

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7500426号
(P7500426)

(45)発行日 令和6年6月17日(2024.6.17)

(24)登録日 令和6年6月7日(2024.6.7)

(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
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071 Z N A
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7115
A 6 1 K	31/7112(2006.01)	A 6 1 K	31/712
請求項の数 21 (全74頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-544270(P2020-544270)	(73)特許権者	391015708
(86)(22)出願日	平成31年2月21日(2019.2.21)		ブリistol-マイヤーズ スクイブ カン
(65)公表番号	特表2021-513861(P2021-513861 A)		パニー
(43)公表日	令和3年6月3日(2021.6.3)		BRISTOL-MYERS SQUI
(86)国際出願番号	PCT/US2019/018947		BB COMPANY
(87)国際公開番号	WO2019/165067		アメリカ合衆国08543ニュージャー
(87)国際公開日	令和1年8月29日(2019.8.29)		ジー州 プリンストン、ルート206ア
審査請求日	令和4年2月18日(2022.2.18)		ンド・プロビンス・ライン・ロード
(31)優先権主張番号	62/633,502	(73)特許権者	504013269
(32)優先日	平成30年2月21日(2018.2.21)		ロシュ・イノベーション・センター・コ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ペンハーゲン・アクティーゼルスカブ
(31)優先権主張番号	62/635,954		Roche Innovation Ce
(32)優先日	平成30年2月27日(2018.2.27)		nter Copenhagen A/S
最終頁に続く			デンマーク、デーコー-2970ヘアス
			ホルム、フレムティズヴァイ3番
			最終頁に続く
(54)【発明の名称】 C A M K 2 Dアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその使用			

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1688に記載の連続するヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）であって、ヒト細胞におけるカルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ型デルタ（CAMK2D）タンパク質および／またはCAMK2D転写物の発現を低下させる事ができる、ASO。

【請求項2】

CAMK2D転写物が、配列番号1および配列番号2からなる群から選択される、請求項1記載のASO。

【請求項3】

ASOがギャップマーである、請求項1または2に記載のASO。

【請求項4】

ASOが1以上のヌクレオシドアナログを含み、該ヌクレオシドアナログの1以上が糖修飾ヌクレオシドアナログである、請求項1～3いずれか1項記載のASO。

【請求項5】

ヌクレオシドアナログが、2'-O-アルキル-RNA；2'-O-メチルRNA(2'-OMe)；2'-アルコキシ-RNA；2'-O-メトキシエチル-RNA(2'-MOE)；2'-アミノ-DNA；2'-フルオロ-RNA；2'-フルオロ-DNA；アラビノ核酸(ANA)；2'-フルオロ-ANA；または二環式ヌクレオシドアナログ(LNA)を含む、請求項4記載のASO。

【請求項 6】

糖修飾ヌクレオシドが、親和性増強 2'糖修飾ヌクレオシドである、請求項 4 記載の A S O。

【請求項 7】

親和性増強 2'糖修飾ヌクレオシドが L N A であり、ここで、該 L N A が、拘束性エチルヌクレオシド(c E t)、2',4'-拘束性 2'-O-メトキシエチル(c M O E)、 α -L-L N A、 β -D-L N A、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸(E N A)、アミノ-L N A、オキシ-L N A、チオ-L N A またはそれらの任意の組み合わせ、からなる群から選択される、請求項 6 記載の A S O。

【請求項 8】

A S O が、1 以上の 5'-メチル-シトシン核酸塩基を含む、請求項 1～7 いずれか 1 項記載の A S O。

【請求項 9】

連続するヌクレオチド配列が、1 以上の修飾されたインターヌクレオシド結合を含む、請求項 1～8 いずれか 1 項記載の A S O。

【請求項 10】

1 以上の修飾されたインターヌクレオシド結合がホスホロチオエート結合である、請求項 9 記載の A S O。

【請求項 11】

A S O が、少なくとも 1 つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部分に共有結合している、請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O を含むコンジュゲート。

【請求項 12】

請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O あるいは請求項 11 記載のコンジュゲートと、医薬的に許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む、医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O、請求項 11 記載のコンジュゲートまたは請求項 12 記載の医薬組成物、および使用説明書を含む、キット。

【請求項 14】

C A M K 2 D タンパク質および／または C A M K 2 D 転写物（例えば m R N A）の細胞における発現をインビトロにおいて阻害または低下させる方法であって、C A M K 2 D タンパク質および／または C A M K 2 D 転写物を発現する細胞に、請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O、請求項 11 記載のコンジュゲートまたは請求項 12 記載の医薬組成物を接触させることを特徴とし、接触後に C A M K 2 D タンパク質および／または C A M K 2 D 転写物の細胞における発現が阻害または低下される、方法。

【請求項 15】

それが必要な対象における心血管系疾患または障害の 1 以上の症状を軽減、改善または治療するための、請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O、請求項 11 記載のコンジュゲートまたは請求項 12 記載の医薬組成物。

【請求項 16】

治療における使用のための、請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O、請求項 11 記載のコンジュゲートまたは請求項 12 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

それが必要な対象における心血管系疾患または障害を治療するための医薬品の製造のための、請求項 1～10 いずれか 1 項記載の A S O、請求項 11 記載のコンジュゲートまたは請求項 12 記載の医薬組成物の使用。

【請求項 18】

心血管系疾患または障害が、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓性疾患、静脈血栓症またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 15 記載の A S O、コンジュゲートまたは医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

対象がヒトである、請求項 15 記載の A S O、コンジュゲートまたは医薬組成物。

【請求項 20】

心血管系疾患または障害が、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓性疾患、静脈血栓症またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 17 記載の使用。

【請求項 21】

対象がヒトである、請求項 17 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【関連出願】

【0001】

(関連出願の相互参照)

E F S－W E B 経路による電子出願を行った配列表の参照

本願において提出した電子書式により提出済の配列表の内容(名称: 3338_102PC04_S equenceListing_ST25.txt, サイズ: 746,302 バイト; および作成日: 2019 年 2 月 20 日)は、出典明示によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

本明細書は、細胞内のカルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 型 δ (C A M K 2 D) 転写物を標的とし、C A M K 2 D タンパク質の発現を低下させるアンチセンスオリゴマー化合物(A S O)に関する。C A M K 2 D タンパク質の発現の低下は、心血管関連疾患または障害などの様々な医学的障害に有益であり得る。

20

【背景技術】

【0003】

カルシウム／カルモジュリン($C a^{2+}$ ／C a M)依存性セリン／スレオニンキナーゼ(C a M K)は、ヒトプロテアソームの 81 個のタンパク質ファミリーからなり、 $C a^{2+}$ シグナルを伝達することにより、細細胞シグナル伝達において中心的な役割を果たしている。約 30 のスプライス変異体に加えて、4 つの C a M K II アイソザイム(α 、 β 、 γ 、 δ) が、ヒトにおいて発現している[Braun, A.P., et al., Annual Review of Physiology 57:417-445(1995)]。これらの中で、C a M K II δ (「C A M K 2 D」) タンパク質は、心臓に最も多く存在するアイソフォームであり、正常な心臓生理学の興奮収縮結合(E C C)および弛緩プロセスにおいて重要な役割を果たしている[Mattiazzi A., et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 308:H1177-H1191 (2015)]。C A M K 2 D 活性は、特定の心臓関連傷害(例えば、虚血再灌流傷害)後の回復プロセスにおいて重要であることも記載されている[Said M., et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H1198-205 (2003)]。

30

【0004】

様々な科学的進歩にも拘らず、心臓関連疾患は、依然として世界中の男女共に死亡原因の第一位である。米国心臓協会は、2030 年までに米国の人口の 40% 近くが何らかの心血管疾患に罹患し、その直接的な医療費は 8,180 億ドルに達すると予測している(Benjamin, E.J., et al., Circulation 135:e146-e603 (2017) を参照されたい)。しかし、Mattiazzi らは、「C a M K II の遍在性および様々なタンパク質のターゲットに対するその効果は、治療ツールとして C a M K II 阻害剤を使用することへの難題である」と示している(Am J Physiol Heart Circ Physiol 308:H1177-H1191 (2015))。従って、非常に強力な費用対効果の高い新規の治療オプションが強く望まれている。

40

【0005】

(発明の要旨)

本明細書は、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 型 δ (C A M K 2 D) 転写物内の核酸配列に相補的である(例えば、完全に相補的である) 10～30 ヌクレ

50

オチド長の連続するヌクレオチド配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチド(A S O)に関する。ある実施態様において、本願A S Oまたはその連続するヌクレオチド配列は、C A M K 2 D転写物内の核酸配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または約100%相補的である。ある実施態様においては、C A M K 2 D転写物は、配列番号：1および配列番号：2からなる群から選択される。

【0006】

ある実施態様において、本明細書に記載されるA S Oは、C A M K 2 Dタンパク質を発現しているヒト細胞(例えば、H E K 2 9 3細胞)におけるC A M K 2 Dタンパク質の発現を低下させることができる。ある実施態様において、C A M K 2 Dタンパク質発現は、A S Oに曝露されていないヒト細胞におけるC A M K 2 Dタンパク質の発現に比べて、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または約100%低下される。

10

【0007】

ある実施態様において、A S Oは、C A M K 2 D転写物を発現しているヒト細胞(例えば、H E K 2 9 3細胞)におけるC A M K 2 D転写物(例えば、m R N A)の発現を低下させることができる。ある実施態様において、C A M K 2 D転写物の発現は、A S Oに曝露されていないヒト細胞におけるC A M K 2 D転写物の発現に比べて、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%または約100%低下される。

20

【0008】

ある実施態様において、本明細書に開示されるA S Oはギャップマーである。ある実施態様において、A S Oは、L L L D_n L L L、L L L L D_n L L L LまたはL L L L L D_n L L L L L(ここで、Lはヌクレオシドアナログであり、DはDNAであり、nは4~24の間の任意の整数であり得る)のデザインを有する。ある実施態様において、nは、6~14の間の任意の整数であり得る。ある実施態様において、nは、8~12の間の任意の整数であり得る。

30

【0009】

ある実施態様において、本明細書に開示されるA S Oのヌクレオシドアナログは、2'-O-アルキル-RNA; 2'-O-メチルRNA(2'-OMe); 2'-アルコキシ-RNA; 2'-O-メトキシエチル-RNA(2'-MOE); 2'-アミノ-DNA; 2'-フルオロ-RNA; 2'-フルオロ-DNA; アラビノ核酸(ANA); 2'-フルオロ-ANA; または二環式ヌクレオシドアナログ(LNA)を含む。ある実施態様において、A S Oのヌクレオシドアナログのうちの1つ以上は、糖修飾ヌクレオシドである。ある実施態様において、糖修飾ヌクレオシドは、親和性増強2'糖修飾ヌクレオシドである。ある実施態様において、1以上のヌクレオシドアナログは、二環式糖を含んでいるヌクレオシドを含む。ある実施態様において、親和性増強2'糖修飾ヌクレオシドは、LNAである。ある実施態様において、LNAは、拘束性エチルヌクレオシド(c E t)、2',4'-拘束性2'-O-メトキシエチル(c M O E)、 α -L-LNA、 β -D-LNA、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸(E NA)、アミノ-LNA、オキシ-LNA、チオ-LNAまたはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある実施態様において、A S Oは、1または複数の5'-メチル-シトシン核酸塩基を含む。

40

【0010】

ある実施態様において、本明細書に記載されるA S Oは、(i)ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(h i P S C-C M)において、C A M K 2 DをコードするmRNAレベルを低下させること;(ii)h i P S C-C MにおけるC A M K 2 Dのタンパク質レベルを低下

50

させること；(i i i)心血管疾患または障害の1または複数の症状を軽減、改善または治療すること；および(i v)それらの任意に組み合わせが可能である。

【0011】

ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、(i)配列番号：1のヌクレオチド625～842；(i i)配列番号：1のヌクレオチド1,398～59,755；(i i i)配列番号：1のヌクレオチド61,817～104,725；(i v)配列番号：1のヌクレオチド112,162～118,021；(v)配列番号：1のヌクレオチド119,440～135,219；(v i)配列番号：1のヌクレオチド137,587～157,856；(v i i)配列番号：1のヌクレオチド159,191～266,174；または(v i i i)配列番号：1のヌクレオチド272,788～310,949を含む核酸配列に相補的である。ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、(i)配列番号：1のヌクレオチド675～792；(i i)配列番号：1のヌクレオチド1,448～59,705；(i i i)配列番号：1のヌクレオチド61,867～104,675；(i v)配列番号：1のヌクレオチド112,212～117,971；(v)配列番号：1のヌクレオチド119,490～135,169；(v i)配列番号：1のヌクレオチド137,637～157,806；(v i i)配列番号：1のヌクレオチド159,241～266,124；または(v i i i)配列番号：1のヌクレオチド272,838～310,899を含む核酸配列に相補的である。ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、(i)配列番号：1のヌクレオチド725～742；(i i)配列番号：1のヌクレオチド1,498～59,655；(i i i)配列番号：1のヌクレオチド61,917～104,625；(i v)配列番号：1のヌクレオチド112,262～117,921；(v)配列番号：1のヌクレオチド119,540～135,119；(v i)配列番号：1のヌクレオチド137,687～157,756；(v i i)配列番号：1の159,291～266,074；または(v i i i)配列番号：1のヌクレオチド272,888～310,849を含む核酸配列に相補的である。

【0012】

ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、1または2つのミスマッチを含む配列番号：4～配列番号：1713を含む。ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、図1Aおよび1B(配列番号：4～配列番号：1713)の配列から選択されるヌクレオチド配列を含む。ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：114、配列番号：158、配列番号：190、配列番号：327、配列番号：463、配列番号：513、配列番号：516、配列番号：519、配列番号：657、配列番号：659、配列番号：827、配列番号：1249、配列番号：1326、配列番号：1409、配列番号：1524、配列番号：1530、配列番号：1662または配列番号：1676を含む。ある実施態様において、ASOの連続するヌクレオチド配列は、配列番号：55、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：79、配列番号：84、配列番号：85、配列番号：92、配列番号：102、配列番号：105、配列番号：128、配列番号：130、配列番号：133、配列番号：138、配列番号：161、配列番号：178、配列番号：180、配列番号：186、配列番号：195、配列番号：200、配列番号：202、配列番号：234、配列番号：264、配列番号：387、配列番号：390、配列番号：396、配列番号：441、配列番号：446、配列番号：457、配列番号：467、配列番号：523、配列番号：524、配列番号：636、配列番号：640、配列番号：700、配列番号：740、配列番号：832、配列番号：965、配列番号：1015、配列番号：1065、配列番号：1071、配列番号：1155、配列番号：1475、配列番号：1508、配列番号：1685、配列番号：1686、配列番号：1687、配列番号：1688または配列番号：1690を含む。

【0013】

ある実施態様において、本願ASOは、図3のデザインからなる群から選択されるデザインを有し、大文字は糖修飾ヌクレオシドであり、小文字はDNAである。

【0014】

ある実施態様において、本明細書に開示されるASOは、CAMK2Dタンパク質を発現しているhiPSC-CM細胞におけるCAMK2Dタンパク質の発現を低下させることができる。ある実施態様において、CAMK2Dタンパク質の発現は、ASOに曝露されていない細胞と比較して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%低下される。ある実施態様において、ASOは、CAMK2D転写物を発現しているhiPSC-CM細胞におけるCAMK2D転写物(例えば、mRNA)の発現を低下させることができる。ある実施態様において、CAMK2D転写物の発現は、ASOに曝露されていない細胞と比較して、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%低下される。

10

【0015】

ある実施態様において、ASOは、14~20のヌクレオチド長を有する。ある実施態様において、ASOのヌクレオチド配列は、1以上の修飾されたインターヌクレオシド結合を含む。ある実施態様において、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%のインターヌクレオシド結合が修飾されている。特定の実施態様においては、本願ASOにおけるインターヌクレオチド結合の各々は、ホスホロチオエート結合である。

20

【0016】

本明細書は、本明細書に開示されるASOを含むコンジュゲートを提供し、ここで該ASOは、少なくとも1つの非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部位に共有結合的に結合している。ある実施態様において、非ヌクレオチドまたは非ポリヌクレオチド部位は、タンパク質、脂肪酸鎖、糖残基、糖タンパク質、ポリマーまたはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0017】

また、本明細書において提供されるものは、本明細書に開示されるASOまたはそのコンジュゲートと、医薬的に許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む医薬組成物である。特定の実施態様において、医薬的に許される塩は、ナトリウム塩、カリウム塩またはアンモニウム塩を含む。ある実施態様において、医薬組成物は、少なくとも1つの別の治療剤をさらに含む。ある実施態様において、別の治療剤とは、CAMK2Dアンタゴニストである。ある実施態様において、CAMK2Dアンタゴニストは、抗CAMK2D抗体またはそのフラグメントである。

30

【0018】

本明細書は、本明細書に開示されるASO、コンジュゲートまたは医薬組成物およびその使用説明書を含むキットをさらに提供する。また、本明細書は、当該ASO、コンジュゲートまたは医薬組成物およびその使用説明書を含む診断用キットも提供する。

【0019】

本明細書は、CAMK2Dタンパク質を発現する細胞に、本明細書に開示されるASO、コンジュゲートまたは医薬組成物を投与することを特徴とする、細胞におけるCAMK2Dタンパク質の発現を阻害または低下させる方法であって、この投与後に、細胞中のCAMK2Dタンパク質の発現が、阻害または低下される方法に関する。ある実施態様において、本発明は、細胞におけるCAMK2Dタンパク質の発現を阻害または低下させるインビトロの方法であって、本明細書に開示されるASO、コンジュゲートまたは医薬組成物を、CAMK2Dタンパク質を発現する細胞に接触させることを含み、この接触後に細胞におけるCAMK2Dタンパク質の発現が、阻害または低下される方法に関する。ある実施態様では、ASOは、投与後の細胞内のCAMK2D転写物(例えば、mRNA)の発現を阻害または低下させる。ある実施態様において、CAMK2D転写物(例えば、mRNA)の発現は、ASOに曝露されていない細胞と比較して、投与後に少なくとも約20%、

40

50

少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%低下される。ある実施態様において、CAMK2Dタンパク質の発現は、ASOに暴露されていない細胞と比較して、投与後に少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または約100%低下される。ある実施態様において、細胞は、心臓の細胞(例えば、hiPSC-CM)である。

【0020】

本明細書で提供される方法は、対象における心血管疾患または障害の1つ以上の症状を、軽減、改善または治療する方法であって、本発明のASO、コンジュゲートまたは医薬組成物の有効量を対象に投与することを特徴とする方法に関する。本明細書は、医薬品製造のための本明細書のASO、コンジュゲートまたは医薬組成物の使用もまた提供する。ある実施態様では、医薬品は、それを必要とする対象における心血管疾患または障害を治療するためのものである。ある実施態様において、本願ASO、コンジュゲートまたは医薬組成物は、治療に使用するためのものである。ある実施態様において、本願ASO、コンジュゲートまたは医薬組成物は、それを必要とする対象における心血管疾患または障害の治療における使用のためのものである。

【0021】

ある実施態様において、心血管疾患または障害は、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓性疾患、静脈血栓症またはそれらの任意の組み合わせを含む。ある実施態様において、心血管疾患または障害は、心不全である。ある実施態様において、心不全は、左心不全、右心不全、うっ血性心不全、駆出率低下型心不全(HFrEF)、駆出率保存型心不全(HFpEF)、駆出率中間型心不全(HFmrEF)、肥大型心筋症(HCM)、高血圧性心疾患(HHD)または高血圧性肥大型心筋症からなる。

【0022】

ある実施態様において、対象はヒトである。ある実施態様では、本発明のASO、コンジュゲートまたは医薬組成物は、心臓内、経口的、非経口的、髄腔内、脳室内、肺動脈内、局所的または静脈内に投与される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1Aおよび1Bは、CAMK2D pre-mRNAを標的とするASOの例を示す。図1Aは、CAMK2D pre-mRNA内の単一部位を標的とするASOを示す。図1Bは、CAMK2D pre-mRNA内の複数の部位(すなわち、2または3)を標的とするASOを示す。図1Aおよび図1Bの各列は、ASOの配列のみに指定された配列番号、CAMK2D pre-mRNA配列上の標的開始位置および終了位置(図1Bの場合、複数の標的部位は#1、#2または#3として特定される)、いずれの特定のデザインまたは化学構造も持たないASO配列、ASO番号(ASO No.)および化学構造を持つASO配列を示す。

【図2】図2は、HEK293細胞におけるCAMK2D mRNA発現の低下パーセント(y軸)およびCAMK2D転写物上のASOの相対位置(x軸)の両方を示す。各丸印は、個々のASOを表す。実施例2にさらに記載したように、HEK293細胞をASO(25 μM)で処理して、CAMK2D mRNA発現(GAPDHに対して正規化)を対照のパーセンテージとして示す。

【図3】図3は、特定の例示的なASOをそのデザインにより示す。図3の各列は、ASO配列のみに対する配列番号、CAMK2D pre-mRNA配列上の標的開始位置および終了位置(ASOが複数の部位に結合する場所(図1Bを参照されたい)、例示的な標的開始位置および終了位置が提供される)、ASOデザイン番号、デザインによるASO配列およびASO番号(ASO No.)を示す。

【図4】図4は、実施例2および3に記載された通りの様々なASOを用いてインビトロで培養した後のHEK293細胞およびヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(hiPSC-CM)双方におけるCAMK2D mRNA発現パーセントの低下を示す。細胞を、25 μ M(HEK293)または500 nM(hiPSC-CM)のASOで処理して、CAMK2D mRNA発現(GAPDHに対して正規化)を対照のパーセントとして示す。値が示されていない場合には、特定のASOは、特定の条件下で試験されていない。

【図5】図5は、皮下投与1週間後のC57BL/6J BomマウスにおけるCAMK2D mRNA発現レベルに対する例示的なASOの効力を示す。CAMK2D mRNA発現レベルを、GAPDHに対して正規化して、その後対照群(即ち、生理食塩水で処理したサンプル)との比較により示した。

【発明の詳細な説明】

【0024】

I. 定義

用語「a」または「an」冠詞は、その実体の1つ以上を指すことに留意されたい；例えば、「ヌクレオチド配列」は、1つ以上のヌクレオチド配列を表すものと理解される。このように、用語「a」(または「an」)、「1つ以上」および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【0025】

さらに、本明細書で使用される場合の「および／または」は、他のものを有するか、またはそれを伴わない、2つの特定の特徵または構成要素夫々の具体的な開示として理解されるべきである。従って、本明細書において「Aおよび／またはB」のような語句を使用した用語「および／または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(単独で)および「B」(単独で)を含むことが意図される。同様に、「A、Bおよび／またはC」のような語句で使用される用語「および／または」は、以下の各側面を包含することが意図される。A、BおよびC；A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；およびC(単独)である。

