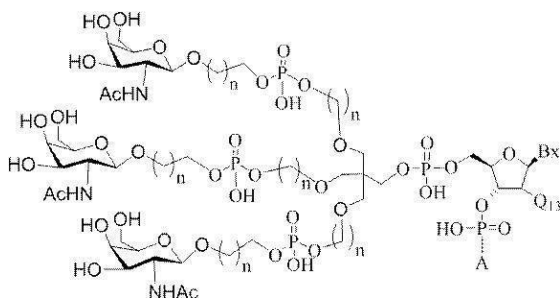
〔187〕

前記共役基は、エステル切断可能部分を含む、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔188〕

以下の構造を有し、

【化10090】



30

各 n は独立して 1～20 であり、

Q_{13} は H または $O(CH_2)_2OCH_3$ であり、

40

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

Bx は複素環式塩基部分である、

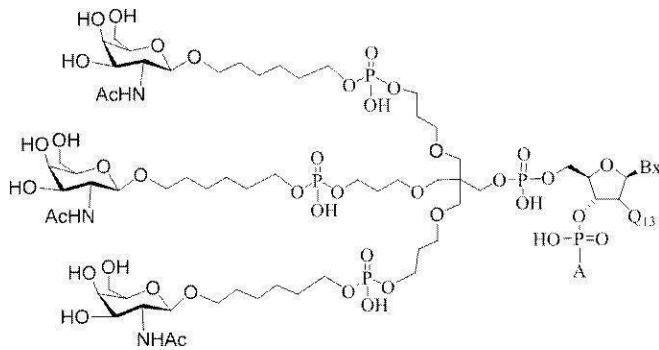
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔189〕

以下の構造を有し、

50

【化10091】



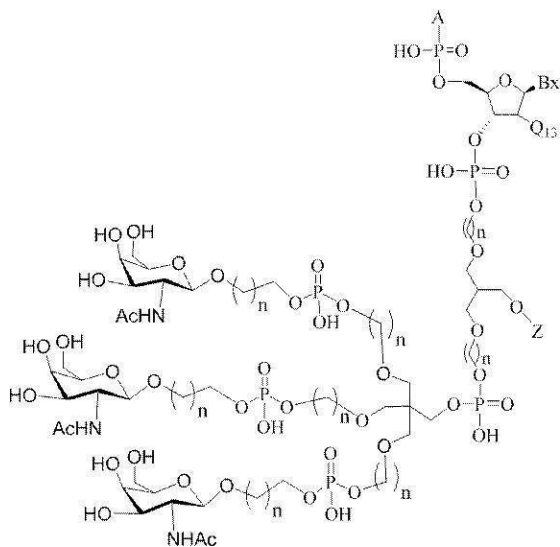
10

各 n は独立して 1 ～ 20 であり、
 Q_{13} は H または $O(CH_2)_2OCH_3$ であり、
 A は修飾オリゴヌクレオチドであり、
 Bx は複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔190〕

以下の構造を有し、

【化10092】



20

30

各 n は独立して 1 ～ 20 であり、
 Q_{13} は H または $O(CH_2)_2OCH_3$ であり、
 A は修飾オリゴヌクレオチドであり、
 Z は、H または連結された固体支持体であり、
 Bx は複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