【0026】

本明細書において「含む」なる用語を用いて記載されている場合は、いずれも「からなる」および／または「本質的にからなる」という用語で記載されている別の類似した態様を提供されることも理解されよう。

【0027】

別段の記載が無い限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本明細書に関連する当業者が、一般的に理解するのと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressが、本明細書において使用される多くの用語についての一般的な辞書として提供される。

【0028】

単位、接頭辞および記号は、Système International de Unites (SI)が認める形式で示される。数値範囲とは、範囲を規定するその数字を含んでいる。別段の記載が無い限り、ヌクレオチド配列は、5'から3'の方向に左から右に記載される。アミノ酸配列は、アミノ配向からカルボキシ配向にて左から右に記載される。本明細書において示される見出しは、本明細書全体として参照として存在し得るものであり、本明細書の様々な態様を制限するものではない。従って、以下に定義される用語は、本明細書の参照することによって、その全体をさらに完全に定義される。

【0029】

本明細書における用語「約」は、おおよそ、大体、辺り、または領域内で存在することを意味するよう使用される。用語「約」が、数値の範囲と一緒に使用される場合、規定さ

10

20

30

40

50

れた数値の上下の境界を拡張することによりその範囲を修正する。一般的に、用語「約」とは、例えば10%の変動、上下(高いまたは低い)の変動によって、記載された数値の上と下を修正することができる。例えば、「ASOは、ASOの投与後の細胞におけるCAMK2dタンパク質の発現を、少なくとも約60%低下させる」と記載されている場合、CAMK2dレベルが50%~70%の範囲で低下していることを示している。

【0030】

用語「核酸」または「ヌクレオチド」は、複数の核酸を包含することが意図される。ある実施態様において、用語「核酸」または「ヌクレオチド」は、標的配列、例えば、インビボまたはインビトロでのpre mRNA、mRNAまたはDNAを指す。この用語が標的配列中の核酸またはヌクレオチドを指す場合、核酸またはヌクレオチドは、細胞内で天然に存在する配列であり得る。別の実施態様において、「核酸」または「ヌクレオチド」は、本明細書のASO中の配列を指す。この用語がASO中の配列を指す場合、核酸またはヌクレオチドは、天然に存在しない、即ち化学的に合成されたもの、酵素的に作成されたもの、組換え的に作成されたもの、またはそれらの任意の組み合わせである。一実施態様において、ASO中の核酸またはヌクレオチドは、合成的または組換え的に生成されるが、天然に存在する配列またはその断片ではない。別の実施態様において、ASO中の核酸またはヌクレオチドは、天然には存在しない少なくとも1つのヌクレオチドアナログを含んでいるという理由から、それらは天然には存在しないものである。用語「核酸」または「ヌクレオシド」は、ポリヌクレオチド中に存在する単一の核酸セグメント、例えばDNA、RNAまたはそのアナログを指す。「核酸」または「ヌクレオシド」は、天然に存在する核酸または天然に存在しない核酸を含む。ある実施態様において、用語「ヌクレオチド」、「単位」および「モノマー」は、互換的に使用される。ヌクレオチドまたはモノマーの配列を示す場合、引用されるのは、例えばA、T、G、CまたはUなどの塩基の配列およびそれらのアナログであることは認識されよう。

【0031】

本明細書において使用される用語「ヌクレオチド」は、糖部位、塩基部位およびリン酸塩またはホスホロチオエートインターヌクレオチド結合基のような共有結合により結合された基(連結基)を含む配糖体を指し、DNAまたはRNAのような天然に存在するヌクレオチドならびに修飾された糖部位および／または塩基部位からなる天然に存在しないヌクレオチドの両方を包含し、これらは本明細書では「ヌクレオチドアナログ」とも呼ばれる。ここでは、単一のヌクレオチド(単位)は、モノマーまたは核酸単位とも呼ばれ得る。特定の実施態様において、「ヌクレオチドアナログ」という用語は、修飾糖部位を有するヌクレオチドを指す。修飾糖部位を有するヌクレオチド(例えば、LNA)の非限定的な例は、本明細書の別の個所に開示されている。別の実施態様において、「ヌクレオチドアナログ」という用語は、修飾核酸塩基部位を有するヌクレオチドを指す。修飾された核酸塩基部位を有するヌクレオチドには、5-メチルシトシン、イソシトシン、プソイドイソシトシン、5-プロモウラシル、5-プロピニルウラシル、6-アミノプリン、2-アミノプリン、イノシン、ジアミノプリンおよび2-クロロ-6-アミノプリンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0032】

本明細書において使用される用語「ヌクレオシド」は、糖部位と塩基部位からなるグリコシドを示すために使用され、そのためASOのヌクレオチド間のインターヌクレオチド結合によって共有結合されたヌクレオチド単位を指す場合に使用することができる。バイオテクノロジーの分野では、「ヌクレオチド」という用語は、核酸モノマーまたは核酸単位を指すために使用されることが多い。ASOに関する文脈において、用語「ヌクレオチド」とは、塩基単独、即ちシトシン(DNAおよびRNA)、グアニン(DNAおよびRNA)、アデニン(DNAおよびRNA)、チミン(DNA)およびウラシル(RNA)からなる核酸塩基配列を指し得る；この場合、糖骨格およびヌクレオチド間連結の存在は暗黙的である。この様に、特に、1つ以上のインターヌクレオチド連結基が修飾されているオリゴヌクレオチドの場合、用語「ヌクレオチド」は、「ヌクレオシド」を指すことができる。例え

ば、ヌクレオシド間の連結の存在または性質を特定する場合であっても、用語「ヌクレオチド」を使用することができる。

【0033】

本明細書において使用される用語「ヌクレオチド長」とは、所定の配列中のヌクレオチド(モノマー)の総数を意味する。例えば、t a c a t a t a t t a c t c c t c (配列番号：158)の配列は、20個のヌクレオチドを有する；従って、この配列のヌクレオチド長は20となる。従って、用語「ヌクレオチド長」は、本明細書において「ヌクレオチド数」と互換的に使用される。

【0034】

当業者には認識されようが、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドは、5'末端基を含み得るが、5'インターヌクレオチド連結基を含んでいない。

【0035】

本明細書において使用されるように、用語「アルキル」は、単独で、または組み合わせにおいて、1～8個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキル基、特に1～6個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキル基、より特に1～4個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキル基を意味する。直鎖または分岐鎖C₁—C₈アルキル基の例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル異性体、ヘキシル異性体、ヘプチル異性体およびオクチル異性体が挙げられ、特にメチル、エチル、プロピル、ブチルおよびペンチルが挙げられる。アルキルの特に例はメチルである。別のアルキルの例は、モノ、ジまたはトリフルオロメチル、エチルまたはプロピル、例えばシクロプロピル(cPr)、あるいはモノ、ジまたはトリフルオロシクロプロピルである。

【0036】

用語「アルコキシ」は、単独で、または組み合わせにおいて、式：アルキル—O—の基を意味し、式中の「アルキル」という用語は、前段に記載した意味、例えばメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec.ブトキシおよびtert.ブトキシを示すことを意味する。特に「アルコキシ」とは、メトキシである。

【0037】

用語「オキシ」は、単独で、または組み合わせにおいて、—O—基を意味する。

【0038】

用語「アルケニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、オレフィン結合および最大8個、好ましくは最大6個、特に好ましくは最大4個の炭素原子を含んでいる直鎖または分枝鎖の炭化水素基を意味する。アルケニル基の例としては、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニルおよびイソブテニルが挙げられる。

【0039】

用語「アルキニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、三重結合および最大8個、好ましくは最大6個、特に好ましくは最大4個の炭素原子を含んでいる直鎖または分枝鎖の炭化水素基を意味する。

【0040】

用語「ハロゲン」または「ハロ」は、単独で、または組み合わせにおいて、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味し、特にフッ素、塩素または臭素、より好ましくはフッ素および塩素、例えばフッ素を意味する。用語「ハロ」は、別の基との組み合わせにおいて、少なくとも1つのハロゲン、特に1～5個のハロゲン、特に1～4個のハロゲン、すなわち1、2、3または4個のハロゲンで置換された該基を意味する。用語「ヒドロキシル」および「ヒドロキシ」は、単独で、または組み合わせにおいて、—OH基を意味する。

【0041】

用語「チオヒドロキシル」および「チオヒドロキシ」は、単独で、または組み合わせにおいて、—SH基を意味する。

【0042】

用語「カルボニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-C(O)-$ 基を意味する。

【0043】

用語「カルボキシ」または「カルボキシル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-COOH$ 基を意味する。

【0044】

用語「アミノ」は、単独で、または組み合わせにおいて、第一級アミノ基($-NH_2$)、第二級アミノ基($-NH-$)または第三級アミノ基($-N-$)を表す。

【0045】

用語「アルキルアミノ」は、単独で、または組み合わせにおいて、上記で定義されているように、1つまたは2つのアルキル基で置換されたアミノ基を意味する。

10

【0046】

用語「アミノカルボニル」は、単独でまたは組み合わせで、 $-C(O)-NH_2$ 基を意味する。

【0047】

用語「スルホニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-SO_2$ 基を意味する。

【0048】

用語「スルフィニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-SO-$ 基を意味する。

【0049】

20

用語「スルファニル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-S-$ 基を意味する。

【0050】

用語「シアノ」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-CN$ 基を意味する。

【0051】

用語「アジド」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-N_3$ 基を意味する。

【0052】

用語「ニトロ」は、単独で、または組み合わせにおいて、 NO_2 基を意味する。

【0053】

用語「ホルミル」は、単独で、または組み合わせにおいて、 $-C(O)H$ 基を意味する。

【0054】

30

用語「アリール」は、単独で、または組み合わせにおいて、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルおよびホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で任意に置換されている6～10個の炭素環原子を含んでいる、一価の芳香族炭素環の単環系または二環系を表す。アリールの例としては、フェニルおよびナフチル、特にフェニルが挙げられる。

【0055】

用語「ヘテロアリール」は、単独で、または組み合わせにおいて、5～12個の環原子の一価の芳香族ヘテロ環の単環系または2環系を表し、これらは、N、OおよびSから選択される1、2、3または4個のヘテロ原子を含んでおり、残りの環原子は、炭素であって、これらはハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルおよびホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で任意に置換されていてもよい。ヘテロアリールの例としては、ピロリル、フラニル、チエニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、トリアゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、トリアジニル、アゼピニル、ジアゼピニル、イソオキサゾリル、ベンゾフラニル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、インドリル、イソインドリル、イソベンゾフラニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾトリアゾリル

40

50

、プリニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、カルバゾリルまたはアクリジニルなどが挙げられる。

【0056】

用語「ヘテロサイクル」は、単独で、または組み合わせにおいて、5～12個の環原子の一価の非芳香族ヘテロ環の単環系または二環系を示しており、N、OおよびSから選択される1、2、3または4個のヘテロ原子を含んでおり、残りの環原子は炭素であり、これらは、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコシカルボニル、アルキルカルボニルおよびホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で任意に置換されていてもよい。

【0057】

用語「保護基」は、単独で、または組み合わせにおいて、多官能性化合物の反応性部位を選択的に遮断し、保護されていない別の反応性部位で化学反応を選択的に行うことができるような基を意味する。保護基は、除去することができる。保護基の例は、アミノ保護基、カルボキシ保護基またはヒドロキシ保護基である。

【0058】

本発明の出発物質または化合物のうちの1つが、1つ以上の反応ステップの反応条件下において安定でないか、または反応性である1つ以上の官能基を含む場合、適切な保護基(例えば、"Protective Groups in Organic Chemistry" by T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd Ed., 1999, Wiley, New Yorkに記載されている)を、当技術分野において既知の方法を適用する重要な工程の前に導入することができる。そのような保護基は、文献に記載されている標準的な方法を用いて、合成後の段階で除去することができる。保護基の例としては、tert-ブトキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメチルカルバメート(Fmoc)、2-トリメチルシリルエチルカルバメート(Teoc)、カルボベンジロキシ(Cbz)およびp-メトキシベンジロキシカルボニル(Moz)が挙げられる。

【0059】

本明細書に記載される化合物は、複数の不斉中心を含むことが可能であり、光学純粋なエナンチオマー、例えばラセミ体、ジアステレオアイソマーの混合物、ジアステレオアイソマーのラセミ体、またはジアステレオアイソマーのラセミ体の混合物などのエナンチオマーの混合物の形で存在することができる。

【0060】

用語「不斉炭素原子」とは、4つの異なる置換基を有する炭素原子を意味する。カーン・インゴルド・プレローグ順位則に従い、不斉炭素原子は、「R」または「S」の立体配置であり得る。

【0061】

本明細書において使用される場合、用語「二環式糖」は、4～7員環の2つの原子を連結して第2の環を形成し、二環式構造をもたらす架橋を含んでいる4～7員環を含む修飾糖部分を指す。ある実施態様において、架橋は、LNAヌクレオシドにおいて見られるように、ヌクレオシドのリボース糖環のC2'およびC4'を連結する(即ち、2'-4'架橋)。

【0062】

本明細書において使用される場合、用語「コード領域」または「コード配列」は、アミノ酸に翻訳可能なコドンからなるポリヌクレオチドの一部である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)は、通常、アミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部であると考えられ、フランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、非翻訳領域(UTR)などは、コード領域の一部ではない。コード領域の境界は、通常、得られるポリペプチドのアミノ末端をコードする5'末端の開始コドンならびに得られるポリペプチドのカルボキシル末端をコードする3'末端の翻訳終止コドンによって決定される。

【0063】

本明細書で使用されるような用語「非コード領域」は、コード領域ではないヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列を意味する。非コード領域の例としては、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、非翻訳領域(「UTR」)、非コードエクソンなどが挙げられるが、これらに限定するものではない。エクソンの一部は、各転写物の5'非翻訳領域(5'UTR)の全部または一部であってもよいし、3'非翻訳領域(3'UTR)の一部であってもよい。未翻訳領域は、転写物の効率的な翻訳のために重要であり、転写物の翻訳速度や半減期を制御するために重要である。

【0064】

ヌクレオチド配列の表現において使用される場合の「領域」なる用語は、その配列の一部を指す。例えば、「ヌクレオチド配列内の領域」または「ヌクレオチド配列の相補体内の領域」という表現は、各々、ヌクレオチド配列より短いが、特定のヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の相補体内に位置する少なくとも10ヌクレオチドより長い配列を指す。用語「下位配列」または「サブシーケンス」とは、ヌクレオチド配列のある領域を指すこともできる。

【0065】

ヌクレオチド配列を指す場合、用語「下流」は、核酸またはヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列に対して3'に位置することを意味する。特定の実施態様においては、下流のヌクレオチド配列は、転写の開始点に後続する配列に関する。例えば、遺伝子の翻訳開始コドンは、転写開始部位の下流に位置する。

【0066】

「上流」なる用語は、参照ヌクレオチド配列に対して5'に位置するヌクレオチド配列を指す。

【0067】

本明細書で使用されるように、用語「調節領域」とは、コード領域の上流(5'非コード配列)、内部または下流(3'非コード配列)に位置するヌクレオチド配列を指し、関連するコード領域の転写、RNAプロセッシング、安定性または翻訳に影響を与える。調節領域は、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、UTRおよびステムループ構造を含むことができる。コード領域が真核生物細胞での発現を目的としている場合、ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は、通常、コード配列に対して3'の位置にある。

【0068】

本明細書で使用される用語「転写物」は、DNAの転写によって合成され、プロセッシング後にメッセンジャーRNA(mRNA)となる一次転写物、即ち、前駆体メッセンジャーRNA(pre-mRNA)およびプロセッシング後のmRNA自体を指すことができる。用語「転写物」は、「pre-mRNA」および「mRNA」と互換的に使用することができる。DNA鎖が一次転写物に転写された後、新たに合成された一次転写物は、いくつかの方法で修飾され、成熟した機能的な形態に変換され、様々なタンパク質およびRNA、例えばmRNA、tRNA、rRNA、lncRNA、miRNAなどを生成する。従って、「転写物」という用語には、エクソン、イントロン、5'UTRおよび3'UTRが含まれ得る。

【0069】

本明細書で使用される用語「発現」とは、ポリヌクレオチドが、遺伝子産物、例えばRNAまたはポリペプチドを産生するプロセスを指す。これには、限定するものではないが、ポリヌクレオチドのメッセンジャーRNA(mRNA)への転写およびmRNAのポリペプチドへの翻訳が含まれる。発現により、「遺伝子産物」が生じる。本明細書で使用されるように、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNAまたは転写産物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであり得る。本明細書に記載される遺伝子産物は、本明細書に記載される遺伝子産物は、転写後修飾、例えばポリアデニル化またはスプライシングを有する核酸、または翻訳後修飾、例えばメチル化、グリコシル化、脂質の付加、別のタンパク質サブユニットとの結合またはタンパク質分解的切断を伴うポリペプチドをさらに含む。

【0070】

2つ以上の核酸の表現において「同一性」または%「同一性」という用語は、保存的なアミノ酸置換を配列同一性の一部として考慮せず、最大の対応性を得るために比較およびアラインメント(必要に応じてギャップを導入する)したときに、同一であるか、または同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定の割合を有する2つ以上の配列を指す。%同一性は、配列比較ソフトウェアまたはアルゴリズムを用いて、または目視により測定することができる。アミノ酸配列またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用できる様々なアルゴリズムおよびソフトウェアが当技術分野で知られている。

【0071】

配列アライメントアルゴリズムに関するそのような非限定的な例の1つは、Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268に記載されたアルゴリズム、Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877を改変したアルゴリズムおよび N B L A S T および X B L A S T プログラム(Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402)に組み込まれたアルゴリズムである。特定の実施態様において、G a p p e d B L A S T は、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 に記載されている通りに使用することができる。B L A S T - 2、W U - B L A S T - 2 (Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480)、A L I G N、A L I G N - 2 (Genentech, South San Francisco, California)またはM e g a l i g n (D N A S T A R)は、配列を対応させるために使用することができる追加の公衆利用可能なソフトウェアプログラムである。特定の実施態様において、2つのヌクレオチド配列間の% 10 同一性は、G C G ソフトウェアパッケージのG A P プログラム(例えば、N W S g a p d n a . C M P マトリックスを使用して、40、50、60、70または90のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6のレングスウェイトを用いる)を使用して決定される。別の特定の実施態様においては、NedleldermanおよびWunchのアルゴリズムを組み込んで 20 いるG C G ソフトウェアパッケージのG A P プログラムを使用して(J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)、2つのアミノ酸配列間の%同一性を決定することができる(例えば、B L O S U M 62 マトリックスまたはP A M 250 マトリックスのいずれか、および16、14、12、10、8、6または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5のレングスウェイトを用いる)。あるいは、ある実施態様において、ヌクレオチド配列またはアミノ 30 酸配列間の%同一性は、マイヤーズおよびミラー(CABIOS, 4:11-17 (1989))のアルゴリズムを使用して決定される。例えば、%同一性は、A L I G N プログラム(version 2.0)を使用して、加重残基表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップ長ペナルティを含むP A M 120を使用して決定することができる。当業者は、特定のアライメントソフトウェアを使用して、最大アライメントのための適切なパラメータを決定することができる。特定の実施態様においては、アライメントソフトウェアのデフォルトパラメータが 40 使用される。

【0072】

特定の実施態様において、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との%同一性「X」は、 $100 \times (Y/Z)$ として計算され、Yは、第1および第2の配列のアラインメント(目視または特定の配列アラインメントプログラムによってアラインメントされたもの)において、同一であり一致するとしてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Zは、第2の配列における残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列よりも長い場合、第1の配列と第2の配列の%同一性の割合は、第1の配列と第2の配列の%同一性の割合よりも高くなる。

【0073】

ポリヌクレオチドの参照配列とアラインメントされた単一のポリヌクレオチド標的配列内の異なる領域は、各々、それ自体の%配列同一性を有し得る。パーセント配列同一性の値は、十分の一が四捨五入されていることに留意されたい。例えば、80.11、80.12、80.13および80.14は80.1に切り捨てられ、80.15、80.16、80.17、80.18および80.19は80.2に切り上げられる。また、長さの値が常に整数に 50

なることにも留意されたい。

【0074】

本明細書で使用されるように、用語「相同」および「相同性」は、用語「同一」および「同一性」と互換性がある。

【0075】

用語「その天然の変異体」は、定義された分類群、例えば、マウス、サルおよびヒトなどの哺乳類において自然に存在するCAMK2Dポリペプチド配列またはCAMK2D核酸配列(例えば、転写物)の変異体を指す。通常、ポリヌクレオチドの「天然の変異体」と言う場合、この用語は、染色体転座または複製によって染色体位置4q26(即ち、GenBank Accession No. NC_000004.12の残基113,451,032から113,761,927)に存在するCAMK2Dコード化ゲノムDNAの任意の対立遺伝子変異およびそれにより得られるmRNAなどのRNAも含むことが可能である。「天然の変異体」は、CAMK2D mRNAの代替スプライシングから得られる変異体も含むことができる。特定のポリペプチド配列を参照する場合、例えば、前記用語は、タンパク質の天然の形態も含んでいるため、これは、共翻訳または翻訳後修飾(例えば、シグナルペプチド切断、タンパク質分解的切断、グリコシル化など)によりプロセッシングされ得る。

【0076】

本明細書のASO(またはその領域)および本明細書に開示された哺乳類のCAMK2Dをコードする核酸(例えば、CAMK2D遺伝子)の標的領域の間の「相補性」の程度を決定する際に、「相補性」(また、「相同性」または「同一性」)の程度は、ASO(またはその領域)の配列と、それに最も良くアラインメントする標的領域の配列(または標的領域の逆相補体)との間の%同一性(または%の相同性)として表現される。%は、2つの配列間にて同一であるアラインメントされた塩基数を計測し、ASO中の連続するモノマーの総数で割り、100を掛けることによって計算される。このような比較において、ギャップが存在する場合、そのギャップは、ギャップ内のモノマーの数が本明細書のASOと標的領域との間で異なる領域ではなく、単なるミスマッチであることが好ましい。

【0077】

本明細書で使用される用語「相補性」は、参照配列に相補的な配列を示す。相補性とは、2つのDNAまたはRNA配列の間で共有される性質であり、それらが互いに反平行に配列されたときに、配列の各位置のヌクレオチド塩基が相補的となるようものであり、DNAの複製および転写の基本原則であることはよく知られており、鏡を見て物事の逆が見える事によく似ている。従って、例えば、5' "A T G C" 3'の配列の相補体は、3' "T A C G" 5'または5' "G C A T" 3'と書くことができる。本明細書で使用される用語「逆相補体」、「逆相補性」および「逆相補的」とは、「相補体」、「相補性」および「相補的」という用語と互換性がある。ある実施態様において、用語「相補的」とは、CAMK2D転写物内の連続する核酸配列と100%一致または相補性(すなわち、完全に相補的)であることを指す。ある実施態様においては、用語「相補的」とは、CAMK2D転写物内の連続する核酸配列と、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の一致または相補性を指す。

【0078】

2つの別々の核酸またはヌクレオチド配列を参照する場合、「対応する」および「に対応している」という用語は、特定の配列のヌクレオチドに異なる番号を付けることができるが、相同性および／または機能性に基づいて互に対応するか、または互いに類似している配列の領域を明確にするために使用することができる。例えば、遺伝子転写物の様々なアイソフォームは、類似または保存された部分を有し得るが、この各アイソフォームにおける番号付けは、別のスプライシングおよび／または他の改変に基づいて異なり得る。また、核酸またはヌクレオチド配列(例えば、遺伝子転写物および翻訳開始コドンから番号付けを開始するか、または5'UTRを含む)の特徴付けを行う場合、異なる番号付けシス

10

20

30

40

50

テムを採用し得ることが認識されている。さらに、遺伝子または遺伝子転写物が異なる変異体の核酸またはヌクレオチド配列は変わり得ることも認識される。しかし、本明細書で使用されるように、核酸またはヌクレオチド配列の相同性および／または機能性を共有する変異体の領域は、互いに「対応する」とみなされる。例えば、配列番号：1のヌクレオチドX～Yに対応するCAMK2D転写物のヌクレオチド配列(「参照配列」)は、配列番号：1のヌクレオチドXからYと同一の配列または類似の配列を有するCAMK2D転写物配列(例えば、CAMK2D pre-mRNAまたはmRNA)を指し、ここで、Xは開始部位であり、Yは終了部位である(図1Aおよび1Bに示す通り)。当業者は、CAMK2D転写物の配列を配列番号：1とアラインメントすることにより、CAMK2D転写物の配列中の対応するXおよびY残基を同定することができる。

10

【0079】

「対応するヌクレオチドアナログ」および「対応するヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドアナログ中の核酸塩基と天然に存在するヌクレオチドが、同じ対合を形成する能力、即ちハイブリダイゼーション能を有することを示すことを意図している。例えば、ヌクレオチドの2-デオキシリボース単位がアデニンと結合されている場合、「対応するヌクレオチドアナログ」は、アデニンと結合されたペントース単位(2-デオキシリボースとは異なる)を含む。

【0080】

本明細書で使用されるような用語「DES番号」または「DES No.」は、ヌクレオシド(例えば、DNA)およびヌクレオシドアナログ(例えば、LNA)の特異的なパターンを有するヌクレオチド配列に与えられる固有の番号を指す。本明細書で使用される通り、ASOのデザインは、大文字と小文字の組み合わせによって示される。例えば、DES-0231は、LLLLDDDDDDDDDDDDDDDDLL(即ち、TACatattatatctcCTC)のASOデザインを有するtacatatattactcctc(配列番号：158)のASO配列を指し、L(即ち、大文字)はヌクレオシドアナログ(例えば、LNA)を示し、D(即ち、小文字)はヌクレオシド(例えば、DNA)を示す。

20

【0081】

ASO化学の注釈は以下の通りである：β-D-オキシLNAヌクレオチドは、Oxy Bにより表され、ここでBは、ヌクレオチド塩基、例えばチミン(T)、ウリジン(U)、シトシン(C)、5-メチルシトシン(MC)、アデニン(A)またはグアニン(G)などを指定し、Oxy A、Oxy T、Oxy MC、Oxy CおよびOxy Gが含まれる。DNAヌクレオチドは、DNA bにより表され、ここで小文字のbは、ヌクレオチド塩基、例えばチミン(T)、ウリジン(U)、シトシン(C)、5-メチルシトシン(Mc)、アデニン(A)またはグアニン(G)などを指定するもので、DNA a、DNA t、DNAおよびDNA gが含まれる。Cまたはcの前の文字「M」は、5-メチルシトシンを示す。文字「s」は、ホスホロチオエートインターヌクレオチド結合を示す。

30

【0082】

本明細書で使用される「ASO番号」または「ASO No.」という用語は、構成要素、例えばヌクレオシド(例えば、DNA)、ヌクレオシドアナログ(例えば、β-D-オキシ-LNA)、核酸塩基(例えば、A、T、G、C、UまたはMC)およびバックボーン構造(例えば、ホスホロチオエートまたはホスホロジエステル)の詳細な化学構造を有するヌクレオチド配列に与えられた固有の番号を指す。例えば、ASO-0231は、Oxy Ts Oxy As Oxy MCs DNA as DNA ts DNA as DNA ts DNA ts DNA as DNA ts DNA as DNA ts DNA as DNA ts DNA as DNA cs DNA ts DNA cs Oxy MCs Oxy Ts Oxy MCを示すことができる。

40

【0083】

「力価」とは、別段の断りのない限り、通常、IC₅₀またはEC₅₀値として、μM、nMまたはpMで表される。また、力価は、阻害率で表すこともできる。IC₅₀は、治療分子の阻害濃度の中央値である。EC₅₀は、ビヒクルまたはコントロール(例えば、生理食塩水)に対する治療分子の有効濃度の中央値である。機能的アッセイにおいて、IC₅₀

50

oは、生物学的応答、例えば、mRNAまたはタンパク質発現の転写を、その治療分子によって達成される生物学的応答の50%低下させる治療分子の濃度である。機能的アッセイにおいて、EC₅₀は、生物学的応答、例えば、mRNAまたはタンパク質発現の転写の50%をもたらす治療分子の濃度である。IC₅₀またはEC₅₀は、当分野で既知のいずれの手段によっても計算することができる。

【0084】

本明細書で使用されるように、用語「阻害」とは、例えば、CAMK2D遺伝子転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の発現を阻害するとは、細胞または組織におけるCAMK2D遺伝子転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の発現を低下させるASOを指す。ある実施態様においては、用語「阻害」は、CAMK2D遺伝子転写物またはCAMK2Dタンパク質の完全な阻害(100%阻害または検出不可能なレベル)を指す。他の実施態様において、用語「阻害」は、細胞または組織におけるCAMK2D遺伝子転写物および／またはCAMK2Dタンパク質発現の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の阻害を指す。

【0085】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」によって、診断、予後または治療が望まれるあらゆる対象、特に哺乳類の対象を意味する。哺乳類の対象には、ヒト、家畜、農業用動物、スポーツ用動物および動物園の動物が含まれ、例えば、ヒト、非ヒトの霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、クマなどが含まれる。

【0086】

用語「医薬組成物」とは、有効成分の生物学的活性が有効となり得るような形態であり、かつ組成物が投与される対象に対して許容できない毒性を有する追加成分を含まない組成物を指す。かかる組成物は、無菌であり得る。

【0087】

本明細書に開示されるASOの「有効量」は、具体的に記載された目的を遂行するのに十分な量である。「有効量」とは、明示した目的に関連して、経験的かつ常法的に決定され得る。

【0088】

「治療すること」または「治療」または「治療する」または「緩和すること」または「緩和する」などの用語は、(1)診断された病理学的状態または障害の治療、減退、症状の軽減および／または進行の停止を行う治療手段、および(2)標的とする病理学的状態または障害の発症を予防および／または遅らせる予防的または防御的手段の両方を指す。従って、治療を必要とする人々には、既に障害を有する人々；障害に罹患し易い人々；および障害を予防すべき人々が含まれる。特定の実施態様において、対象は、患者が、例えば、疾患または障害に関連する症状の全体的、部分的または一過的な緩和または除去を示す場合に、本明細書に提供される方法に従って、別の箇所に開示される疾患または症状に対して正常に「治療」される。

【0089】

II. アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書は、哺乳類のCAMK2Dをコードする核酸分子、例えばCAMK2D核酸、例えばCAMK2D pre-mRNAおよびCAMK2D mRNAを含むCAMK2D転写物、または哺乳類のCAMK2Dをコードする前記核酸分子の天然に存在する変異体の機能調節に使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を用いる。本明細書で「ASO」という用語は、2つ以上のヌクレオチド(すなわち、オリゴヌクレオチド)の共有結合によって形成される分子を指す。

【0090】

10

20

30

40

50

A S Oは、約10～約30、例えば10～20、14～20、16～20または15～25ヌクレオチド長のような、連続したヌクレオチド配列を含む。本明細書で使用される用語「アンチセンスA S O」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」および「オリゴマー」は、用語「A S O」と互換的に使用され得る。

【0091】

配列番号の数字の参照には、特定の核酸塩基配列を含むが、あらゆるデザインまたは完全な化学構造を含むものではない。さらに、本明細書に開示されたA S Oは、代表的なデザインを示しているが、別段の記載がない限り、図に示された特定のデザインに限定されるものではない。本明細書において、単一ヌクレオチド(単位)は、モノマーまたはユニットとも呼ばれ得る。本明細書で特定のA S O番号を参照する場合、その参照には、配列、特定のA S Oデザインおよび化学構造が含まれる。本明細書が特定のD E S番号を参照する場合、参照は、その配列および特定のA S Oのデザインを含む。例えば、請求項(または本明細書)が、配列番号:158を参照する場合、それは、t a c a t a t t a t a t t a c t c c t cヌクレオチド配列のみを含む。請求項(または本明細書)がD E S-0231を参照する場合、それはT A C a t a t t a t a t t a c t c C T Cのデザインによるt a c a t a t t a t a t t a c t c c t cのヌクレオチド配列を含む。あるいは、A S O-0231のデザインは、配列番号:158として記述することもができ、ここで5'末端から、第1番目のヌクレオチド、第2番目のヌクレオチド、第3番目のヌクレオチド、第18番目のヌクレオチド、第19番目のヌクレオチドおよび第20番目のヌクレオチドの各々は、修飾ヌクレオチド(例えば、L N A)であり、他のヌクレオチドの各々は、非修飾ヌクレオチド(例えば、D N A)である。A S O番号は、配列およびA S Oのデザイン、ならびにA S Oの具体的な詳細情報を含む。従って、例えば、本願で参照されるA S O-0231は、O x y T s O x y A s O x y M C s D N A a s D N A t s D N A a s D N A t s D N A t s D N A a s D N A t s D N A a s D N A t s D N A a s D N A c s D N A t s D N A c s O x y M C s O x y T s O x y M Cを示し、「s」はホスホロチオエート結合を示している。

【0092】

様々な実施態様においては、本願A S Oは、R N A(単位)を含まない。ある実施態様において、本願のA S Oは、1以上のD N A単位を含む。ある実施態様において、本願A S Oは、直鎖状分子であるか、または直鎖状分子として合成される。ある実施態様において、A S Oは一本鎖分子であり、同じA S O内の等価領域(すなわち、二重鎖)に相補的なヌクレオチドの短い領域、例えば少なくとも3、4または5個の連続するヌクレオチドを含まない—この点で、A S Oは(本質的に)二本鎖ではない。ある実施態様において、A S Oは本質的に二本鎖ではない。ある実施態様において、A S Oはs i R N Aではない。様々な実施態様においては、本願A S Oは、連続するヌクレオチド領域の全体から構成され得る。従って、ある実施態様において、A S Oは実質的に自己相補的ではない。

【0093】

別の実施態様において、本明細書は、A S Oの断片を含む。例えば、本明細書は、本願A S Oの少なくとも1つのヌクレオチド、少なくとも2つの連続するヌクレオチド、少なくとも3つの連続するヌクレオチド、少なくとも4つの連続するヌクレオチド、少なくとも5つの連続するヌクレオチド、少なくとも6つの連続するヌクレオチド、少なくとも7つの連続するヌクレオチド、少なくとも8つの連続するヌクレオチドまたは少なくとも9つの連続するヌクレオチドを含む。本明細書に開示された配列いずれかのフラグメントは、本明細書の一部と意図される。

【0094】

I I . A . ターゲット

好適には、本願A S Oは、C A M K 2 D m R N Aまたはタンパク質の発現をダウンレギュレート(例えば、低下または除去)することができる。これに関して、本願A S Oは、通常、哺乳動物の細胞、例えば、心筋細胞などのヒト細胞において、C A M K 2 D m R N Aレベルの低下により、C A M K 2 Dタンパク質の阻害に間接的に影響を与えることができ

る。特に、本発明は、CAMK2D pre-mRNAの1つ以上の領域(例えば、イントロン領域、エクソン領域および／またはエクソン-イントロン結合領域)を標的とするASOに関する。別段の記載がない限り、本明細書で使用される用語「CAMK2D」は、1つ以上の種(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシおよびクマ)由来のCAMK2Dを指すことができる。

【0095】

カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII型δ(CAMK2D)は、CaMKキナーゼIIサブユニットδおよびCamK-IIサブユニットδとしても知られている。CAMK2Dの同義語は、既知であり、CaMKIIδまたはCAMKDを含む。ヒトCAMK2D遺伝子の配列は、公開されているGenBankアクセッション番号NC_000004.12として見ることができる。ヒトCAMK2D pre-mRNA転写物(配列番号:1)の配列は、NC_000004.12の残基113,451,032~113,761,927の逆相補体に対応する。CAMK2D mRNAの配列(GenBankアクセッション番号NM_001221.3)は、配列番号:2のヌクレオチド「t」が、mRNA中の「u」として示されていることを除いて、配列番号:2に示されている。ヒトCAMK2Dタンパク質についての配列は、公的に利用できるアクセッション番号:Q13557(カノニカル配列、配列番号:3)、A8MVS8、Q52PK4、Q59G21、Q8N553、Q9UGH6、Q9UQE9として見出すことができ、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0096】

ヒトCAMK2D遺伝子産物の天然変異体が知られている。例えば、ヒトCAMK2Dタンパク質の天然の変異体は、D167E、Q463EおよびT493I、ならびにそれらの任意の組み合わせから選択される1つ以上のアミノ酸置換を含む可能性がある。別のスプライシングにより生じるヒトCAMK2Dタンパク質の別の変異体も、当分野において既知である。CAMK2Dアイソフォームδ3(UniProtにおける識別子:Q13557-3)は、次の通り:328~328:K→KKRKSSSSSVQMM、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ4(識別子:Q13557-4)の配列は、次の通り:328~328:K→KINNKANVVTSPKENIPTPAL、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ6(識別子:Q13557-8)の配列は、次の通り:479~499:欠失、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ7(識別子:Q13557-9)の配列は、次の通り:K→KKRKSSSSSVQMMおよび479~499:欠失、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ8(識別子:Q13557-5)の配列は、次の通り:328~328:K→KINNKANVVTSPKENIPTPALおよび479~499:欠失、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ9(識別子:Q13557-6)の配列は、次の通り:329~329:E→EPQTTVIHNP DGNKE、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ10(識別子:Q13557-10)の配列は、次の通り:329~329:E→EPQTTVIHNP DGNKEおよび479~499:欠失、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ11(識別子:Q13557-11)の配列は、次の通り:28~328:K→KKRKSSSSSVQMMEPQTTVIHNP DGNK、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ12(識別子:Q13557-12)の配列は、次の通り:478-478:K→Nおよび479-499:欠失、カノニカル配列(配列番号:3)とは異なる。従って、本願ASOは、CAMK2Dタンパク質の天然変異体の発現を低下または阻害するためにデザインされ得る。

【0097】

ASOの標的核酸配列の例は、CAMK2D pre-mRNAである。配列番号:1は、ヒトCAMK2Dゲノム配列(即ち、GenBankアクセッション番号NC_000004.12のヌクレオチド113,451,032~113,761,927の逆相補体)を示す

。配列番号：1は、配列番号：1中のヌクレオチド「t」が、pre-mRNAにおいて「u」として示されること以外はCAMK2D pre-mRNA配列と同一である。特定の実施態様においては、「標的核酸」は、CAMK2Dタンパク質をコードする核酸のイントロンまたはその天然に存在する変異体およびそれらから得られるRNA核酸、例えばpre-mRNAを含む。別の実施態様において、標的核酸は、CAMK2Dタンパク質をコードする核酸のエクソン領域またはその天然に存在する変異体、ならびにそれらから得られるRNA核酸、例えばpre-mRNAを含む。また別の実施態様において、標的核酸は、CAMK2Dタンパク質をコードしている核酸のエクソン-イントロン結合部またはその天然に存在する変異体およびそれらから得られるRNA核酸、例えばpre-mRNAを含む。ある実施態様において、例えば、研究または診断に使用される場合、「標的核酸」は、上記のDNAまたはRNA核酸標的から得られるcDNAまたは合成オリゴヌクレオチドであり得る。CAMK2D pre-mRNAによりコードされるヒトCAMK2Dタンパク質配列は、配列番号：3として示されている。別の実施態様においては、標的核酸は、CAMK2Dタンパク質をコードする核酸またはその天然に存在する変異体、例えば、5'UTR、3'UTRまたはその両方の非翻訳領域を含む。

【0098】

ある実施態様において、本願ASOは、CAMK2D転写物のイントロン内の領域、例えば、配列番号：1にハイブリダイズする。特定の実施態様においては、本願ASOは、CAMK2D転写物のエクソン内の領域、例えば、配列番号：1にハイブリダイズする。別の実施態様において、本願ASOは、CAMK2D転写体のエクソン-イントロン結合部内の領域、例えば、配列番号：1にハイブリダイズする。ある実施態様において、本願ASOは、CAMK2D転写物(例えば、イントロン、エクソンまたはエクソン-イントロン結合部)内の領域、例えば、配列番号：1にハイブリダイズし、ここでASOは、本明細書中の他の場所に記載されているように(例えば、セクションII.G)、式：5'A-B-C3'に関するデザインを有している。

【0099】

ある実施態様において、ASOは、CAMK2Dタンパク質の特定のアイソフォーム(例えば、アイソフォームδ3~12)をコードするmRNAを標的とする。ある実施態様において、ASOは、CAMK2Dタンパク質の全てのアイソフォームを標的とする。別の実施態様においては、ASOは、CAMK2Dタンパク質の2つのアイソフォーム(例えば、アイソフォームδ3およびアイソフォームδ7、アイソフォームδ4およびアイソフォームδ8、およびアイソフォームδ9およびアイソフォームδ10)を標的とする。

【0100】

ある実施態様において、ある実施態様において、ASOは、CAMK2D転写物内の核酸配列、例えば配列番号：1に対応する領域内の核酸配列に相補的な、連続するヌクレオチド配列(例えば、10~30ヌクレオチド長)を含む。ある実施態様において、ASOは、CAMK2D転写物の核酸配列または配列内の領域(「標的領域」)にハイブリダイズする連続するヌクレオチド配列を含んでおり、ここで該核酸配列は、(i)配列番号：1のヌクレオチド625~842；(ii)配列番号：1のヌクレオチド1,398~59,755；(iii)配列番号：1のヌクレオチド61,817~104,725；(vi)配列番号：1のヌクレオチド112,162~118,021；(v)配列番号：1のヌクレオチド119,440~135,219；(vi)配列番号：1のヌクレオチド137,587~157,856；(vii)配列番号：1の159,191~266,174のヌクレオチド；および(viii)配列番号：1の272,788~310,949のヌクレオチドであり、ここで、任意に、ASOは、本明細書に記載されたデザインの内の1つを有する(例えば、セクションII.G)、または本明細書の別の場所に示される化学構造(例えば、図1Aおよび1B)を有する。

【0101】

ある実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド725~742に対応する。他の実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド1,498

10

20

30

40

50

～59,655に対応する。特定の実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド61,917～104,625に対応する。ある実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド112,262～117,921に対応する。ある実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド119,540～135,119に対応する。さらなる実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド137,687～157,756に対応する。特定の実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド159,291～266,074に対応する。ある実施態様においては、標的領域は、配列番号：1のヌクレオチド272,888～310,849に対応する。

【0102】

ある実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の、配列番号：1のヌクレオチド725～742±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。別の実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド1,498～59,655±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。特定の実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド61,917～104,625±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。ある実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド112,262～117,921±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。ある実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド119,540～135,119±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。さらなる実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド137,687～157,756±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。特定の実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の配列番号：1のヌクレオチド159,291～266,074±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。ある実施態様においては、標的領域は、3'末端および／または5'末端の、配列番号：1のヌクレオチド272,888～310,849±10、±20、±30、±40、±50、±60、±70、±80または±90ヌクレオチドに対応する。

【0103】

ある実施態様においては、本願ASOは、CAMK2D転写物内の複数の標的領域(例えば、pre-mRNA、配列番号：1)にハイブリダイズする。ある実施態様においては、ASOは、CAMK2D転写物内の2つの異なる標的領域にハイブリダイズする。ある実施態様において、ASOは、CAMK2D転写物内の3つの異なる標的領域にハイブリダイズする。複数の標的領域にハイブリダイズする例示的なASOの配列、および異なる標的領域の開始／終了部位は、図1Bに示される。ある実施態様においては、CAMK2D転写物内の複数の領域(例えば、pre-mRNA、配列番号：1)にハイブリダイズするASOは、CAMK2D転写物内の一つの領域(例えば、pre-mRNA、配列番号：1)にハイブリダイズするASOと比較して、CAMK2D発現を低下させる点でより強力である(例えば、より低いEC₅₀を有する)。

【0104】

ある実施態様において、本願ASOは、生理学的条件下、すなわちインビボ条件下において、標的核酸(例えば、CAMK2D転写物)にハイブリダイズできる。ある実施態様においては、本願ASOは、インビトロで標的核酸(例えば、CAMK2D転写物)にハイブリダイズすることが可能である。ある実施態様においては、本願ASOは、ストリンジェントな条件下においてインビトロで標的核酸(例えば、CAMK2D転写物)にハイブリダイズすることができる。インビトロでのハイブリダイゼーションのためのストリンジェントな条件は、特に、産生細胞の取り込み、RNAアクセシビリティ、温度、結合の自由