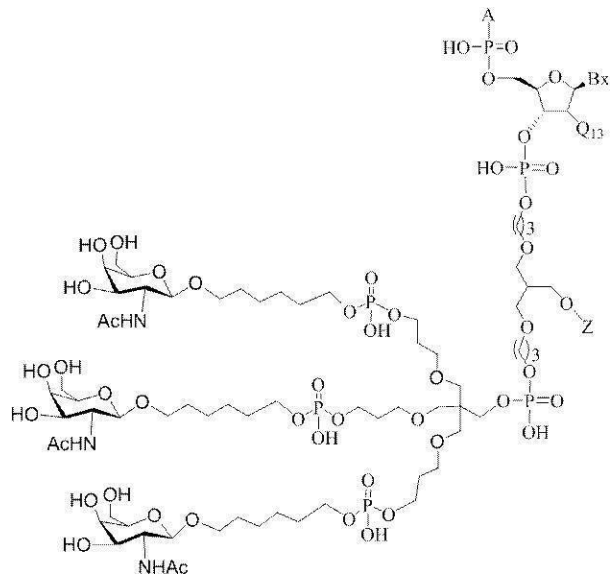
40

〔191〕

以下の構造を有し、

50

【化10093】



10

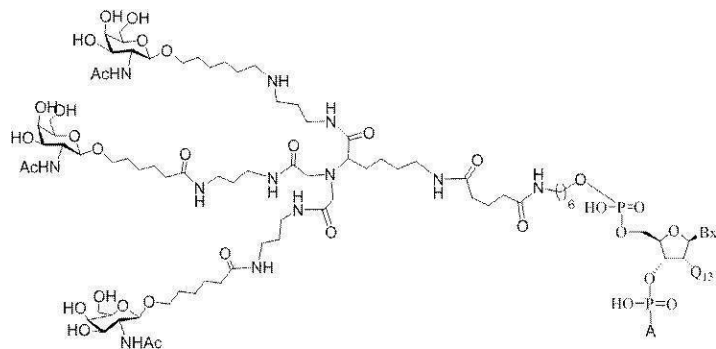
各 n は独立して 1 ～ 20 であり、
 Q_{13} は H または $O(CH_2)_2OCH_3$ であり、
 A は修飾オリゴヌクレオチドであり、
 Z は、H または連結された固体支持体であり、
 Bx は複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

20

〔192〕

以下の構造を有し、

【化10094】



30

Q_{13} は H または $O(CH_2)_2OCH_3$ であり、
 A は修飾オリゴヌクレオチドであり、
 Bx は複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

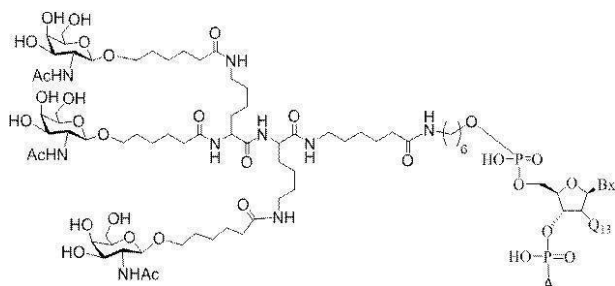
40

〔193〕

以下の構造を有し、

50

【化10095】

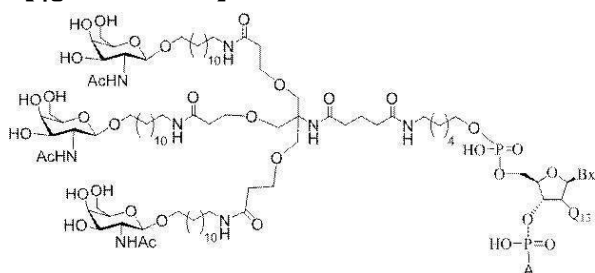


、
Q13はHまたはO(CH₂)₂−OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔194〕

以下の構造を有し、

【化10096】

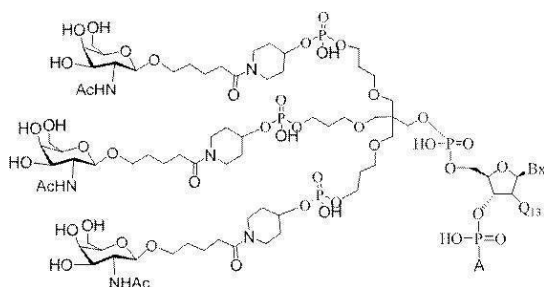


、
Q13はHまたはO(CH₂)₂−OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔195〕

以下の構造を有し、

【化10097】



Q13はHまたはO(CH₂)₂−OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
 前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔196〕