10

20

30

40

50

エネルギー、塩濃度および時間に依存する(例えば、Stanley T Crooke, Antisense Drug Technology: Principles, StrategiesおよびApplications, 2nd Edition, CRC Press (2007)を参照されたい)。一般的に、インビトロでのハイブリダイゼーションには、実質的に類似した核酸間のハイブリダイゼーションは可能であるが、異なる核酸間のハイブリダイゼーションは不可能となるように、高から中程度のストリンジェンシー条件が使用される。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、5 X 食塩-クエン酸ナトリウム(SSC)緩衝液(0.75 M 塩化ナトリウム/0.075 M クエン酸ナトリウム)中において、40℃で1時間ハイブリダイゼーションを行い、その後サンプルを、40℃で1 X SSC緩衝液にて10回、室温で1 X SSC緩衝液により5回洗浄することが挙げられる。インビボでのハイブリダイゼーション条件とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的配列とのハイブリダイゼーションを制御する細胞内条件(例えば、生理学的 pH および細胞内イオン条件)を含む。インビトロ条件は、比較的低いストリンジェンシー条件により模倣することができる。例えば、ハイブリダイゼーションは、2 X SSC(0.3 M 塩化ナトリウム/0.03 M クエン酸ナトリウム)、0.1% SDSにおいて、37℃でインビトロにて実施することができる。4 X SSC、0.1% SDSを含む洗浄液を、37℃で使用して、最終的に1 X SSCにおいて45℃で洗浄することができる。

【0105】

ある実施態様においては、本願ASOは、1以上の種(例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシおよびクマ)のCAMK2D転写物を標的とすることができる。特定の実施態様においては、本明細書に開示されたASOは、ヒトおよびげっ歯類(例えば、マウスまたはラット)のCAMK2D転写物の両方を標的とすることができる。従って、ある実施態様においては、ASOは、ヒトおよびげっ歯類(例えば、マウスまたはラット)の両方において、CAMK2D mRNAまたはタンパク質の発現をダウンレギュレート(例えば、低下または除去)することができる。

【0106】

マウスCAMK2D転写物の配列は、当分野では既知である。例えば、マウスCAMK2D遺伝子の配列は、公知のGenBankアクセッション番号NC_000069.6に記載されている。マウスCAMK2D pre-mRNA転写物の配列は、NC_000069.6の残基126,596,354~126,846,326に対応する。マウスCAMK2D mRNA転写物(カノニカルおよび変異体の両方)の配列は既知であり、アクセッション番号NM_001025438.2(カノニカル配列)、NM_001025439.2、NM_001293663.1、NM_001293664.1、NM_023813.4、NM_001346635.1、NM_001346636.1、NM_001293665.1、XM_006500836.3、XM_006500833.3、XM_006500835.3、XM_017319415.1、XM_006500818.3、XM_017319417.1、XM_017319418.1、XM_017319420.1、NM_001293666.1、XM_006500819.3、XM_017319416.1、XM_006500820.3、XM_006500822.3、XM_006500823.3、XM_006500824.3、XM_017319419.1、XM_006500826.3、XM_006500825.3、XM_006500829.3、BC052894.1、XM_006500831.3、XM_006500832.3、XM_017319422.1、XM_006500834.3、XM_006500839.3およびXM_017319421.1として利用できる。マウスCAMK2Dタンパク質の配列は、公的に利用可能なGenBankアクセッション番号: Q6PHZ2(標準配列)、Q3UF87、Q3UQH9、Q5DTK4、Q8CAC5およびQ9CZE2として見出すことができ、これらの各配列は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。マウスCAMK2Dタンパク質の3つのアイソフォームは既知である。CAMK2Dアイソフォームδ6の配列は、次の通り: 478~478: K→Nおよび479~499: 欠失、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ10の配列は、次の通り: 329~329: E→EPQTTVIHNP DGNKE; 478~478: K→Nおよび479~4

99：欠失、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ5の配列は、次の通り：328～328：K→KINNKANVVTSPKENIPTPALEPQTT
VIHNPDGNK；478～478：K→N；および479～499：欠失、カノニカル配列とは異なる。

【0107】

ラットCAMK2D転写物の配列も当分野において既知である。ラットCAMK2D遺伝子は、公知のGenBankアクセッション番号NC_005101.4に記載されている。ラットCAMK2D pre-mRNA転写物の配列は、NC_005101.4の残基230,900,907～231,132,207に対応する。ラットCAMK2D mRNA転写物(カノニカル配列および変異体配列の両方)の配列は既知であり、アクセッション番号NM_012519.2(カノニカル配列)、BC107562.1、XM_017590621.1、XM_017590605.1、XM_008761452.1、XM_017590606.1、XM_017590607.1、XM_017590608.1、XM_017590610.1、XM_017590611.1、XM_017590612.1、XM_006233285.3、XM_017590614.1、XM_017590615.1、XM_017590616.1、XM_017590613.1、XM_017590617.1、XM_017590618.1、XM_017590604.1、XM_017590609.1、XM_017590624.1、XM_017590625.1、XM_017590619.1、XM_017590620.1、XM_017590622.1およびXM_017590623.1として利用できる。ラットCAMK2Dタンパク質の配列は、公的に利用できるアクセッション番号：P15791(カノニカル配列)、P97915、P97916、Q3B7L0、Q63904、Q63905、Q63906、Q63907およびQ63908として見出すことができ、これらの各配列は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ラットCAMK2Dタンパク質の6つのアイソフォームが知られている。CAMK2Dアイソフォームδ2の配列は、次の通り：329～362：欠失、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ3の配列は、次の通り：329～335：INNKANV→KRKSSSV；337～359：欠失；および360～362：GNK→QMM、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ4の配列は、次の通り：349～362：欠失、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ5の配列は、次の通り：329～362：欠失および512～533：KPPCIPNGKENFSGGTS LWQNI→N、カノニカル配列とは異なる。CAMK2Dアイソフォームδ6の配列は、次の通り：512～533：KPPCIPNGKENFSGGTS LWQNI→N、カノニカル配列とは異なる。

【0108】

II.B. ASO配列

本願ASOは、CAMK2D転写物の領域の相補体に対応する連続するヌクレオチド配列、例えば配列番号：1に対応するヌクレオチド配列を含んでいる。

【0109】

特定の実施態様において、本明細書は、10～30ヌクレオチド長、例えば10～15ヌクレオチド長、10～20ヌクレオチド長または10～25ヌクレオチド長のASOを提供し、ここで連続するヌクレオチド配列は、CAMK2D転写物、例えば配列番号：1またはその天然の変異体の相補体内の領域と、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または約100%の配列同一性を有する。従って、例えば、ASOは、配列番号：1またはその一部の配列を有する一本鎖核酸分子にハイブリダイズする。

【0110】

ASOは、哺乳類CAMK2Dタンパク質をコードする核酸の等価領域(例えば、配列番号：1)に完全に相補的である(完全な相補性の)連続するヌクレオチド配列を含むことができる。ASOは、哺乳類CAMK2Dタンパク質をコードする核酸の等価領域(例えば、配

列番号：1)に完全に相補的である(完全な相補性の)連続するヌクレオチド配列を含むことができる。ASOは、図1Aおよび1Bに示されるように、XおよびYが、各々開始部位および終了部位である配列番号：1のヌクレオチドX-Yに対応している核酸配列またはその配列内の領域と完全に相補的である(完全な相補性の)連続するヌクレオチド配列を含むことができる。

【0111】

ある実施態様においては、本願ASOのヌクレオチド配列または連続するヌクレオチド配列は、配列番号：4～1713から選択される配列(即ち、図1Aおよび1Bの配列)に対して、少なくとも約80%の配列同一性、例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%の配列同一性、少なくとも約97%の配列同一性、少なくとも約98%の配列同一性、少なくとも約99%の配列同一性、例えば約100%の配列同一性(相同性)を有する。ある実施態様において、本明細書の別の場所に示された化学構造(例えば、図1Aおよび1B)を有する。

10

【0112】

ある実施態様においては、ASO(またはその連続ヌクレオチド部分)は、配列番号：4～1713、またはその少なくとも10個の連続するヌクレオチドの領域からなる群から選択される配列のうちの1つから選択されるか、またはそれらを含んでおり、ここで該ASO(またはその連続するヌクレオチド部分)は、対応するCAMK2D転写物と比較した場合、1、2、3または4つのミスマッチを所望により含んでいてもよい。

20

【0113】

ある実施態様において、ASOは、配列番号：254、配列番号：27、配列番号：114、配列番号：158、配列番号：190、配列番号：327、配列番号：463、配列番号：513、配列番号：516、配列番号：519、配列番号：657、配列番号：659、配列番号：827、配列番号：1249、配列番号：1326、配列番号：1409、配列番号：1524、配列番号：1530、配列番号：1662および配列番号：1676からなる群から選択される配列を含む。

【0114】

ある実施態様において、ASOは、配列番号：55、配列番号：61、配列番号：63、配列番号：71、配列番号：75、配列番号：79、配列番号：84、配列番号：85、配列番号：92、配列番号：102、配列番号：105、配列番号：128、配列番号：130、配列番号：133、配列番号：138、配列番号：161、配列番号：178、配列番号：180、配列番号：186、配列番号：195、配列番号：200、配列番号：202、配列番号：234、配列番号：264、配列番号：387、配列番号：390、配列番号：396、配列番号：441、配列番号：446、配列番号：457、配列番号：467、配列番号：523、配列番号：524、配列番号：636、配列番号：640、配列番号：700、配列番号：740、配列番号：832、配列番号：965、配列番号：1015、配列番号：1065、配列番号：1071、配列番号：1155、配列番号：1475、配列番号：1508、配列番号：1685、配列番号：1686、配列番号：1687、配列番号：1688および配列番号：1690からなる群から選択される配列を含む。

30

40

【0115】

ある実施態様において、本願ASOは、標的核酸配列(例えば、CAMK2D転写物)に結合して、細胞内の正常な(即ち、対照の)発現レベルと比較して、CAMK2D転写物の発現を、少なくとも約10%または約20%阻害するかまたは低下させることができる、例えば、正常な発現レベル(即ち、ASOに暴露されていない細胞内の発現レベル)と比較して、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%阻害するかまたは低下させることができる。

50

【0116】

ある実施態様においては、本願ASOは、ASOと接触していないHEK293細胞と比較して(例えば、生理食塩水との接触)、細胞が25 μ MのASOと接触している場合、HEK293細胞において、インビトロでのCAMK2D mRNAの発現を、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、減少させることができる。少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または約100%低下させることができる。

【0117】

ある実施態様において、本願ASOは、ASOと接触していないhiPSC-CM細胞と比較して(例えば、生理食塩水との接触)、細胞が500 nMのASOと接触している場合、ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(hiPSC-CM)において、インビトロでのCAMK2D mRNAの発現を、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または約100%低下させることができる。

【0118】

特定の実施態様において、本願ASOは、以下からなる群から選択される少なくとも1つの特性を有する：(i)ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(hiPSC-CM)におけるCAMK2DをコードするmRNAレベルを低下させること；(ii)hiPSC-CMにおけるCAMK2Dのタンパク質レベルを低下させること；(iii)心血管系疾患または障害の1つ以上の症状を、低下、改善または治療すること；ならびに(iv)それらの任意の組み合わせ。

【0119】

ある実施態様において、ASOは、標的配列にハイブリダイズする場合に、1、2、3または4(または、それ以上)のミスマッチを許容し得るが、所望の効果、すなわち標的mRNAおよび／またはタンパク質のダウンレギュレーションを示すために十分に標的と結合することができる。ミスマッチは、例えば、本明細書の別の場所に開示されているASOヌクレオチド配列の長さを増やすこと、および／またはヌクレオチドアナログの数を増加することにより補うことができる。

【0120】

ある実施態様において、本願ASOは、標的配列にハイブリダイズする場合に、3つ以下のミスマッチを含む。別の実施態様において、連続するヌクレオチド配列は、標的配列にハイブリダイズする場合に、2以上のミスマッチを含まない。別の実施態様では、連続するヌクレオチド配列は、標的配列にハイブリダイズする際に1以上のミスマッチを含まない。

【0121】

II.C. ASO長

ASOは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30の全長の連続するヌクレオチドを含み得る。範囲がASOまたは連続するヌクレオチド配列長について示される場合、この範囲は、範囲に示される上限と下限の長さを含み、例えば、10~30(またはその間)には、10と30の両方が含まれることが理解されるべきである。

【0122】

ある実施態様において、ASOは、約14~20の全長の連続するヌクレオチド配列、14、15、16、17、18、19または20の連続するヌクレオチド長を含む。

【0123】

II.D. ヌクレオシドおよびヌクレオチドアナログ

本開示の一態様において、ASOは、1つ以上の天然に存在しないヌクレオシドアナロ

10

20

30

40

50

グを含む。「ヌクレオチドアナログ」は、糖および／または塩基部位の修飾により、DNAまたはRNAヌクレオシドなどの天然ヌクレオシドの変異体である。アナログは、基本的に、オリゴヌクレオチドという表現において天然ヌクレオシドに対して単に「サイレント」または「等価」であり得る、即ち、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子発現を阻害するように作用する際に機能的な効果を有さない。にも拘わらず、そのような「等価な」アナログは、例えば、製造が容易であるか、または安価である場合、または貯蔵または製造条件に対してより安定である場合、またはタグまたはラベルを表す場合に有用であり得る。しかし、ある実施態様において、アナログは、ASOが発現を阻害するように作用する際に、機能的な効果を有する；例えば、標的に対する結合親和性を増加させること、および／または細胞内ヌクレアーゼに対する耐性を増加させること、および／または細胞内への輸送容易性を増加させることにより、機能的な効果を有するであろう。ヌクレオシドアナログの具体的な例は、例えば、Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 and Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213およびスキーム1に記載されている。本願ASOは、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、18以上、19以上または20以上のヌクレオシドアナログを含むことができる。ある実施態様において、ASO中のヌクレオシドアナログは同一物である。別の実施態様において、ASO中のヌクレオシドアナログは異なるものである。ASO中のヌクレオシドアナログは、以下のヌクレオシドアナログのいずれか1つまたは組み合わせであり得る。

【0124】

II. D. 1. 核酸塩基

核酸塩基という用語は、核酸ハイブリダイゼーションにおいて水素結合を形成するヌクレオシドおよびヌクレオチドに存在するプリン(例えば、アデニンおよびグアニン)およびピリミジン(例えば、ウラシル、チミンおよびシトシン)部位を含む。本明細書において、核酸塩基という用語は、天然に存在する核酸塩基とは異なるが、核酸ハイブリダイゼーション中に機能する修飾核酸塩基も包含する。ある実施態様では、核酸塩基部位は、核酸塩基を修飾または置換することによって修飾される。この文脈において、「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチンおよびヒポキサンチンなどの天然に存在する核酸塩基、ならびに天然に存在しない変異体の両方を指す。そのような変異体は、例えば、Hirao et al., (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055 and Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1に記載されている。

【0125】

ある実施態様では、核酸塩基部位は、プリンまたはピリミジンを、例えば置換されたプリンまたは置換されたピリミジンのような修飾されたプリンまたはピリミジンへと変更することにより修飾される(例えば、イソシトシン、プソイドイソシトシン、5-メチルシトシン、5-チオゾロシトシン、5-プロピニルシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロモウラシル、5-チアゾロウラシル、2-チオウラシル、2'-チオチミン、イノシン、ジアミノプリン、6-アミノプリン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリンおよび2-クロロ-6-アミノプリンから選択される核酸塩基)。

【0126】

核酸塩基部位は、対応する各核酸塩基の文字コード、例えば、A、T、G、CまたはUによって示されてもよく、各文字は、所望により、同等の機能を有する修飾核酸塩基を含んでもよい。例えば、オリゴヌクレオチドの例において、核酸塩基部位は、A、T、G、Cおよび5-メチルシトシンから選択される。所望により、LNAギャップマーには、5-メチルシトシンのLNAヌクレオシドを使用してもよい。

【0127】

II. D. 2. 糖修飾

本願ASOは、修飾された糖部位を有する1つ以上のヌクレオシド、即ち、DNAおよ

びRNAに存在するリボース糖部位と比較した場合に、糖部位の修飾を有するヌクレオシドを含むことができる。リボースの糖部位を修飾したヌクレオシドは、主にオリゴヌクレオチドの特定の特性(例えば、親和性および／またはヌクレアーゼ耐性など)を向上させる目的で、数多く作られてきた。

【0128】

そのような修飾には、リボースの環構造が修飾されるもの、例えば、ヘキソース環(HNA)との置換によるもの、またはリボース環上のC 2'とC 4'炭素の間に通常ビラジカル架橋を有する二環式環(LNA)との置換によるもの、またはC 2'とC 3'炭素の間の結合を欠いた非結合リボース環(例えば、UNA)との置換によるものが含まれる。別の糖修飾ヌクレオシドとしては、例えば、ビシクロヘキソース核酸(WO 2011/017521)または三環核酸(WO 2013/154798)が挙げられる。修飾されたヌクレオシドには、糖の部分が、糖でない部分で置換されたヌクレオシド、例えばペプチド核酸(PNA)、またはモルホリノ核酸の場合も含まれる。

【0129】

糖修飾は、リボース環上の置換基を、水素以外の基またはRNAヌクレオシドにおいて天然に存在する2'-OH基に変化させることによって行われる修飾を含む。置換基は、例えば、2'、3'、4'または5'位置に導入されてもよい。修飾糖部位を有するヌクレオシドには、2'置換ヌクレオシドなどの2'修飾ヌクレオシドも含まれる。実際に、2'置換ヌクレオシドの開発に多くの焦点が費やされており、多くの2'置換ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドに組み込まれた場合に、有益な特性(例えば、強化されたヌクレオシド耐性および増強された親和性など)を有することが判っている。

【0130】

II. D. 2. a 2'修飾ヌクレオシド

2'糖修飾ヌクレオシドとは、2'位置にHまたは-OH以外の置換基を有するか(2'置換ヌクレオシド)、または2'結合ビラジカルを含むヌクレオシドであり、2'置換ヌクレオシドおよびLNA(2'-4'ビラジカル架橋)ヌクレオシドが含まれる。例えば、2'修飾糖は、増強された結合親和性(例えば、親和性増強2'糖修飾ヌクレオシド)および／またはオリゴヌクレオチドに対するヌクレアーゼ耐性の増大を提供し得る。2'置換された修飾ヌクレオシドの例としては、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA(MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)および2'-フルオロ-ANAヌクレオシドが挙げられる。さらなる例については、例えば、Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443; Uhlmann, Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213; and Deleavey and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937を参照されたい。以下に、いくつかの2'置換された修飾ヌクレオシドを示す。

10

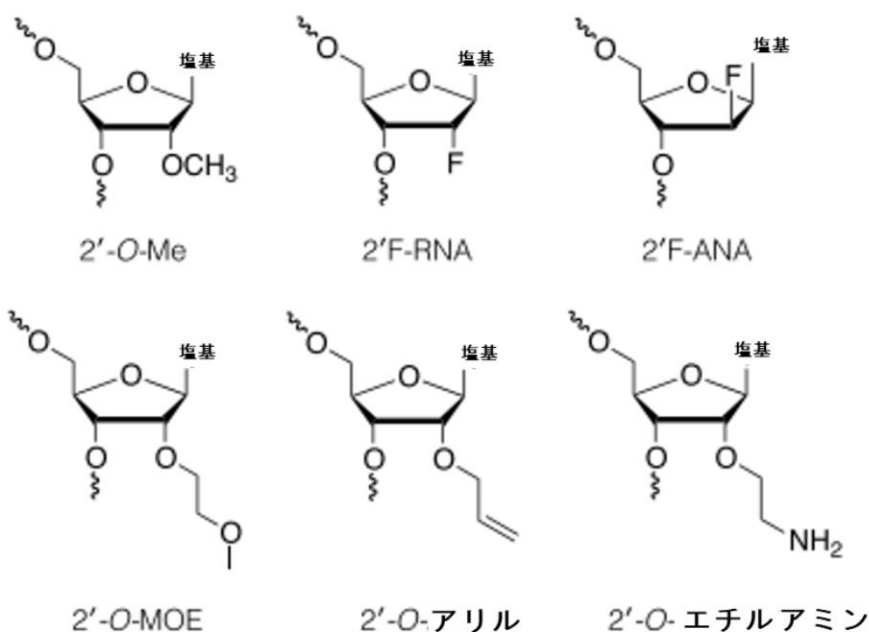
20

30

40

50

【化 1】



10

20

【0131】

I I. D. 2. b 架橋型核酸ヌクレオシド (LNA)

LNAヌクレオシドは、ヌクレオシドのリボース糖環のC 2'とC 4'の間(即ち、2'-4'架橋)にリンカー基(ビラジカルまたは架橋と呼ばれる)を含む2'-糖修飾ヌクレオシドであり、これによりリボース環の立体構造が制限または固定(ロック)される。これらのヌクレオシドは、文献では架橋型核酸または二環式核酸(BNA)と呼ばれている。リボースの立体構造の固定は、LNAが相補的なRNAまたはDNA分子に対するオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、ハイブリダイゼーションの高い親和性(二重安定化)と関連する。これは、オリゴヌクレオチド/相補二重体の融解温度を測定することにより、ルーティーンに決定することができる。

30

【0132】

非限定的なLNAヌクレオシドの例は、WO99/014226、WO00/66604、WO98/039352、WO2004/046160、WO00/047599、WO2007/134181、WO2010/077578、WO2010/036698、WO2007/090071、WO2009/006478、WO2011/156202、WO2008/154401、WO2009/067647、WO2008/150729、Morita et al., Bioorganic & Med.Chem. Lett. 12, 73-76, Seth et al., J. Org. Chem. 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81, and Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009, 37(4),1225-1238に開示されている。

40

【0133】

2'-4'架橋は、1~4つの架橋原子を含んでおり、特に、式-X-Y-である：式中、

Xは、酸素、硫黄、 $-CR^aR^b-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(=CR^aR^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-O-NR^a-$ 、 $-NR^a-O-$ 、 $>C=J$ 、Se、 $-cPr-$ 、 $-O-NR^a-$ 、 $NR^a-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)-O-$ または $-O-CR^aR^b-$ であり；

Yは、酸素、硫黄、 $-(CR^aR^b)_n-$ 、 $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^a-$ 、または $>C=J$ 、Se、 $-cPr-$ 、 $-O-NR^a-$ 、 $-O-CR^aR^b-$ または $NR^a-CR^aR^b-$ で

50

あり；式中、 n は1または2であり；

但し、 $-X-Y-$ は、 $-O-O-$ 、 $Si(R^a)_2-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-SO_2-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^a)=C(R^b)$ 、 $-C(R^a)=N-C(R^a)=N-$ 、 $-C(R^a)=N-C(R^a)=C(R^b)$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^a)=N-$ または $-Se-Se-$ ではない；

J は、酸素、硫黄、 CH_2 または $=N(R^a)$ であり；

R^a および R^b は、独立して、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、チオヒドロキシル、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、ヘテロ環、アミノ、アルキルアミノ、カルバモイル、アルキルアミノカルボニル、アミノアルキルアミノカルボニル、アルキルアミノアルキルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アルカノイルオキシ、スルホンアルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、チオールスルフィドアルキルスルファニル、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、 $-OC(=X^a)R^c$ 、 $-OC(=X^a)NR^cR^d$ および $-NR^eC(=X^a)NR^cR^d$ ；または2つの隣接する R^a および R^b は、一緒になって、任意に置換されたメチレンを形成し；ここで、置換されたアルキル、置換されたアルケニル、置換されたアルキニル、置換されたアルコキシおよび置換されたメチレンは、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、ヘテロサイクル、アリールおよびヘテロアリールから独立して選択される1～3個の置換基で置換されたアルキル、アルケニル、アルキニルおよびメチレンであり；

X^a は、酸素、硫黄または $-NR^c$ であり；

R^c 、 R^d および R^e は、独立して、水素またはアルキルであり；ならびに

n は、1、2または3である。

【0134】

ある実施態様において、 X は、酸素、硫黄、 $-NR^a-$ 、 $-CR^aR^b-$ または $-C(=CR^aR^b)-$ であり、特に、酸素、硫黄、 $-NH-$ 、 $-CH_2-$ または $-C(=CH_2)-$ 、より具体的には酸素である。

【0135】

ある実施態様において、 Y は、 $-CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-CR^aR^b-$ または $-CR^aR^b-CR^aR^b-CR^aR^b-$ であり、特に $-CH_2-CHCH_3-$ 、 $-CHCH_3-CH_2-$ 、 CH_2-CH_2- または $-CH_2-CH_2-CH_2-$ である。

【0136】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-(CR^aR^b)_n-$ 、 $-S-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-CR^aR^b-$ 、 $-O-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-C(=CR^aR^b)-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)CR^aR^b-$ 、 $-O-N(R^a)CR^aR^b-$ または $-N(R^a)-O-CR^aR^b-$ である。

【0137】

ある実施態様において、 R^a および R^b は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキルおよびアルコキシアルキル、特に水素、アルキルおよびアルコキシアルキルからなる基から独立して選択される。

【0138】

ある実施態様において、 R^a および R^b は、水素、ハロゲン、例えば、フルオロ、ヒドロキシル、メチルおよび $-CH_2-O-CH_3$ から独立して選択され、特に水素、メチルおよび $-CH_2-O-CH_3$ からなる基から独立して選択される。

【0139】

ある実施態様において、 R^a は、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。

【0140】

ある実施態様において、 R^b は、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。
ある実施態様において、 R^a および R^b の一方または両方が、水素である。特定の実施態様において、 R^a および R^b のうちの一方のみが水素である。ある実施態様において、 R^a および R^b の一方が、メチルであり、もう一方は水素である。別の実施態様において、 R^a および R^b は両方が、同時にメチルである。

【0141】

本発明の特別な実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$ 、 $-S-CH(CH_3)-$ 、 $-NH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_2-O-CH_3)-$ 、 $-O-CH(CH_2CH_3)-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、 $-O-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-C(=CH_2)CH_2-$ 、 $-C(=CH_2)CH(CH_3)-$ 、 $-N(-O-CH_3)-$ または $-N(CH_3)-$ である。

【0142】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-CR^aR^b-$ であり、ここで R^a および R^b は、独立して、水素、アルキルおよびアルコシアルキルからなる群から選択され、特に水素、メチルおよび $-CH_2-O-CH_3$ である。

【0143】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH_2-$ または $-O-CH(CH_3)-$ であり、特に $-O-CH_2-$ である。

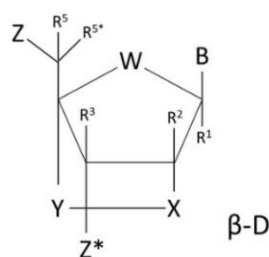
【0144】

2'-4'架橋は、式(A)および式(B)に各々示される通り、リボース環の平面の下方(β -D-立体配置)、または環の平面の上方(α -L-立体配置)のいずれかに存在し得る。

【0145】

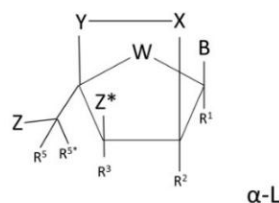
ある実施態様において、本願ASOの修飾ヌクレオシドまたはLNAヌクレオシドは、式IIまたはIIIの一般式を有する：

【化2】



式 II

または



式 III

式中、

Wは、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^a)-$ 、 $-C(R^aR^b)-$ 、特に $-O-$ から選択され；

Bは、核酸塩基または修飾された核酸塩基であり；

Zは、隣接するヌクレオシドまたは5'-末端基とのインターヌクレオシド結合であり；

Z*は、隣接するヌクレオシドまたは3'-末端基とのインターヌクレオシド結合であり；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、独立して、水素、ハロゲン、アルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルコシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、アジド、ヘテロサイクルおよびアリールから選択され；および

X、Y、 R^a および R^b は、本明細書に規定される通りである。

【0146】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ 、 R^a は、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。 $-X-Y-$ のある実施態様では、 R^b は、水素またはアルキル、特に水素ま

たはメチルである。X-Y-の別の実施態様では、R^aおよびR^bの一方または両方が水素である。X-Y-のさらなる実施態様では、R^aおよびR^bのうちの一方のみが水素である。X-Y-の特定の実施態様では、R^aおよびR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。X-Y-の特定の実施態様では、R^aおよびR^bの両方が同時にメチルである。

【0147】

ある実施態様において、-X-、R^aは、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。-X-のある実施態様では、R^bは、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。-X-の特定の実施態様では、R^aおよびR^bの一方または両方が水素である。-X-の特定の実施態様では、R^aおよびR^bのうちの一方のみが水素である。X-の特定の実施態様では、R^aおよびR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。-X-の別の実施態様では、R^aおよびR^bは同時にメチルである。

10

【0148】

ある実施態様では、-Y-、R^aは水素またはアルキルであり、特に水素またはメチルである。-Y-の特定の実施態様では、R^bは、水素またはアルキル、特に水素またはメチルである。-Y-の別の実施態様では、R^aおよびR^bの一方または両方が水素である。-Y-のある実施態様では、R^aおよびR^bのうちの一方のみが水素である。-Y-の別の実施態様では、R^aおよびR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。-Y-のある実施態様では、R^aおよびR^bは同時にメチルである。

【0149】

ある実施態様において、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、独立して、水素およびアルキル、特に水素およびメチルから選択される。

20

【0150】

ある実施態様において、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、全て同時に水素である。

【0151】

ある実施態様において、R¹、R²、R³は、全て同時に水素であり、R⁵およびR^{5*}のうちの一方が水素であり、もう一方は上記に規定されており、特にアルキル、より具体的にはメチルである。

【0152】

ある実施態様において、R¹、R²、R³は、全て同時に水素であり、R⁵およびR^{5*}のうちの一方が水素であり、もう一方はアジドである。

30

【0153】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH₂-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}のうちの1つは同時に全て水素である。このようなLNAヌクレオシドは、WO99/014226、WO00/66604、WO98/039352およびWO2004/046160に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれ、β-D-オキシLNAおよびα-L-オキシLNAヌクレオシドとして当技術分野において一般的に知られているものを含む。

【0154】

ある実施態様において、-X-Y-は、-S-CH₂-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、同時に全て水素である。そのようなチオLNAヌクレオシドは、WO99/014226およびWO2004/046160に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0155】

ある実施態様において、-X-Y-は、-NH-CH₂-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、同時に全て水素である。そのようなアミノLNAヌクレオシドは、WO99/014226およびWO2004/046160に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。

【0156】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH₂CH₂-または-OCH₂CH₂C

50

H₂—であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、同時に全て水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、WO 00 / 0 4 7 5 9 9およびMorita et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. 12, 73-76に開示されており、これらはすべて参照により本明細書に組み込まれており、2'-O-4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)として当技術分野において一般的に知られているものを含む。

【0157】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH₂-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³は全て同時に水素であり、R⁵およびR^{5*}の一方は水素であり、他方は水素ではない、例えばメチルなどのアルキルである。このような5'置換LNAヌクレオシドは、WO 2 0 0 7 / 1 3 4 1 8 1に開示されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0158】

ある実施態様では、-X-Y-は、-O-CR^aR^b-であり、ここで、R^aおよびR^bの一方または両方は水素ではなく、特にメチルなどのアルキルであり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³は同時に全て水素であり、R⁵およびR^{5*}の一方は水素であり、他方は水素ではなく、特にメチルなどのアルキルである。このようなビス修飾LNAヌクレオシドはWO 2 0 1 0 / 0 7 7 5 7 8に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0159】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH(CH₂-O-CH₃)-("2'-O-メトキシエチル二環式核酸", Seth et al., J. Org. Chem. 2010, Vol 75(5) pp. 1569-81)である。

20

【0160】

ある実施態様では、-X-Y-は、-O-CHR^a-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は同時に全て水素である。そのような6'-置換LNAヌクレオシドは、WO 2 0 1 0 / 0 3 6 6 9 8およびWO 2 0 0 7 / 0 9 0 0 7 1に開示されており、これらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。そのような6'-置換LNAヌクレオシドにおいて、R^aは、特にメチルなどのC₁-C₆アルキルである。

【0161】

ある実施態様では、-X-Y-は、-O-CH(CH₂-O-CH₃)-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、同時に全て水素である。このようなLNAヌクレオシドは、環状MOE(cMOE)としても当技術分野で知られており、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 0 7 1に開示されている。

30

【0162】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH(CH₃)-である。

【0163】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH₂-O-CH₂-(Seth et al., J. Org. Chem 2010 op. cit.)である。

【0164】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CH(CH₃)-であり、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は同時に全て水素である。このような6'-メチルLNAヌクレオシドは、cETヌクレオシドとして当技術分野で知られており、WO 2 0 0 7 / 0 9 0 0 7 1(β-D)およびWO 2 0 1 0 / 0 3 6 6 9 8(α-L)に開示されている通りの(S)-cETまたは(R)-cETジアステレオマーのいずれかであってもよく、これら両方が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0165】

ある実施態様において、-X-Y-は、-O-CR^aR^b-であり、ここで、R^aおよびR^bのいずれも水素ではなく、Wは酸素であり、R¹、R²、R³、R⁵およびR^{5*}は、同時に全て水素である。特定の実施態様では、R^aおよびR^bは、同時に両方ともアルキルであり、特に両方ともメチルである。このような6'-ジ置換LNAヌクレオシドはW

50

02009/006478に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0166】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-S-CHR^a-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全て水素である。そのような6'-置換チオLNAヌクレオシドは、WO2011/156202に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。そのような6'-置換チオLNAの特定の実施態様では、 R^a はアルキル、特にメチルである。

【0167】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-C(=CH_2)C(R^aR^b)-$ であり、例えば、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全て水素である。このよ

10

【0168】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-N(OR^a)-CH_2-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全て水素である。ある実施態様では、 R^a はメチルなどのアルキルである。このようなLNAヌクレオシドは、N置換LNAとしても知られており、WO2008/150729に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0169】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-NCH_3-$ (Seth et al., J. Org. Chem 2010 op. cit.)である。

20

【0170】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $ON(R^a)-$ 、 $-N(R^a)-O-$ 、 $-NR^a-CR^aR^b-CR^aR^b-$ または $-NR^a-CR^aR^b-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全て水素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全て水素である。特定の実施態様において、 R^a は、メチルなどのアルキルである(Seth et al., J. Org. Chem 2010 op. cit.)。

【0171】

ある実施態様において、 R^5 および R^{5*} は、同時に双方が水素である。他の実施態様において、 R^5 および R^{5*} の一方は水素であり、他方はメチルなどのアルキルである。そのような実施態様では、 R^1 、 R^2 および R^3 は、特に、水素であり、 $-X-Y-$ は、特に $-O-CH_2-$ または $-O-CHC(R^a)_3-$ 、例えば $-O-CH(CH_3)-$ であり得る。

30

【0172】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-CH_2-O-CH_2-$ のような $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、すべて同時に水素である。そのような実施態様では、 R^a は、特にメチルなどのアルキルであり得る。このようなLNAヌクレオシドは、立体構造が制限されたヌクレオチド(CRN)としても知られており、WO2013/036868に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる

40

【0173】

ある実施態様において、 $-X-Y-$ は、 $-O-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、例えば $-O-CH_2-O-CH_2-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 および R^{5*} は、同時に全てが水素である。特定の実施態様において、 R^a は、特にメチルなどのアルキルであり得る。このようなLNAヌクレオシドは、COCヌクレオチドとしても知られており、Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009, 37(4), 1225-1238に開示されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0174】

指定されない限り、LNAヌクレオシドは、 $\beta-D$ または $\alpha-L$ 立体異性体であってもよいことは認識されるであろう。

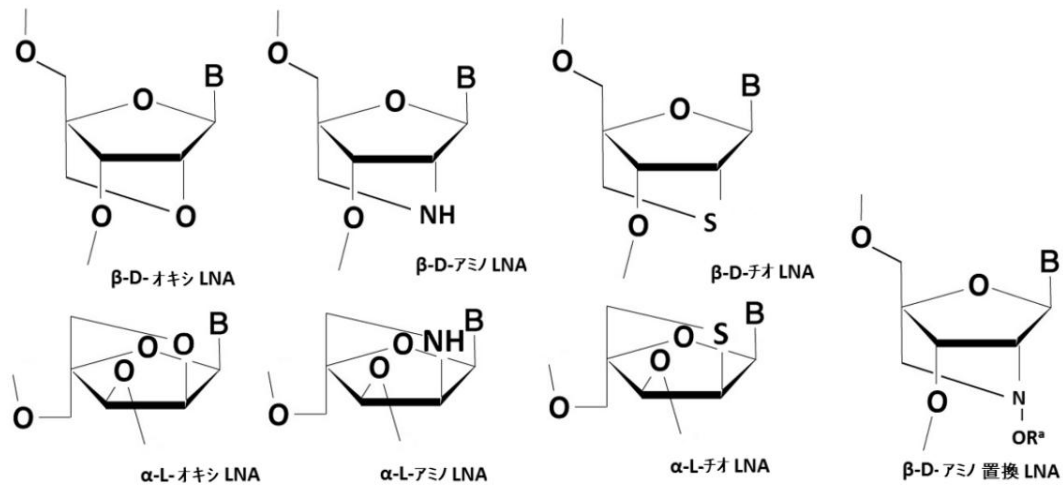
50

【0175】

LNAヌクレオシドの特定の例をスキーム1に示す。

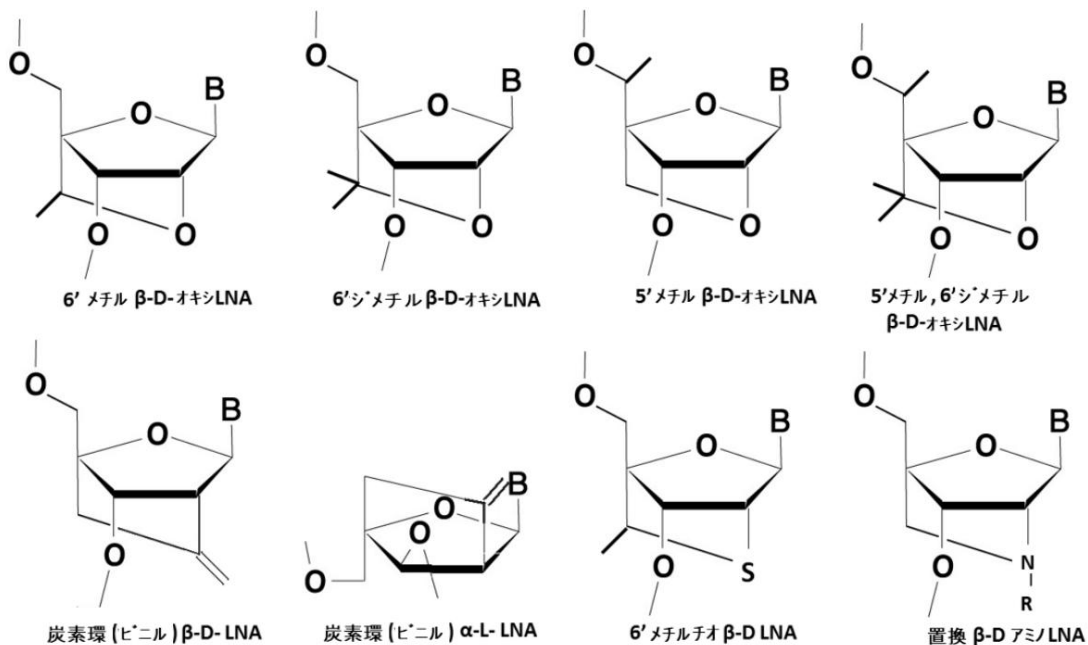
【化3】

スキーム 1



10

【化4】



20

30

【0176】

他の箇所において示された通り、本願のある実施態様では、オリゴヌクレオチド中の LNAヌクレオシドは、β-D-オキシ-LNAヌクレオシドである。

40

【0177】

II. E. ヌクレアーゼ媒介性分解

ヌクレアーゼ媒介性分解とは、相補的なヌクレオチド配列との二重鎖を形成する際に、相補的なヌクレオチド配列の分解を媒介することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。

【0178】

ある実施態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸のヌクレアーゼ媒介性分解により作用してもよく、本明細書のオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ、特にエンドヌクレアーゼ、好ましくはエンドリボヌクレアーゼ(RNase)、例えばRNase Hを動員することができる。ヌクレアーゼ媒介メカニズムを介して作動するオリゴヌクレオチドの

50

デザインの例は、通常、少なくとも5または6つのDNAヌクレオシドの領域を含み、片側または両側に親和性増強ヌクレオシド、例えばギャップマー、ヘッドマーおよびテールマーに隣接されているオリゴヌクレオチドである。

【0179】

II. F. RNase Hの活性および動員(リクルート)

アンチセンスオリゴヌクレオチドのRNase H活性とは、相補的なRNA分子との二重鎖においてRNase Hをリクルートし、相補的なRNA分子の分解を誘導する能力を指す。WO 01/23613は、RNase Hをリクルートする能力を決定するために使用され得るRNase H活性を決定するためのインビトロ方法を提供す。通常、オリゴヌクレオチドは、相補的な標的核酸配列が提供された場合、RNase Hを動員する能力があると考えられ、その能力は、 pmol/l/min で測定され、試験される修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、DNAモノマーのみを含んでおり、オリゴヌクレオチド中の全てのモノマー間にホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドを用いて、WO 01/23613の実施例91～95に提供される方法を用いた場合に決定される初速度(initial rate)の少なくとも5%、例えば、少なくとも10%または20%以上の初速度を有する。

【0180】

ある実施態様において、オリゴヌクレオチドは、相補的な標的核酸が提供された時に、 pmol/l/min で測定されたRNase H初速度が、例えば、試験されるオリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、DNAモノマーのみを含んでおり、オリゴヌクレオチド中の全てのモノマー間にホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドを用いて、またWO 01/23613の実施例91～95に提供される方法を用いた場合に決定される初速度の少なくとも20%未満、例えば10%未満、例えば5%未満である場合、RNase Hを動員することが本質的に不可能であるとみなされる。

【0181】

II. G. ASOのデザイン

本開示のASOは、ヌクレオシドおよびヌクレオシドアナログの両方を含むヌクレオチド配列を含むことができ、ギャップマー、ブロックマー、ミキサマー、ヘッドマー、テールマーまたはトータマーの形態で存在し得る。本願ASOと一緒に使用することができるギャップマー、ブロックマー、ミックスマー、ヘッドマー、テールマーまたはトータマーの立体配置の例は、米国特許出願公開第2012/0322851号に記載されている。

【0182】

本明細書で使用される用語「ギャップマー」は、1つ以上の親和性増強修飾ヌクレオシド(フランク:flanks)により5'および3'が挟まれたRNase Hリクルーティングオリゴヌクレオチドの領域(ギャップ)を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。用語「ヘッドマー」および「テールマー」は、該フランクの1つが欠失している、即ち、オリゴヌクレオチドの1つの末端のみが親和性増強修飾ヌクレオシドを含んでいるRNase Hをリクルートすることが可能なオリゴヌクレオチドである。ヘッドマーについては、3'フランクが欠失しており(即ち、3'フランクは親和性増強修飾ヌクレオシドを含む)、テールマーについては、5'フランクが欠失している(即ち、3'フランクが親和性増強修飾ヌクレオシドを含む)。用語「LNAギャップマー」は、親和性増強修飾ヌクレオシドの少なくとも1つがLNAヌクレオシドであるギャップマーオリゴヌクレオチドである。用語「混合型ウィングガパー」とは、フランク領域が、少なくとも1つのLNAヌクレオシドおよび少なくとも1つのDNAヌクレオシドまたは非LNA修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシド、例えば、少なくとも1つの2'置換された修飾ヌクレオシド、例えば、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA(MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)および2'-フルオロ-RNAヌクレオシドを含んでいるLNAギャップマーをいう。

【0183】

「ミックスマー」と呼ばれる別の「キメラ」ASOは、(i)DNAモノマーまたはヌクレオシドアナログモノマーが、RNaseによって認識でき、かつ切断可能なもの；および(ii)非RNaseリクルーティングヌクレオシドアナログモノマーの互換的組成物を含む。

【0184】

「トータマー」とは、天然に存在していないヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのみを含む一本鎖のASOである。

【0185】

ある実施態様において、標的領域に対するASOの親和性を高めることに加えて、いくつかのヌクレオシドアナログは、RNase(例えば、RNase H)の結合および開裂を媒介する。 α -L-LNAモノマーは、RNase H活性をある程度まで増強するので、ある実施態様においては、 α -L-LNAモノマーを含有しているASOのギャップ領域(例えば、本明細書で言及される領域B)は、RNase Hにより認識可能かつ開裂可能なより小さなモノマーを含み、このミキサマー構築体に高い柔軟性が組み込まれる。

【0186】

III. ギャップマーのデザイン

ある実施態様において、本願ASOは、ギャップマーであり、領域B(B)として本明細書において言及されるRNase HなどのRNaseを動員できるヌクレオチド(例えば、1つまたは複数のDNA)に隣接したストレッチを含み、ここで領域Bは、領域Bのヌクレオチドの近接ストレッチに対してヌクレオシドアナログの領域5'および3'により、5'および3'両方で挟まれている—これらの領域は、それぞれ領域A(A)およびC(C)として示される。ある実施態様において、ヌクレオシドアナログは、糖修飾ヌクレオシド(例えば、高親和性糖修飾ヌクレオシド)である。特定の実施態様では、領域AおよびCの糖修飾ヌクレオシドは、標的核酸に対するASOの親和性を増強する(すなわち、親和性増強2'糖修飾ヌクレオシド)。ある実施態様において、糖修飾ヌクレオシドは、高親和性の2'糖修飾ヌクレオシド、例えばLNAまたは2'-MOEである。