以下の構造を有し、

10

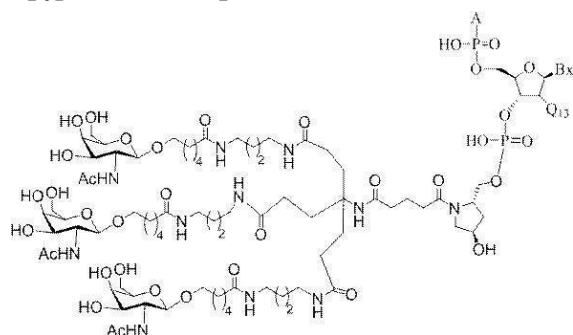
20

30

40

50

【化10098】



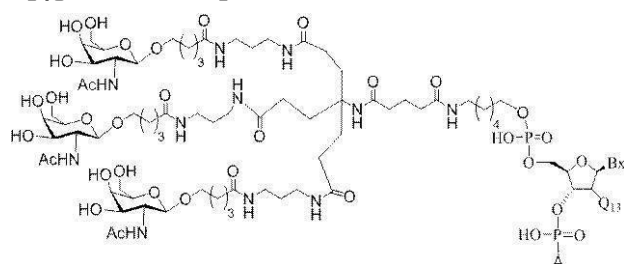
10

Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔197〕

以下の構造を有し、

【化10099】



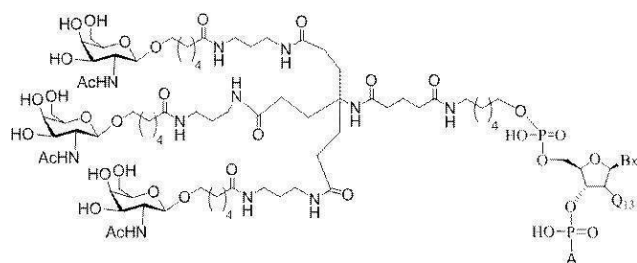
20

Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔198〕

以下の構造を有し、

【化100100】



40

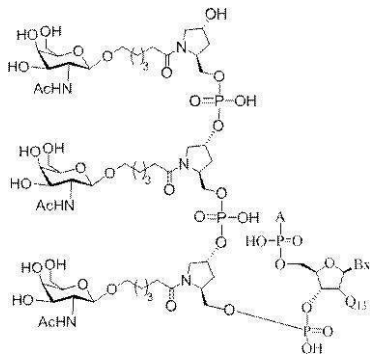
Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔199〕