【0187】

ギャップマーでは、領域Bの5'および3'の大部分のヌクレオチドは、DNAヌクレオチドであり、領域AおよびCのヌクレオシドアナログ(例えば、高親和性糖修飾ヌクレオシド)に各々隣接して配置されている。ある実施態様において、領域AおよびCは、領域Bから最も離れている末端(即ち、領域Aの5'末端および領域Cの3'末端)にヌクレオシドアナログを有することによりさらに規定され得る。

【0188】

ある実施態様において、本願ASOは、式(5'から3'まで)A-B-Cのヌクレオチド配列を含んでいる：式中の(A)(5'領域または第1のウイング配列)は、少なくとも1つのヌクレオシドアナログ(例えば、3～5のLNA単位)を含み；(B)は、RNaseを動員することができる(pre-mRNAまたはmRNAターゲットのような相補的なRNA分子と二重鎖が形成される場合)少なくとも4個の連続するヌクレオチド(例えば、4～24のDNA単位)を含み；および(C)(3'領域または第2のウイング配列)は、少なくとも1つのヌクレオシドアナログ(例えば、3～5のLNA単位)を含む。

【0189】

ある実施態様において、領域Aは、LNAなどの3～5個のヌクレオチドアナログを含み、領域Bは、6～24(例えば、6、7、8、9、10、11、12、13または14)個のDNA単位を含み、領域Cは、LNAなどの3または4つのヌクレオチドアナログを含む。そのようなデザインは、(A-B-C)3-14-3、3-11-3、3-12-3、3-13-3、4-9-4、4-10-4、4-11-4、4-12-4および5-10-5を含む。ある実施態様では、ASOは、 $LLLLD_nLLLL$ 、 $LLLLLD_nLLLL$ または $LLLLLLD_nLLLLLL$ のデザインを有しており、Lはヌクレオシドアナログであり、DはDNAであり、nは、4～24の任意の整数であり得る。ある実施態様においては、nは、6～14の間の任意の整数であり得る。ある実施態様では、nは8～12の

10

20

30

40

50

間の任意の整数であり得る。

【0190】

更なるギャップマーのデザインは、WO2004/046160、WO2007/146511およびWO2008/113832に開示されており、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0191】

II. H. インターヌクレオチド結合

本明細書に記載されるASOのモノマーは、連結基を介して結合している。好適には、各モノマーは、連結基を介して3'隣接モノマーに連結されている。

【0192】

当業者は、本明細書の内容から、ASOの末端の5'モノマーは、5'末端基を含んでも良いか、または含まなくとも良いが、5'連結基を含まないことを理解するであろう。

【0193】

用語「連結基」または「インターヌクレオチド結合」とは、2つのヌクレオチドを一体として共有結合できる基を意味することが意図される。具体的かつ好ましい例としては、ホスフェート基およびホスホロチオエート基が挙げられる。

【0194】

本願ASOのヌクレオチドまたはその連続するヌクレオチド配列は、連結基により一体となって結合されている。好適には、各ヌクレオチドは、連結基を介して3'隣接ヌクレオチドに結合される。

【0195】

ある実施態様において、インターヌクレオチド結合は、その通常のホスホジエステルから、ヌクレアーゼの攻撃に対してより耐性のあるものに、例えば、RNAse Hにより切断可能なホスホロチオエートへと改変され、これにより標的遺伝子の発現を低下させる際にアンチセンス阻害の経路も可能となる。ある実施態様において、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも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%のインターヌクレオチド結合が改変される。

【0196】

II. I. コンジュゲート

本明細書で使用される用語「コンジュゲート」は、非ヌクレオチド部位(コンジュゲート部位または領域Cまたは第三領域)に共有結合しているASOを指す。

【0197】

本願ASOを、1以上の非ヌクレオチド部分とコンジュゲーションすることにより、ASOの薬理特性を、例えば、ASOの活性、細胞内分布、細胞内取り込み、または安定性に影響を与えることにより改善することができる。ある実施態様では、非ヌクレオチド部分は、ASOの細胞分布、バイオアベイラビリティ、代謝、排出、透過性および/または細胞取り込みを改善することによって、ASOの薬物動態特性を変更または増強する。特定の実施態様において、非ヌクレオチド部位により、特定の器官、組織または細胞のタイプがASOの標的となり、それにより、その器官、組織または細胞のタイプにおけるASOの有効性を増強することができる。別の実施態様では、非ヌクレオチド部位は、非標的細胞型、組織または器官におけるASOの活性を低下させ、例えば、標的外の活性または非標的細胞型、組織または器官における活性を低下させる。WO93/07883およびWO2013/033230は、好適なコンジュゲート部分を提供する。さらなる好適なコンジュゲート部分は、アジア糖蛋白質受容体(ASGPr)に結合することが可能なものである。特に、3価のN-アセチルガラクトサミンコンジュゲート部位は、ASGPrと結合するのに適しており、例えば、WO2014/076196、WO2014/207232およびWO2014/179620を参照されたい。これら各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0198】

ある実施態様において、非ヌクレオチド部分(コンジュゲート部分)は、炭水化物、細胞表面受容体リガンド、薬剤、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素(例えば、細菌毒素)、ビタミン、ウイルスタンパク質(例えば、カプシド)およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0199】

II. J. 活性化ASO

本明細書で使用される用語「活性化ASO」という用語は、本明細書に記載されたコンジュゲートを形成するために、1つ以上のコンジュゲート部位、即ちそれ自体が核酸またはモノマーではない部位へのASOの共有結合を可能にする少なくとも1つの官能基部位と共有結合されている(即ち、官能化されている)ASOを指す。通常、官能基部位は、例えば、3'-ヒドロキシル基またはアデニン塩基の環外NH₂基、スパーサー(親水性であり得る)およびコンジュゲート部位(例えば、アミノ基、スルフィドリル基またはヒドロキシル基)に結合できる末端基を介して、ASOに共有結合することが可能な化学基を含む。ある実施態様において、この末端基、例えば、NH₂基は保護されていない。別の実施態様において、この末端基は、任意の適切な保護基により、例えば、"Protective Groups in Organic Synthesis" by Theodora W Greene and Peter G M Wuts, 3rd edition (John Wiley & Sons, 1999)に記載された保護基により保護されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0200】

ある実施態様において、本願ASOは、ASOの5'末端へのコンジュゲート部位と共有結合できるように、5'末端で官能化されている。別の実施態様では、本願ASOは、3'末端で官能化され得る。また別の実施態様では、本願ASOは、バックボーンに沿って、または複素環塩基の部位上で官能化され得る。さらなる別の実施態様では、本願ASOは、5'末端、3'末端、バックボーンおよび塩基から独立して選択される1以上の位置で官能化され得る。

【0201】

ある実施態様において、本願の活性化ASOは、合成中に官能基部位に共有結合される1以上のモノマーを組み込むことにより合成される。別の実施態様において、本願の活性化ASOは、官能化されていないモノマーを用いて合成して、このASOを合成の完了時に官能化する。

【0202】

III. 医薬組成物および投与経路

本願ASOは、医薬組成物および組成物において使用することができる。ある実施態様では、そのような組成物は、医薬的に許容される希釈剤、担体、塩またはアジュバントを含む。特定の実施態様では、医薬的に許容される塩は、ナトリウム塩、カリウム塩またはアンモニウム塩を含む。

【0203】

本願ASOは、治療される患者に重篤な副作用を引き起こすことなく、治療上有効な量を患者に送達するのに十分量で医薬的に許容される担体または希釈剤のような単位製剤中に含まれ得る。しかし、ある実施態様では、重篤な副作用は、治療的処置の肯定的な結果を確実にするという点では許容され得る。

【0204】

製剤化された薬剤は、医薬的に許容される結合剤およびアジュバントを含んでもよい。カプセル剤、錠剤または丸剤は、例えば以下の化合物：結合剤として微結晶セルロース、ガムまたはゼラチン；賦形剤としてデンプンまたは乳糖；滑沢剤としてステアリン酸塩；各種甘味料または香料を含むことができる。カプセル剤の場合、投与単位は、脂肪油のような液体担体を含むことができる。同様に、糖衣または腸管剤は、投与単位の一部とすることができる。ASO製剤は、有効な医薬成分およびミセル状エマルジョンを形成する脂質エマルジョンであってもよい。

【0205】

本願の医薬組成物は、局所的または全身的な治療が望まれるかどうかに応じて、また治療領域に応じて多くの方法で投与することができる。投与とは、(a)経口投与；(b)肺投与、例えば、散剤またはエアロゾルの吸入または吹送、例えばネブライザーによる投与；気管内、鼻腔内投与；(c)局所投与、例えば、表皮、経皮、点眼、および経膈および直腸送達を含む粘膜への局所投与など；または(d)非経口投与、例えば、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または点滴など；または(d)静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内注射または注入を含む非経口投与；または頭蓋内投与を含む非経口投与、例えば、髄腔内、脳室内または心室内投与であり得る。ある実施態様において、ASOは、静脈内、腹腔内、経口、局所またはボーラス注射として投与されるか、または標的臓器に直接投与される。ある実施態様において、ASOは、ボーラス注射として心腔内または静脈内に投与される。ある実施態様において、ASOは皮下投与される。ある実施態様では、ASOは経口投与される。

10

【0206】

局所投与のための医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、目薬、噴霧、坐薬、液体および粉体を含むことができる。従来の医薬用担体、水溶液、粉末または油性基材、増粘剤などを必要としてもよく、または望ましい場合がある。局所用製剤の例には、本願ASOは、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、界面活性剤などの局所送達剤との混和物にて存在している製剤が挙げられる。経口投与用の組成物および製剤には、粉末または顆粒、微小粒子、ナノ粒子、水または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、小袋、錠剤またはミニタブレットが含まれるが、これらに限定されない。非経口投与、髄腔内投与、脳室内投与または心室内投与のための組成物および製剤は、無菌水溶液を含むことができ、この水溶液は、緩衝剤、希釈剤および他の適切な添加剤、例えば、浸透促進剤、担体化合物および他の医薬的に許容される担体または賦形剤を含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0207】

本願の医薬組成物には、溶液、エマルジョンおよびリポソーム含有製剤が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物は、次のものに限定しないが事前に形成された液体、自己乳化性固体および自己乳化性半固体を含む様々な成分から生成され得る。標的組織への薬物の送達は、次のものに限定しないがカチオン性リポソーム、シクロデキストリン、ポルフィリン誘導体、分岐鎖デンドリマー、ポリエチレニミンポリマー、ナノ粒子およびマイクロスフェアを含めたキャリア媒介性の送達によって増強され得る(Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27)。

30

【0208】

本願の医薬製剤は、有利には、単位用量形態で示すことができ、製薬業界でよく知られている従来技術に従って調製することができる。このような技術には、活性成分を医薬用担体または賦形剤と混合する工程が含まれる。一般に、製剤は、活性成分を液体担体または細かく粉碎された固体担体またはその両方と均一かつ十分に混合することにより、また必要に応じて成形することにより製造される。

40

【0209】

非経口投与、皮下投与、皮内投与または局所投与の場合、製剤は、無菌希釈剤、緩衝剤、浸透圧調整剤および抗菌剤を含むことができる。活性なASOは、体内からの分解または即時排出を防ぐ担体、例えば、放出制御特性を有する担体(例えば、インプラントまたはマイクロカプセルなど)を用いて調製することができる。静脈内投与のためには、担体は、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水であり得る。2007年3月22日に公開された国際公開第WO2007/031091号(A2)は、医薬的に許容される適切な希釈剤、担体およびアジュバントをさらに提供しており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0210】

50

IV. 診断

本明細書は、心血管系疾患、例えば心不全の診断中に有用な診断方法をさらに提供する。本願A S Oを用いて診断することができる心血管系疾患の非限定的な例としては、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓症および静脈血栓症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ある実施態様において、心不全は、左心不全、右心不全、うっ血性心不全、駆出率低下型心不全(H F r E F)、駆出率保存型心不全(H F p E F)、駆出率中間型心不全(H F m r E F)、肥大型心筋症(H C M)、高血圧性心疾患(H H D)または高血圧性肥大型心筋症を含む。

【0211】

本願A S Oは、個人から得た組織または体液中のC A M K 2 D転写物の発現を実測して、測定された発現レベルを、正常な組織または体液中の標準的なC A M K 2 D転写物の発現レベルと比較するために使用することができ、その結果により、標準的な発現レベルと比較された発現レベルの増加が、本願A S Oにより治療可能な疾患の指標となる。

【0212】

本願A S Oは、当業者には既知のあらゆる方法を用いて、生物学的試料中のC A M K 2 D転写物レベルをアッセイするために使用することができる(Touboul et. al., Anticancer Res. (2002) 22 (6A): 3349-56; Verjout et. al., Mutat. Res.(2000) 640: 127-38);Stowe et. al., J. Virol. Methods (1998) 75 (1): 93-91)。

【0213】

「生物学的試料」という用語は、C A M K 2 D転写物を発現する可能性のある個体、細胞株、組織培養物または細胞の他の供給源から得られるあらゆる生物学的試料を指す。哺乳動物由来のそのような生物学的試料を得るための方法は、当技術分野では周知である。

【0214】

V. A S Oを含むキット

本発明は、本明細書に記載された本願A S Oを含むキットをさらに提供し、本明細書に記載された方法を実行するために使用することができる。特定の実施態様では、キットは、1以上の容器に入った少なくとも1つのA S Oを含む。ある実施態様では、キットは、検出アッセイを実行するために必要および／または十分な成分のすべてを含み、これには、全てのコントロール、アッセイを実行するための指示書および結果を分析かつ提示するために必要な任意のソフトウェアなどが含まれる。当業者であれば、本願A S Oを、当技術分野では周知の確立されたキットの形態に組み込むことができることは容易に理解されるであろう。

【0215】

VI. 使用方法

本願A S Oは、例えば、診断、治療および予防のための研究試薬として利用することができる。

【0216】

研究において、そのようなA S Oは、細胞および実験動物におけるC A M K 2 Dタンパク質の合成を特異的に阻害するために使用することができ(通常、m R N Aを分解または阻害し、それによりタンパク質の形成を阻害する)、これにより標的の機能分析または治療的介入のための標的としてのその有用性を容易に評価することができる。さらに、インビトロまたはインビボで、1以上の本願A S O、コンジュゲートまたは組成物の有効量を細胞または組織に接触させることを特徴とする、細胞または組織におけるC A M K 2 D m R N Aおよび／またはC A M K 2 Dタンパク質の発現をダウンレギュレートする方法が提供される。

【0217】

診断において、A S Oは、ノーザンブロッティング、イン・サイチュ・ハイブリダイゼーションまたは同様の技術により、細胞または組織におけるC A M K 2 D転写物の発現を検出かつ定量するために使用することができる。

10

20

30

40

50

【0218】

治療薬としては、CAMK2D転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の発現を調節することによって治療できる疾患または障害を有することが疑われる動物またはヒトを、本願ASOを投与することによって治療することができる。さらに提供される方法は、本願ASOまたは組成物の1以上のASOまたは組成物の治療的または予防的に有効な量を投与することによって、CAMK2D転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の発現増加に関連した疾患または症状に罹患しているか、または罹患し易いと考えられる哺乳動物を治療する(例えば、ヒトを治療する)方法である。本発明のASO、コンジュゲートまたは医薬組成物は、通常、有効量で投与される。ある実施態様では、本願ASOまたはコンジュゲートは、治療に使用される。

10

【0219】

本発明は、本明細書で言及される1以上の心血管系疾患、例えば、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓性疾患および静脈血栓症から選択される疾患を治療するために使用する本願ASOをさらに提供する。

【0220】

特定の実施態様では、疾患、障害または症状は、CAMK2D遺伝子転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の過剰発現と関連している。

【0221】

本発明は、細胞または組織におけるCAMK2D遺伝子転写物および／またはCAMK2Dタンパク質の発現を阻害する(例えば、低下させる)方法も提供し、インビトロまたはインビボで、細胞または組織に、1つ以上の本願ASO、コンジュゲートまたはそれらの医薬組成物の有効量を接触させて、CAMK2D遺伝子転写物の発現の分解に影響を及ぼして、CAMK2Dタンパク質を低下させることを特徴とする方法をさらに提供する。

20

【0222】

本発明は、本明細書で言及されるような障害の治療のための医薬製造、または本明細書で言及されるような障害としての治療の方法のための、本願ASOまたはコンジュゲートの使用を提供する。

【0223】

本発明は、本願ASOまたはそのコンジュゲートを細胞に投与することにより、細胞におけるCAMK2Dタンパク質の阻害または低下に影響を与えることを特徴とする、CAMK2Dを発現している細胞においてCAMK2Dタンパク質を阻害または低下させるための方法をさらに提供する。

30

【0224】

本発明は、本願ASOまたはコンジュゲートを投与することを特徴とする、必要な対象における運動ニューロン(例えば、心筋細胞に存在するようなもの)の過剰な興奮性を低下、改善、予防または治療する方法を含む。

【0225】

本発明は、本明細書に記載した本願ASOまたはそのコンジュゲートおよび／または本願医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを特徴とする、本明細書に記載の障害を治療するための方法も提供する。

40

【0226】

本願ASOおよび他の組成物は、CAMK2Dタンパク質の過剰発現に関連する症状を治療するために使用することができる。

【0227】

一般的に、本発明の一態様は、CAMK2Dの異常なレベルに関連した症状に罹患している、または異常なレベルに関連した症状に罹患し易い哺乳動物を治療する方法に関し、1以上のLNA単位を含むCAMK2D転写物を標的としたASOの治療的に有効な量をその哺乳動物に投与することを特徴とする。本明細書に関するASO、そのコンジュゲートまたは医薬組成物は、有効量で通常投与される。

50

【0228】

本開示の興味深い態様は、本明細書において規定されるようなASO(化合物)または本明細書で規定されるようなコンジュゲートを、本明細書で言及されるような疾患、障害または症状を治療するための医薬製造のために使用することに関する。

【0229】

本願方法は、異常なCAMK2Dタンパク質レベルによって引き起こされる疾患を治療または予防するために用いることができる。ある実施態様では、CAMK2Dタンパク質の異常なレベルによって引き起こされる疾患が、心血管疾患である。特定の実施態様では、心血管疾患は、冠動脈疾患、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症性心疾患、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓症および静脈血栓症を含むことができる。

10

【0230】

特定の実施態様において、心血管系疾患は、心不全であり、これには、左心不全、右心不全、うっ血性心不全、駆出率低下型心不全(HFrEF)、駆出率保存型心不全(HFpEF)、駆出率中間型心不全(HFmrEF)、肥大型心筋症(HCM)、高血圧性心疾患(HHD)または高血圧性肥大型心筋症を治療するための方法にも関する。

【0231】

あるいは、ある実施態様において、本明細書は、さらにCAMK2Dタンパク質の異常なレベルを治療するための方法に関し、この方法は、本願ASOまたは本願コンジュゲートまたは本願医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。

20

【0232】

本発明は、医薬品として使用するための、本明細書に規定されたASO、組成物またはそのコンジュゲートに関する。

【0233】

本発明は、さらに、CAMK2Dタンパク質またはCAMK2Dタンパク質の変異体(例えば、対立遺伝子変異体、該対立遺伝子変異体は、本明細書で言及される1の疾患と関連している)の発現の異常なレベルを治療するための医薬品製造のための、本明細書に規定される化合物、組成物またはコンジュゲートの使用に関する。

【0234】

治療を必要としている患者とは、疾患または障害に罹患しているか、または罹患する可能性のある患者をいう。

30

【0235】

本発明の実施態様は、別段の指示がない限り、当技術の範囲内である、細胞生物学、細胞培養学、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の従来技術を利用する。そのような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

40

50

Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooke, Antisense drug Technology: Principles, Strategies and Applications, 2nd Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.)を参照されたい。

【0236】

上記で引用した全ての参考文献、および本明細書で引用した全ての参考文献は、その全てが参照により本明細書に組み込まれる。

【0237】

以下の実施例は、例示の目的で提供され、限定を目的とするものではない。

【実施例】

【0238】

実施例1：ASOの構築

本明細書に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CAMK2D pre-mRNA (配列番号：1)中の様々な領域を標的とするようにデザインされた。配列番号：1は、GenBankアクセッション番号NC_000004.12の残基113,451,032~113,761,927の逆相補体に対応するゲノムCAMK2D配列を示す。例えば、ASOを、図1Aおよび1Bに示されるように、配列番号：1の開始部位および終了部位を用いて示される領域を標的とするように構築した。本願ASOの配列の例は、図1Aおよび1Bにおいて提供される。ある実施態様においては、ASOを、図3に示されるようにギャップマーであるようにデザインした。本明細書のギャップマーは、架橋核酸-LNA(大文字)を含むようデザインされた。例えば、ギャップマーは、5'末端および3'末端にβ-デオキシLNAを有し、ホスホロチオエート骨格を有し得る。しかし、LNAは、その他のヌクレオシドアナログで置換されていてもよく、骨格は別のタイプのバックボーン(例えば、ホスホジエステル結合、ホスホトリエステル結合、メチルホスホネート結合、ホスホロアミダート結合またはそれらの任意の組み合わせ)であってもよい。

【0239】

ASOは、当分野において既知の方法を用いて合成された。そのようなASOを製造する方法の例は、Barciszewski et al., Chapter 10- "Locked Nucleic Acid Aptamers" in Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols, vol. 535, Gunter Mayer (ed.) (2009)に記載されており、その内容の全てが参照により本明細書に組み込まれている。

【0240】

実施例2：HEK293細胞におけるCAMK2D mRNAの低下を測定するためのqPCRアッセイ

本願ASOを、ヒト胚性腎細胞(HEK293)(European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)、カタログ番号：85120602)におけるCAMK2D mRNA発現を低下させる能力について試験した。HEK293細胞は、細胞培養培地(DMEM/AQ/D0819, 10%FBS, Pen/Strep)中で増殖させた。5日ごとに、細胞を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、その後0.25%トリプシン-EDTA溶液を加えて、37℃で2~3分間インキュベーションして、細胞播種前にトリチュレートして、トリプシン処理を行った。細胞は15回までの継代培養にて維持された。

【0241】

実験のために、100μLの増殖培地に96ウェルプレートで3,500個/ウェルの細胞を播種した。ASOを、750μMのストックから調製し、PBSに溶解した。細胞を播種してから約24時間後、ASOを最終濃度25μMで細胞に添加した。その後、細胞を、培地の変更なしに3日間インキュベートした。インキュベーション後、125μLのPURELINK(登録商標)Pro 96 溶解緩衝液および125μLの70%エタノールを添加した後、培地を除去して、細胞を回収した。次いで、製造者指示書に従ってRNAを精製し、最終容量50μLの水で溶出し、RNA濃度を10~20ng/μLとした。その後、RNAを水で10倍に希釈した後、ワンステップqPCR反応を行った。

【0242】

ワンステップqPCR反応のために、qPCR-mix(qScriptTMXLE 1-step RT-qPCR TOUGHMIX(登録商標)Low ROX, QauntaBio社)および2つのTaqmanプローブを、10:1:1:1の比率で混合し、マスターミックスを生成した(qPCRmix: プローブ1:プローブ2)。Taqmanプローブは、Life Technologiesから入手した: CAMK2D__Hs009943538__m1; GAPDH4325792。次いで、マスターミックス(6 μ L)およびRNA(4 μ L、1~2 ng/ μ L)を、qPCRプレート(MICROAMP(登録商標)optical 384 well, カタログ番号4309849)中で混合した。プレートを密封した後、プレートを高速回転に付して(1000 g, RTで1分)、ViiATM 7システム(Applied Biosystems, Thermo)に移した。以下のPCR条件を用いた: 50°Cで15分間; 95°Cで3分間; 95°Cで5秒、次いで1.6°C/秒の温度低下、次いで60°Cで45秒の40サイクル。データを、QuantStudio(登録商標)Real-time PCRソフトウェアを用いて解析した。ASO処理したサンプルの阻害率を、コントロール処理したサンプルと比較して計算した。結果を、図2および図4に示した。

10

【0243】

実施例3. ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(hiPSC-CM)におけるCAMK2D mRNAの低下量を測定するためのQUANTIGENE(登録商標)分析(96ウェルアッセイ)

ヒトCAMK2D mRNAを低下させるASOの能力を、QUANTIGENE(登録商標)分析によりインビトロで測定した。セルラー・ダイナミクス・インターナショナル("iCell²")から得たヒト人工多能性幹細胞由来の心筋細胞(hiPSC-CM)を、製造元の指示書に従って解凍して、播種し、培養した。これらの心筋細胞は、2009年に機能的な心筋細胞への分化に初めて成功したヒト誘導性の多能性幹細胞から得られたものである(Zhang et al., Circ Res 104(4):230-41 (2009))。それ以来、hiPSC-CMは、ヒトの心臓や関連疾患の様々な側面を研究するために使用されてきた。これらの細胞は、それらが得られたヒトのドナーの遺伝的形質を担持しているため、既存の動物モデルと比較して、ヒトの生理学または病態生理学に関するより優れた予測因子となることが多い(Blazeski et al., Prog Biophys Mol Biol 110:166-177 (2012))。

20

【0244】

ワークフロー: 細胞の播種前に、プレコラーゲンコート96ウェルプレートを以下のようにフィブロネクチンでコーティングした。フィブロネクチン(1 mg/mL)を、PBS(-Ca²⁺, -Mg²⁺)で1:100に希釈して、50 μ Lの希釈フィブロネクチン溶液を96ウェルプレートの各ウェルに添加した。プレートを、水平に静かに振盪して、各ウェルの底面にフィブロネクチンを均一にコーティングした。その後、プレートを37°Cで90分間インキュベートした。製造者の指示書の通りに、フィブロネクチン溶液を吸引した直後に、細胞をプレートに加えた。細胞を、30,000細胞/ウェルにて、メーカーの100 μ Lの播種用培地に播種し、37°Cおよび5% CO₂で4時間インキュベートした。次いで、播種用培地を吸引し、100 μ Lの維持培地と交換した後、細胞を、37°Cおよび5% CO₂にて、1日おきに培地交換しながらインキュベートした。ASOを水で希釈し、DIV08(即ち、播種後8日目)に細胞に添加した。その後、細胞を、37°Cおよび5% CO₂にてASO添加後3日間インキュベートして、mRNAの定常状態での低下を達成した。

30

40

【0245】

インキュベーション後に、培地を除去し、以下のように細胞を溶解した。処理用細胞溶解緩衝液は、QUANTIGENE(登録商標)3x溶解緩衝液の99部に、プロテイナーゼKを1部添加し、dH₂Oで1:3に希釈して、作成した。処理用細胞溶解緩衝液を、220 μ L/ウェルでプレートに添加した。溶解緩衝液を添加した後、プレートを、プレートシェーカー上で10分間中速(即ち、10のうち5~6の速度)で振盪した。次いで、プレートを、55°Cで30分間インキュベートした。このインキュベーションの後に、溶

50

解物を -80°C で凍結するか、または直ぐアッセイした。溶解物のmRNAの測定は、特異的にデザインされた標的RNA捕捉プローブのセットを用いるDNAシグナル増幅方法を用いてRNAを定量するQUANTIGENE(登録商標)2.0 Reagent System(AFFYMETRIX(登録商標))を用いて行った。

【0246】

アッセイ：捕捉プレート(捕捉プローブでコーティングされた96ウェルポリスチレンプレート)の各ウェルには、処理用プローブセットの20 μL を重層した。処理用プローブセットの試薬は、製造元指示書に従い(QUANTIGENE(登録商標)2.0 AFFYMETRIX(登録商標))、ヌクレアーゼ不含水(12.05 μL)、溶解液(6.65 μL)、ブロッキング試薬(1 μL)および特異的な2.0プローブセット(0.3 μL)(ヒトのCAMK2D
カタログ#SA-3000428またはヒトPOLR2Aカタログ#SA-10004)を
組み合わせて調製した。次いで、細胞溶解液(または、バックグラウンドコントロール用の
ブランクウェルで使用するための1x溶解バッファー)を、80 μL /ウェルの容量で捕捉
プレートに添加し、1ウェルあたり100 μL の全液量とした。プレートを、QUANT
IGENE(登録商標)オイルシールとハンドクラックシーラーを組み合わせて密封した。
プレートを、240gで60秒間の遠心分離の後、 55°C で16~20時間インキュベ
ートしてハイブリダイズさせた(ターゲットRNA捕捉)。

【0247】

シグナル増幅と標的RNAの検出は、洗浄バッファーを3回(200、300および300
0 μL /ウェルの系で、バッファーを各ステップ間で除去)用いてプレートを洗浄して、任
意の結合していない物質を除去した後、240gで1分間、天地を逆にして遠心分離を行
い、ウェルを乾燥させた。次いで、2.0事前増幅化ハイブリダイゼーション試薬(100
 μL /ウェル)を添加し、 55°C で1時間インキュベートした後、吸引して、洗浄バッフ
ァーを添加し、吸引を3回(200、300および300 μL /ウェルの系で、バッファーを
各ステップ間で除去)を行い、その後240gで1分間、天地を逆にして遠心分離を行い、ウ
ェルを乾燥させた。次いで、2.0増幅化ハイブリダイゼーション試薬を添加し(100 μ
L/ウェル)、 55°C で1時間インキュベートし、次いで洗浄、吸引および乾燥の工程を上
記のように繰り返した。次に、2.0標識プローブハイブリダイゼーション試薬(100 μ
L/ウェル)を添加し、 50°C で1時間インキュベートした後、前記したように、洗浄、吸
引、乾燥の工程を繰り返した。次に、2.0基質(100 μL /ウェル)をプレートに添加し
た。プレートを、室温で5分間インキュベートし、15分以内にルミノメーターモードで
PerkinElmer Envisionマルチラベルプレートリーダー上で画像化した
。

【0248】

データの決定：目的とする遺伝子について、各反復実験の平均シグナルからアッセイの
平均バックグラウンドシグナルを減算した。次いで、目的遺伝子のバックグラウンドを差
し引いた平均シグナルを、ハウスキーピングPOLR2A mRNAのバックグラウンドを差
し引いた平均シグナルに対して正規化した。処理したサンプルの阻害%は、コントロ
ール処理したサンプル溶解液と比較して計算した。500 nMの濃度のASOで処理した細
胞に対するQUANTIGENE(登録商標)アッセイの結果を、図4に示した。

【0249】

実施例4：CAMK2D mRNA低下のインビボ解析

図5に示されたASOの内の1つを、メスのC57BL/6J B o mマウスに皮下投与
して、CAMK2D mRNAレベルをインビボで低下させるASOの効力を評価した。A
SOを、30mg/kg/日の用量で3日間連続投与した(1日目、2日目、3日目)。マ
ウスの行動および体重の変化を観察した。8日目にマウスを 殺して、以下に記載したよ
うなRNAを単離および分析するために心臓組織を採取した。

【0250】

MagNA Pure 組織溶解緩衝液(Roche)を、心臓組織切片に加えて、ステンレス
スチールビーズを用いて、均一な溶解物が得られるまでホモジナイズした。室温で30分

10

20

30

40

50

間インキュベーションして、溶解を完了させた。Cellular RNA Large Volume KitとMAGNA Pure 96 (Roche)を用いて、RNAを単離した。

【0251】

RNA濃度を5 ng/μlに正規化し、20 ng RNA、qPCR Taqman Mastermixおよび以下のTaqmanプローブ：CAMK2D (Thermo Mm00499266_m1)およびGAPDH (Thermo 4352339E)を用いて1ステップqPCRを行った。

【0252】

PCR条件は、以下の通りであった：50℃で15分；95℃で3分；95℃で5秒間の40サイクル。データを、QUANT STUDIO (登録商標)リアルタイムPCRソフトウェアを用いて解析した。ASO処理したサンプルの阻害率は、生理食塩水で処理したサンプルと比較して計算した。

【0253】

図5に示した通りに、試験した全てのASOは、C57BL/6J BOMマウスに投与した場合、CAMK2D mRNAレベルを低下させることができた。これらの得られた結果から、インビトロおよびインビボの両方でASOの効力が実証され、CAMK2D特異的ASOが、心血管関連疾患および障害などの様々な医学的障害を治療するための疾患を調節する治療薬であることを支持するものである。

【0254】

本願のPCT出願は、2018年2月21日に出願された米国仮出願第62/633,502号、2018年2月27日に出願された第62/635,954号、2018年5月2日に出願された第62/665,998号および2018年12月12日に出願された第62/778,679号の優先権の利益を主張するものであり、これらの各出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

FIG.1A

配列番号	開始 (配列番号:1)	終了 (配列番号:1)	ASO 番号	ASO 配列	ASO No.	
4	725	739	CGAAGTAGCT	ASO-0986	OxYMic OxYGs OxYas DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
5	725	740	CGGAAGTAGCT	ASO-0986	OxYMic DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
6	725	739	CGAAGTAGCT	ASO-0987	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
7	726	740	CGGAAGTAGCT	ASO-0987	OxYTs OxYMic OxYGs OxYMic	
8	726	741	TCGGTAGCT	ASO-0988	OxYMic OxYGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
9	726	742	GTCCGAAGTAGCT	ASO-0989	OxYTs OxYMic DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
10	727	741	TCGGAAGTAGCT	ASO-1000	OxYGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
11	727	742	GTCCGAAGTAGCT	ASO-1001	OxYTs OxYMic OxYGs OxYGs OxYMic	
12	728	742	GTCCGAAGTAGCT	ASO-1002	OxYGs OxYTs OxYMic OxYMic DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
13	1488	1514	TGGATATAGG	ASO-1003	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
14	1539	1554	CAAGG	ASO-1004	OxYTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
15	1796	1812	AGGAATGGT	ASO-1005	OxYas OxYGs OxYGs OxYMic OxYG	
16	1797	1815	AGGTTGGT	ASO-1006	OxYas DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
17	2289	2318	AGGTTGGT	ASO-1007	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
18	2415	2434	ATTATACAA	ASO-1008	OxYGs OxYGs OxYGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
19	2495	2514	CTGGGAACCA	ASO-1009	OxYas DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
20	2496	2514	CTGGGAACCA	ASO-1010	OxYMic OxYGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs	
21	2496	2515	CCCTGGAAACC	ASO-1011	OxYMic OxYMic DNAs DNAs DNAs OxYTs OxYas OxYG	

【図 2】

[illegible]

FIG.1A (cont.)

【図 3】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 4】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 5】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 6】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 8】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 13】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 15】

FIG. 1A (cont.)

配列番号	番号 (配列番号:1)	番号 (配列番号:1-1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造番号とASO
			ATACA	0339	DNA5 DNAA5 DNAA5 OxyT5 OxyA5 OxyA5
			GTGATTATTA	ASO	OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
272	71071	71080	GTTTCAC	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
273	71122	71239	TTTATCATTT	ASO	OxyT5 OxyT5 OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
274	71370	71389	ATTACATTT	ASO	OxyT5 OxyT5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
275	71882	71889	AGGTGACATTA	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5
276	71892	71929	GAGACCTT	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
277	72300	72318	TTTTCCTGGC	ASO	OxyT5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
278	73019	73038	ATAATATACA	ASO	OxyA5 OxyT5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
279	73024	73041	AGGATGATTA	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
280	73605	73621	ACACAGAA	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
281	74353	74369	AGGCTTTAGT	ASO	OxyA5 OxyA5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
282	74557	74574	GAGAGGG	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
283	75093	75093	CTTACATGTCA	ASO	OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
284	75414	75431	TTCTATTACA	ASO	OxyT5 OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
285	75419	75438	TTGATTTCTT	ASO	OxyT5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
286	75419	75438	TATATTTACCA	ASO	OxyT5 OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
287	75419	75438	CAATCATGAAT	ASO	OxyA5 OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
288	75419	75438	TATATGCT	ASO	OxyA5 OxyA5 OxyT5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
289	75419	75438	TTATATGGA	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
304	76173	76189	GAAGGTGATTA	ASO	OxyA5 OxyA5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
305	76334	76351	AATTATG	ASO	OxyA5 DNAA5 DNAA5 OxyT5 OxyA5 OxyA5
306	77425	77443	TGGAGGTGTA	ASO	OxyT5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
307	77425	77443	GATGATGA	ASO	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
308	77701	77720	TTTATGCT	ASO	OxyA5 OxyA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5

【図 14】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 16】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 17】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 18】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 19】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 20】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 2 1】

[illegible]

【図 22】

亞洲藥号	規格 (藥劑番号)	課丁 (配属番号)	ASO 配剤	ASO No.	化学構造を有するASO
473	120625	120644	TTAGTGT ACCTGCTGAA CTGCTGCTGAA	0597 0598 0599	DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyGs OxyTs OxyT OxyGs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
474	121026	121044	TACCTTCTAATA TTTGGAG	0599 0598	OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
475	121116	121133	GAAATTAACCT ACATAGC	0600 0600	OxyGs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
476	121516	121535	GAAATTAACCT AGAAATCTGAA	ASO ASO	OxyTs OxyTs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
477	121875	121892	TAAATGTGGCAA GGGAAGG	0602 0602	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
478	122046	122065	GAGATTTTGG GGAAGAT	ASO 0603	OxyGs OxyGs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
479	122626	122644	TAGTAATATGT GAAAGAG	ASO 0604	OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
480	122628	122644	TAGTAATATGT GAAGG	ASO 0605	DNAs DNAs DNAs DNAs DNags DNags DNags DNags DNAs DNAs DNAs DNAs DNags DNags DNags DNags
481	123356	123373	ACGTGATGATGC AGTGTGA	ASO 0606	OxyGs OxyGs DNags DNAs DNags DNags DNags OxyTs OxyTs DNags DNags DNags DNags DNags
482	123540	123557	GTTTGAGGAGAT ATTGAGGCG	ASO 0608	OxyTs OxyTs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
483	123540	123556	TTTGATGATG CTGCTGCTGAA	ASO ASO	OxyGs OxyGs DNAs DNags DNags DNags DNags OxyGs OxyGs DNAs DNags DNags DNags DNags
484	123596	123614	GAGAGAGAAA TTTGGAGAG	ASO 0608	OxyGs OxyGs DNAs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
485	124333	124411	TTTGTTTGGTGT TGGGCGAC	ASO 0609	OxyTs OxyTs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
486	124393	124411	CTGTGGTCTTC GAGGAGGAG	ASO 0609	OxyTs OxyTs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
487	124655	124673	AGATTGTGCTGA AATGATGGA	ASO 0611	OxyMs DNAs DNags DNags DNags DNags DNags OxyTs OxyTs OxyGs DNags DNags DNags DNags
488	124782	124800	TTTATTTGTTTA TTTCAGC	ASO 0612	DNAs DNags DNags DNags OxyGs OxyGs OxyTs OxyG DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
489	125313	125331	TCGAAGTACAG GCAAAATTT	ASO 0613	OxyTs OxyMs OxyTs OxyGs DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
490	125438	125438	TATATCTTAA TATATCTTAA	ASO 0614	DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags DNags
491	125906	125924	CTGATTTTGTAT TATATCTTAA	ASO 0614	OxyMs OxyTs OxyGs OxyGs DNags DNags DNags OxyTs OxyTs OxyGs DNags DNags DNags DNags

【図 23】

配列番号	開始 (配列番号:1)	終了 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造を有するASO
402	126160	126177	TGCCAAC TGTGTTTAAT GGGTAT	0015 ASO- 0016	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 OxyTs OxyTs OxyGs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 OxyTs OxyTs OxyAs OxyAs OxyT
403	126180	126205	TGCTTATGCT TCGTAT	0017	OxyTs OxyGs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 OxyGs OxyT
404	126773	126792	TACATATCGAC TATATCTTCT	ASO- 0018	OxyTs OxyAs OxyCAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
405	127216	127233	CATTATCTTC GGGCAT	ASO- 0019	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
406	127443	127449	CATTTATGAG GAGAGGGC	ASO- 0020	OxyAs OxyAs OxyTs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
407	127653	127651	TAGGTTCTCGAC TATCTTCT	ASO- 0021	OxyTs OxyAs OxyGs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
408	127916	127933	GAGATCTTAT TACTATTC	ASO- 0022	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
409	128404	128423	AAGCTGATTC ATAGAGATC	ASO- 0023	OxyAs OxyAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
500	128557	128576	ATTAATATTTC AAGACAGA	ASO- 0024	OxyTs OxyTs OxyTs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
501	128559	128578	TATATTAATTC TATATTAAGA	ASO- 0025	OxyTs OxyTs OxyAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
502	128629	128847	TTTGTCAAAA TTTGCAAA	ASO- 0026	OxyTs OxyTs OxyAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
503	129156	129173	TGGTTTCAAG TGTATGAT	ASO- 0027	OxyTs OxyGs OxyTs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
504	129364	129402	GTGTGGTGATT ATTCATAT	ASO- 0028	OxyTs OxyTs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
505	129592	129944	GAGATCTTAT ATGATGAT	ASO- 0029	DNA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
506	129529	129546	TTGAAACAGTA TTATGTA	ASO- 0030	OxyTs OxyTs OxyGs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
507	130403	130419	TAGTATNTTGG TGAGTT	ASO- 0031	OxyTs OxyTs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
508	130404	130420	TGCTGATGTTT TATGATGAT	ASO- 0032	OxyCAs OxyTs OxyAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
509	130875	130892	AGAAACAGAT ACAACATTC	ASO- 0033	OxyTs OxyGs OxyAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5
510	131610	131625	TTTTCATCTTGT TATGATGAT	ASO- 0034	OxyTs OxyTs OxyTs OxyCAs DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5 DNAA5

【図 24】

[illegible]

【図 25】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【圖 26】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 27】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 28】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 3 1】

[illegible]

FIG.1A (cont.)

【図 30】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 3 2】

[illegible]

FIG.1A (cont.)

【図 3 3】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 3 4】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 3 5】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 3 6】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 3 7】

FIG. 1A (cont.)

配列番号	種別 (配列番号:1) (配列番号:1)	番号7 (配列番号:1) (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造番号 6ASO
783	197869	197915	ATTATTC	0913	DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyC
784	198307	198324	TGATGGAGATA ACTAGT	0914	OxyTs OxyC OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
785	198518	198537	TATTTTGTGGG	ASO- 0915	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
786	199056	199077	ATATGGTGGT	ASO- 0916	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
787	199077	199088	TATTTATTTAA	ASO- 0917	OxyTs OxyA OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyC OxyA
788	199524	199540	TGATATGGCT	ASO- 0918	OxyA OxyTs OxyA OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
789	199581	199599	ATGATGATAG	ASO- 0919	OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
790	199958	199975	TATCTAAATC	ASO- 0920	OxyTs OxyTs OxyA OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
791	200729	200745	TATTTATTTAC	ASO- 0921	OxyTs OxyTs OxyA OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
792	200739	200756	TGACAG	ASO- 0922	DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyA OxyG
793	200989	201007	CATATGAG	ASO- 0923	OxyTs OxyA OxyA OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
794	201838	201855	TACTGTACTG	ASO- 0924	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
795	201843	201862	GATGATGACT	ASO- 0925	OxyTs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyC OxyC
796	202054	202073	TCTTACATAT	ASO- 0926	OxyTs OxyTs OxyC OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
797	202186	202224	TATTTACTTAA	ASO- 0927	OxyTs OxyA OxyA OxyTs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyC OxyA
798	202670	202687	TATTTATGTTG	ASO- 0928	DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyG
799	202673	202690	ATGATATTTAA	ASO- 0929	DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyC
800	203349	203366	ATATCAGGAG	ASO- 0930	OxyA OxyTs OxyG OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
801	203895	203923	TATTTATTTGTT	ASO- 0931	OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 38】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 39】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 40】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 4 1】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 4 2】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 4 3】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 4 4】

FIG. 1A (cont.)

系列番号	期数 (発行番号:1)	終了 (発行番号:1)	ASO 型別	ASO No.	仕字構造を行なうASO
916	213593	213609	ATACA CTACAGCGGGA	1032	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyMs OxyA
917	213593	213610	CTACAGCGGG TCTACAGCGG	ASO- 1033	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
918	213594	213594	ACATACA	1034	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
919	213595	213610	TCTACAGCGGG ACATAC	1035	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
920	213597	213610	TCTACAGCGG	ASO- 1036	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
921	213597	213612	AAATCTACAGG GGACA	ASO- 1037	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
922	213597	213613	AAATCTACAGG CGGACA	ASO- 1038	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
923	213598	213612	AAATCTACAGG GGACA	ASO- 1039	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
924	213612	213629	CTGTTAA GTTTAA	1040	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
924	213612	213630	ACACAGAGTGG TGTTTAA	1041	OxyAs OxyMs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
925	213613	213630	ACACAGAGTGG TGTTTAA	1042	OxyAs OxyMs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
926	213626	213644	TGTGTATAAT TGTGTATAAT	1043	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
927	213627	213644	CTGTTATAAT CTTTCA	ASO- 1044	OxyTs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
928	213627	213645	CTGTTATAAT CTTTCCA	ASO- 1045	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
929	213627	213646	CTGTTGTATAA	1046	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
930	213628	213645	CTGTTGTATAA	1047	OxyMs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
931	213628	213646	CTGTTGTATAA	ASO- 1048	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
932	213629	213646	ATCTCTCTA	ASO- 1049	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
933	213629	213647	ATCTCTCTA	ASO- 1050	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
934	213629	213648	TCTCTCTGAT	ASO- 1051	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 49】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 5 1】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 50】

FIG.1A (cont.)