以下の構造を有し、

50

【化100101】



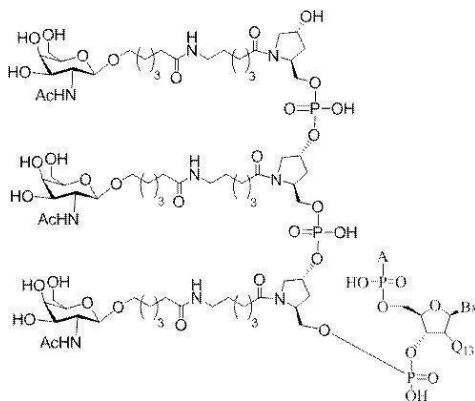
10

Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔200〕

以下の構造を有し、

【化100102】



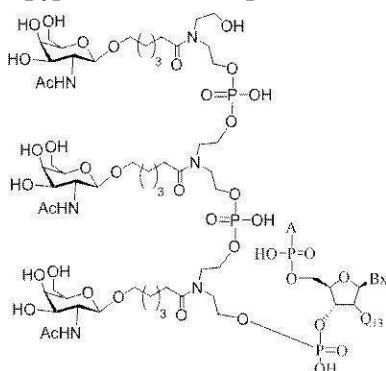
20

Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔201〕

以下の構造を有し、

【化100103】



40

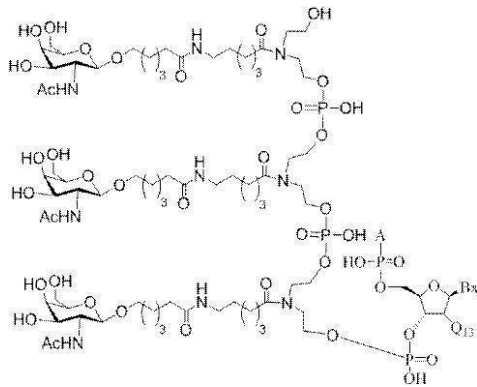
Q13はHまたはO(CH₂)₂OCH₃であり、
Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、
Bxは複素環式塩基部分である、
前記請求項のいずれかに記載の化合物。

50

〔 2 0 2 〕

以下の構造を有し、

【化 1 0 0 1 0 4】



10

Q 1 3 は H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

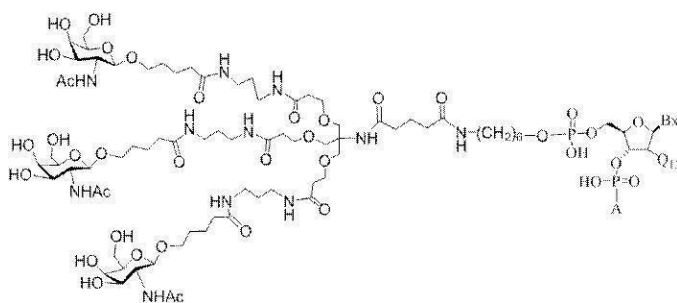
B x は複素環式塩基部分である、

前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔 2 0 3 〕

前記共役基は以下を含み、

【化 1 0 0 1 0 5】



20

Q 1 3 は H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

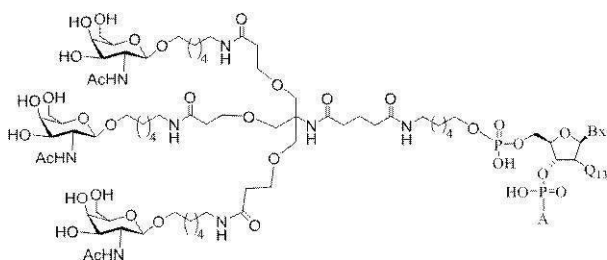
B x は複素環式塩基部分である、

前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔 2 0 4 〕

前記共役基は以下を含み、

【化 1 0 0 1 0 6】



30

Q 1 3 は H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

A は修飾オリゴヌクレオチドであり、

B x は複素環式塩基部分である、

前記請求項のいずれかに記載の化合物。

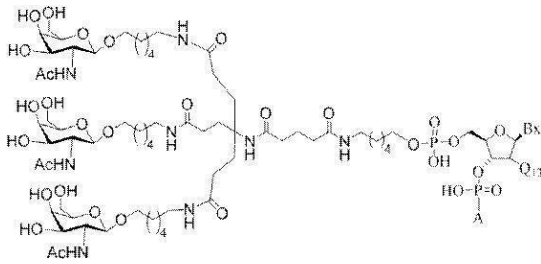
〔 2 0 5 〕

40

50

前記共役基は以下を含み、

【化100107】



10

Q13はHまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、

Aは修飾オリゴヌクレオチドであり、

Bxは複素環式塩基部分である、

前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔206〕

Bxは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、またはシトシンまたは5-メチルシトシンのなかから選択される、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔207〕

Bxはアデニンである、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔208〕

Bxはチミンである、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

20

〔209〕

Q13はO(CH₂)₂-OCH₃である、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

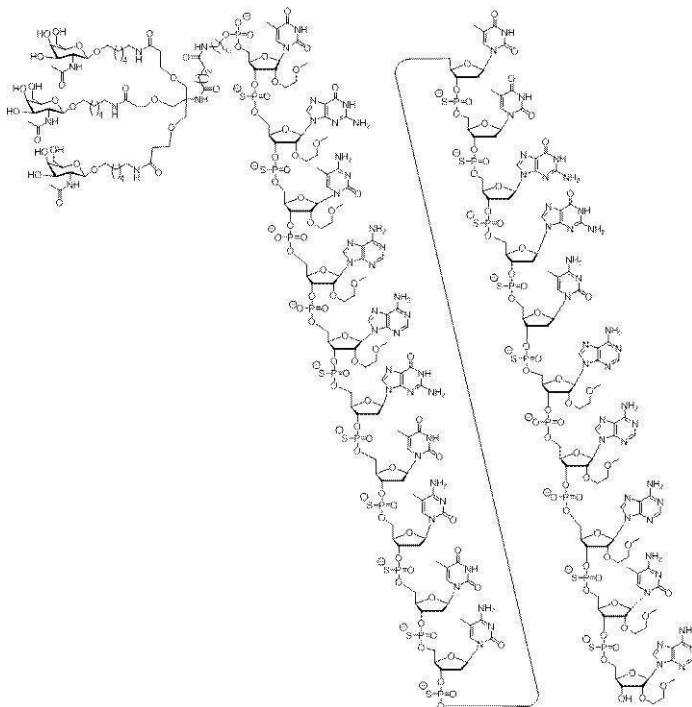
〔210〕

Q13はHである、前記請求項のいずれかに記載の化合物。

〔211〕

以下に記載の修飾オリゴヌクレオチドからなる化合物：

【化100108】



30

40

〔212〕

前記請求項のいずれかに記載の化合物またはその塩、及び医薬的に許容される担体または希釈剤の少なくとも1つを含む組成物。

50

〔 2 1 3 〕

請求項 1 ～ 2 1 2 のいずれかの化合物を含むプロドラッグ。

〔 2 1 4 〕

前記請求項のいずれかに記載の化合物またはその塩、及び医薬的に許容される担体または希釈剤の少なくとも 1 つを含む組成物。

〔 2 1 5 〕

動物に前記請求項のいずれかに記載の化合物または組成物を投与することを含む方法。

〔 2 1 6 〕

前記動物はヒトである、請求項 2 1 5 に記載の方法。

〔 2 1 7 〕

前記化合物を投与することにより P K K 関連疾患、障害または病態を予防、治療、または改善する、請求項 2 1 5 または 2 1 6 に記載の方法。

〔 2 1 8 〕

前記 P K K 関連疾患、障害または病態は、遺伝性血管浮腫（H A E）、浮腫、血管浮腫、腫脹、目蓋の血管浮腫、眼の浮腫、黄斑浮腫、脳浮腫、血栓症、塞栓症、血栓塞栓症、深部静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、脳卒中、または梗塞である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔 2 1 9 〕

炎症性疾患または血栓塞栓性疾患を治療するための医薬品を製造するための前記請求項のいずれかに記載の化合物または組成物の使用。

【配列表】

0007127076000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/7115	
C 0 7 H	21/04 (2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	C 0 7 H	21/04	Z C S P
C 0 7 K	5/068(2006.01)	A 6 1 K	47/54	
		C 0 7 K	5/068	

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/088,459

(32)優先日 平成26年12月5日(2014.12.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 ブラカシュ, タジャ・ピー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 セス, プニット・ピー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 スウェイジ, エリック・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 フレアー, スーザン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 ブイ, フィン・ホア

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0, カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 3 8 0 8 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 2 / 1 7 0 9 4 5 (WO, A 2)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 3 2 3 0 (WO, A 1)

特表 2 0 1 7 - 5 1 8 0 4 5 (JP, A)

特表 2 0 1 6 - 5 3 3 7 5 1 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (STN)