配列番号	開始 (配列番号:1)	終了 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造番号: a150
1031	22473	22490	ATTAGAAA CTCAGCGTTTAA	1145	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyGs OxyGs OxyGs OxyA
1032	22473	22491	TCTGAGCGTTT TTTAGAAA	ASO-1146	OxyGs OxyTs OxyMs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1033	22473	22491	TCTGAGCGTTT TTTAGAAA	ASO-1147	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1033	22473	22492	TCTGAGCGTTT TTTAGAAA	ASO-1148	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1034	22474	22491	TCTGAGCGTTT ATTAGAAA	ASO-1149	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1035	22474	22492	TCTGAGCGTTT TTTAGAAA	ASO-1150	OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1036	22474	22493	ATTTCAGCGT TTTAGAAA	ASO-1151	OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1037	22475	22491	TCTGAGCGTTT ATTAGAAA	ASO-1152	OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1038	22475	22492	TCTGAGCGTTT TTTAGAAA	ASO-1153	OxyTs DNAs DNAs OxyTs OxyT OxyTs OxyG DNAs DNAs
1039	22475	22493	ATTTCAGCGT TTTAGAAA	ASO-1154	OxyAs OxyT OxyT OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1040	22475	22494	ATTTCAGCGT TTTAGAAA	ASO-1155	OxyAs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1041	22476	22493	ATTTCAGCGT TTTAGAAA	ASO-1156	OxyTs OxyTs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1042	22476	22494	AAITTCAGCGC TTTAGAAA	ASO-1157	OxyAs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1043	22476	22495	CAAAATTCGAG GCTTTATT	ASO-1158	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1044	22477	22496	CAAAATTCGAG GCTTTATT	ASO-1159	OxyMs OxyAs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1045	22478	22495	AAATTCCTCAGG GCTTTATT	ASO-1160	OxyAs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1046	22478	22496	CAATTCCTCAG GCTTTATT	ASO-1161	OxyTs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs
1047	22459	224585	TTGAATCTTAT GGCTTA	ASO-1162	OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1048	22459	224566	CTTGAGGCTCT GGCTTA	ASO-1163	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1049	22459	224567	CTTGAGGCTCT GGCTTA	ASO-1164	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 5 2】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 5 3】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 5 5】

FIG.1A (cont.)

記事番号	Start (SEQ ID NO.1)	End (SEQ ID NO.1)	ASO 配列	ASO No	配列
1126	238982	239008	GTTGGG GATGATATTG GTGTGG	1237 1238	DNAG DNAG DNAG OxyGs OxyGs OxyG OxyG OxyA OxyT DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG OxyGs OxyG
1127	239707	239725	AGAGAGATGA AGAGAGATGA AGAGAGATGA	ASO 1239 1240	OxyA OxyG OxyG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG OxyG OxyG OxyA OxyA DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG OxyG OxyG OxyA OxyA
1128	240013	240032	CAATTATTC CAATTATTC CAATTATTC	1240 1241 1242	DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1129	240243	240260	GAGAGATGAA GAGAGATGAA GAGAGATGAA	ASO 1241 1242	OxyG OxyA OxyG OxyA DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG OxyGs OxyA OxyA OxyA
1130	240554	240570	CTGCTACTGT CTGCTACTGT CTGCTACTGT	ASO 1243 1244	OxyGs OxyG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1131	240786	240785	ATTATTTATTA ATTATTTATTA ATTATTTATTA	ASO 1245 1246	OxyA OxyT OxyT OxyA DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1132	241823	241841	GTGTTGCTGA GTGTTGCTGA GTGTTGCTGA	ASO 1244 1245	OxyGs DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1133	241976	241993	TTATGACAT TTATGACAT TTATGACAT	1245 1246 1247	DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1134	242336	242374	CTGATGCTGGA CTGATGCTGGA CTGATGCTGGA	ASO 1247 1248	OxyG OxyG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1136	242729	242748	GTATGATGAT GTATGATGAT GTATGATGAT	ASO 1247 1248	OxyG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1137	243086	243083	GTATTAATCT GTATTAATCT GTATTAATCT	ASO 1248 1249	OxyG OxyT OxyT OxyT DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1138	243824	243842	TTTGTGAGGA TTTGTGAGGA TTTGTGAGGA	ASO 1249 1250	OxyG OxyT DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1139	244141	244159	ACTCTGAGA ACTCTGAGA ACTCTGAGA	ASO 1250 1251	OxyA OxyT OxyT DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1140	244285	244288	ATAGAGATGA ATAGAGATGA ATAGAGATGA	ASO 1251 1252	DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1141	244286	244284	CACCTCGGA CACCTCGGA CACCTCGGA	1251 1252 1253	DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1142	244286	244285	TATGATGATGA TATGATGATGA TATGATGATGA	ASO 1252 1253	OxyT OxyA DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1143	244287	244286	ATATGAGGAT ATATGAGGAT ATATGAGGAT	ASO 1253 1254	OxyA DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG
1144	244298	244296	TATATGATGA TATATGATGA TATATGATGA	ASO 1254 1255	DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG DNAG

【図 5 4】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【圖 5 6】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 6 1】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 6 2】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 6 3】

FIG.1A (cont.)

船種 (船種番号:1)	船主 (船種番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造番号とASO
船種番号	船主	CITCAA	1387	DNA1 DNAs DNAs OxyTs OxyMs OxyAs OxyA
1276	248879	CITGATTTGCT	ASO	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1279	248890	TCAGCAT	1388	ASO DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1280	248881	CITGATTTGCT	ASO	OxyMs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1281	248882	CITGAC	1389	CITGACA OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1282	248893	CITGATTTGCT	1390	CITGAC DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1283	248885	CITGATTTGCT	ASO	OxyMs OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1284	248896	CITGATTTGCT	1391	OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1285	248892	TCGATTTGCT	ASO	OxyA OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1286	248893	TCGATTTGCT	1392	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1287	248893	TCGATTTGCT	1393	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1288	248894	TCGATTTGCT	1394	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1289	248894	TCGATTTGCT	1395	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1290	248895	TCGATTTGCT	1396	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1291	248895	TCGATTTGCT	1397	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1292	248896	TCGATTTGCT	1398	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1293	248896	TCGATTTGCT	1399	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1294	248897	TCGATTTGCT	1400	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1295	248898	TCGATTTGCT	1401	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1296	248898	TCGATTTGCT	1402	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1297	248898	TCGATTTGCT	1403	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1298	248897	TCGATTTGCT	1404	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1299	248898	TCGATTTGCT	1405	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1300	248898	TCGATTTGCT	1406	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1301	248898	TCGATTTGCT	1407	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1302	248898	TCGATTTGCT	1408	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1303	248898	TCGATTTGCT	1409	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1304	248897	TCGATTTGCT	1410	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1305	248898	TCGATTTGCT	1411	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1306	248898	TCGATTTGCT	1412	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1307	248898	TCGATTTGCT	1413	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1308	248898	TCGATTTGCT	1414	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1309	248898	TCGATTTGCT	1415	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1310	248898	TCGATTTGCT	1416	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1311	248898	TCGATTTGCT	1417	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1312	248898	TCGATTTGCT	1418	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1313	248898	TCGATTTGCT	1419	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1314	248898	TCGATTTGCT	1420	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1315	248898	TCGATTTGCT	1421	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1316	248898	TCGATTTGCT	1422	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1317	248898	TCGATTTGCT	1423	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1318	248898	TCGATTTGCT	1424	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1319	248898	TCGATTTGCT	1425	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1320	248898	TCGATTTGCT	1426	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1321	248898	TCGATTTGCT	1427	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1322	248898	TCGATTTGCT	1428	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1323	248898	TCGATTTGCT	1429	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1324	248898	TCGATTTGCT	1430	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1325	248898	TCGATTTGCT	1431	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1326	248898	TCGATTTGCT	1432	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1327	248898	TCGATTTGCT	1433	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1328	248898	TCGATTTGCT	1434	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1329	248898	TCGATTTGCT	1435	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1330	248898	TCGATTTGCT	1436	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1331	248898	TCGATTTGCT	1437	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1332	248898	TCGATTTGCT	1438	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1333	248898	TCGATTTGCT	1439	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1334	248898	TCGATTTGCT	1440	OxyMs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1335	248898	TCGATTTG		

【図 6 4】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

FIG.1A (cont.)

[illegible]

FIG.1A (cont.)

[illegible]

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

FIG.1A (cont.)

和名/符号	漢字 (読み/符号: 1)	番号	ASO 配列	ASO No.	化学構造 番号 6/630
1373	253861	253879	CACCTGG CAGATTTT CAGAGAA	1481 1482 1482	DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyMs OxyG DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyGs OxyG DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyGs OxyG
1374	254164	254183	AGGCTGTAAT TTATGTTT	1483 1483	OxyTs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs
1375	254301	254319	GTGTGATATA TTATTTTA	1484 1484	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs
1376	254484	254503	TTCTGATGAT TTCTGATG	1485 1485	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1377	254916	254935	TTCCTTTGTT AGGAT	1486 1486	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs
1378	255212	255231	TATTATATATC TATATTTA	1487 1487	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1379	255431	255448	AGATTTATACA TATATTTA	1488 1488	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1380	255686	255703	TACTATGACA GGAAGT	1489 1490	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1381	255869	255888	TATTATTTATG TCTCAAGG	1491 1491	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1382	256137	256155	TAAAGATATAT CATCTACC	1492 1492	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1383	256310	256326	TCTGGG	1493	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1384	256710	256779	GATGACGTGA AGACATCT	1494 1494	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1385	256984	256993	TGCAAGAAAT GAACAGAC	1495 1495	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1386	256885	256894	AGACATGAC TCTGTTGTT	1496 1496	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1387	256687	256694	CTTGCTGTTT CTGTGCG	1497 1497	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1388	256687	256695	CTTGCTGTTT TCTGTGG	1498 1498	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1389	256688	256695	CTTGCTGTTT CTGTGTGT	1499 1499	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1390	256689	256698	TATCTGT TGCTCTGTTG	1500 1500	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs
1391	256690	256698	TATCTGT TGCTCTGTTG	1501 1501	OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyTs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 6 9】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 0】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 1】

FIG.1A (cont.)

観測番号	観測日 (観測番号+1)	観測時間 (観測番号+1)	ASO 配列	ASO No.	化学組成を指示するASO
			GATTAC	1537	DNAge DNage DNAs OxyTs OxyTs DNAs OxyMC
1430	259887	259882	TCAGGTTGTG	ASO-	OxyTs OxyMCs DNAs DNage DNage DNAs DNAs DNage DNAs
			GATTA	1538	DNAge DNage DNAs OxyTs OxyTs DNAs
1431	259884	259901	TTGTTTCTTC	ASO-	DNAge DNage DNAs DNage DNage DNAs DNage DNAs
			TTGTTTCTTC	1539	DNAge DNage DNAs DNage DNage DNAs DNage DNAs
1432	259895	259911	GTTGGTGAAGA	ASO-	OxyGs OxyTs DNage DNage DNAs DNAs DNage DNAs
			TGGTTA	1540	DNAge DNage DNAs DNage DNage DNAs DNage DNAs
1433	259409	259426	ACTCAAGAATG	ASO-	OxyTs OxyMCs OxyTs OxyMCs DNAs DNAs DNage DNage DNAs
			ATTGGACCA	1541	DNAge DNage DNAs DNage DNage DNAs DNage DNAs
1434	259752	259769	ATTGGACCA	ASO-	DNAge DNage DNAs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNAs
			TGGAATTA	1542	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNAs
1435	260259	260275	TTAATGTGAAC	ASO-	OxyTs OxyTs DNage DNAs DNage DNage DNage DNage DNAs
			TAGATAT	1543	OxyTs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNAs
1436	260398	260417	TGATGATTC	ASO-	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNAs
			CAGATTATG	1544	OxyTs OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1437	260451	260468	AAACATTA	ASO-	OxyTs OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			TGGAATTATTA	1545	OxyTs OxyGs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1438	260810	260828	CAAGCAGC	ASO-	OxyTs OxyGs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			TGTGAGGAGC	1546	OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1439	261157	261173	GGAAGC	ASO-	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			GTTGTTTGTAG	1547	OxyGs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1440	261162	261179	CAAGCAGC	ASO-	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			GAGCAGC	1547	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1441	261388	261417	GAGCAGC	ASO-	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			GAGCAGC	1548	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1442	261389	261417	CTGATGAGAA	ASO-	OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			GAAACAC	1549	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1443	261399	261418	TCCTGTGAGCA	ASO-	OxyTs OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			TCCTGTGAGCA	1550	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1444	261400	261417	CTGTGATGAGA	ASO-	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			GAAACAA	1551	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1445	261400	261418	TCCTGTGAGCA	ASO-	OxyTs OxyMCs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			AGGACAA	1552	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1446	261401	261418	TCCTGTGAGCA	ASO-	OxyTs OxyMCs OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			TCCTGTGAGCA	1553	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1447	261451	261469	ATACCTTCAC	ASO-	OxyTs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			ATACCTTCAC	1554	DNAge DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
1448	261451	261470	CATACCTTC	ASO-	OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage
			CATACCTTC	1555	OxyMCs DNage DNage DNage DNage DNage DNage DNage

【図 7 2】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 7 3】

FIG.1A (cont.)

配列番号	Start (Start ID No.)	End (End ID No.)	ASO 配列	ASO No	配列構造と共有 6ASO
1468	261458	261476	TTTGACA	1574	DNA5 DNA5 DNA5 OxyMcs OxyMcs OxyA
1469	261458	261477	TAAATCATAC	1575	OxyT OxyT OxyA OxyA OxyMcs OxyA OxyMcs OxyA
1470	261459	261475	GTAAATGACA	1576	OxyG OxyT OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1471	261459	261476	CTTTTCATCA	1577	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1472	261459	261477	TTTGAC	1577	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1473	261460	261477	TAAATCATAC	1578	OxyT OxyT OxyA OxyMcs OxyA OxyMcs
1474	261461	261477	GTAAATGACA	1578	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1475	261720	261737	CTCTTC	1581	OxyG OxyT OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1476	261720	261737	GTAAATGACA	1580	OxyG OxyT OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1477	261728	261737	CTCTTC	1581	OxyG OxyT OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1478	262302	262323	TTTGACATTT	1582	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1479	262302	262323	CTCTTC	1581	OxyG OxyT OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1480	262305	262321	TTTGACATTT	1582	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1481	262524	262541	CGGGTGA	1588	OxyT OxyMcs OxyA OxyA OxyMcs OxyT OxyT OxyA
1482	262541	262552	CTTGAGTGTA	1588	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1483	262401	262408	GTGATAT	1589	OxyMcs OxyT DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1484	262416	262435	TGCTATGGG	1590	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1485	262468	262475	ATCTCTGCTT	1591	OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1486	262475	262488	CTCTTGCTT	1591	DNA5 DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1487	262475	262488	ATCTATGAA	1590	OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
1488	262489	262497	CGAGGATGACA	1592	OxyMcs OxyA OxyA DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 7 5】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 4】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 7 6】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 7】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 8】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 7 9】

FIG. 1A (cont.)

型番名	備考 (配列番号:1) (配列番号:1)	番丁	ASO 配列	ASO No.	仕 様
1592	298036	298053	AGGATGAA TGCTTCAGAT	1590	DNAc DNAAc DNAAc DNAAc OxyGc OxyGc OxyA OxyT OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1593	299320	299338	ATATCTTT CAAGGATATTA	1591	OxyT OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1594	299326	299338	AGGATGATTT TGACATGCT	1592	OxyGc OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1595	299326	299342	ATGCTGATTT TCTGATGAT	1593	DNAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1596	299378	299807	TGCTGTATAAT ATGCTGTTT	1594	OxyT OxyGc OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1597	299887	299905	GCTTAAATCA AAATATATA	1595	OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1598	300239	300255	ATGATGTTT ATATGTTT	1596	OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1598	300543	300560	AGGTTTAAAGA GAGGAGG	1597	OxyA OxyA OxyGc OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	300798	300816	TATGTTGTTT TAATGTTT	1598	OxyT OxyA OxyT OxyT DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	300801	300819	TTTGTGTTTTC ATGTTGTTT	1599	OxyT OxyA OxyT OxyT DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301617	301636	AGGATGTTT ATGATGAA	1600	OxyT OxyA OxyT OxyT DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301676	301694	AGGATGTTT ATGATGAA	1601	OxyT OxyA OxyT OxyT DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1593	301775	301793	GATATGATTA CATTTTTC	1602	OxyA OxyA OxyA OxyA DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1594	301776	301795	AGGATTAATG AGGATTAATG	1603	OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1595	301777	301795	AGGATTAATG TACCATTT	1604	OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1596	301777	301796	TAGGATTAAT GTACATTT	1605	OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1597	301778	301796	AGGATTAATG AGGATTAATG	1606	OxyA OxyGc OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1597	301778	301796	TAGGATTAAT GTACATTT	1607	OxyA OxyGc OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1598	301778	301796	TAGGATTAAT GTACATTT	1608	OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301797	301797	TGAGGATTA TGACATTT	1609	OxyT OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301797	301797	TGAGGATTA TGACATTT	1610	OxyT OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301797	301797	TGAGGATTA TGACATTT	1611	OxyT OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc
1599	301797	301797	TGAGGATTA TGACATTT	1612	OxyT OxyT OxyA OxyGc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc DNAAc

【図 80】

FIG. 1A (cont.)

[illegible]

【図 8 5】

FIG.1A (cont.)

[illegible]

【図 8 6】

FIG. 1B

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	開始 #2 (配列番号:1)	終了 #2 (配列番号:1)	開始 #3 (配列番号:1)	終了 #3 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造番号とASO
225	56869	56886	119837	119854	-	-	TAAAGAGTGG TAGATTCC	ASO- 0293	OxyTs OxyAs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyMs
226	56869	56887	119837	119855	-	-	TTAAAGAGTC GTATACCTC	ASO- 0295	OxyTs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyMs OxyMC
265	69183	69202	69439	69458	-	-	ATATTATAC TACTATTCC	ASO- 0333	OxyAs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyMC
287	76153	76170	77746	77763	-	-	AGAGATGAA AGTCTACA	ASO- 0354	OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyAs OxyAs OxyMC OxyTs OxyAs DNAs DNAs
288	76153	76171	77746	77764	-	-	CAGAGATGA AAGTCTACA	ASO- 0356	OxyMs OxyAs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyAs OxyMs OxyAs
289	76153	76172	77746	77765	-	-	CCAGAGAAATG AAAGTCTACA	ASO- 0358	OxyMs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
290	76154	76171	77747	77764	-	-	CAGAGAAATGA AAGTCTAC	ASO- 0360	OxyMs OxyAs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
291	76154	76172	77747	77765	-	-	CCAGAGAAATG AAAGTCTAC	ASO- 0362	OxyMs OxyMs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyAs OxyMC
292	76154	76173	77747	77766	-	-	ACCAAGAGAT GAAGTCTAC	ASO- 0364	OxyAs OxyMs OxyMs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyAs OxyAs DNAs DNAs

【図 8 7】

FIG. 1B (cont.)

類別 番号	開始年 (配列番号)	終了年1 (配列番号)	開始年2 (配列番号)	終了年2 (配列番号)	開始年3 (配列番号)	終了年3 (配列番号)	ASO 配列	ASO No.	化学構造名を有ASO
293	76155	76172	77748	77765	-	-	ACGAGAAATG CAAGTCTA	ASO- 0366	OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs OyMcs
294	76155	76173	77748	77766	-	-	ACCAGAAAT GAAAGTCTA	ASO- 0368	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs OyMcs
295	76155	76174	77748	77767	-	-	ACCACAGAA TGAAGTCTA	ASO- 0370	OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs OyMcs OyMcs
296	76155	76173	77749	77766	-	-	ACGAGAAAT CAAGATCT	ASO- 0372	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs
297	76156	76174	77749	77767	-	-	ACCACAGAA TGAAGTCT	ASO- 0374	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs
298	76157	76173	77750	77766	-	-	ACGAGAAAT CAAGATCT	ASO- 0376	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs
299	76157	76174	77750	77767	-	-	ACCACAGAA TGAAGTCT	ASO- 0378	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs
300	76157	76175	77750	77768	-	-	GAACAGAGA ATGAAGTCT	ASO- 0380	OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs OyMcs
301	76158	76175	77751	77768	-	-	GAACAGAGA ATGAAGT	ASO- 0382	OyMcs OyMcs OyMcs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs
302	76159	76178	77752	77771	-	-	AGTATCCAG ATGAAGAG	ASO- 0384	DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs DNaGs

【圖 88】

FIG. 1B (cont.)

配列番号	網目 #1 (配列番号:1)	網目 #2 (配列番号:2)	網目 #3 (配列番号:3)	網目 #4 (配列番号:4)	ASO 型別	ASO No.	化学構造番号 6ASO
363	76160	77753	-	-	ATGACACG AGAAATGAA	ASO-0386	Oxys OxyGs DNAs OxyTs OxyGs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs Oxys
365	102012	102028	103231	-	TTGTAAGT TTGTAAGT	ASO-0463	Oxys OxyTs OxyGs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyTs OxyGs OxyTs DNAs OxyGs OxyTs OxyGs OxyTs
366	102012	102029	103215	-	AAATGTAACT CTTGAAGT	ASO-0468	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyTs OxyGs OxyTs
367	102012	102030	103233	-	GAATGTAACT TGTGTAAGT	ASO-0467	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyTs OxyGs OxyTs
368	102012	102031	103234	-	AGAAATGTAA CTTGTGTAAGT	ASO-0469	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
369	102013	102029	103216	-	AAATGTAACT CTTGAAGT	ASO-0471	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyGs OxyTs OxyGs OxyGs
390	102013	102030	103216	-	GAATGTAACT TGTGTAAGT	ASO-0473	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
391	102013	102031	103216	-	AGAAATGTAA CTTGTGTAAGT	ASO-0475	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
392	102013	102032	103235	-	TGAAATGTAA CTTGTGTAAGT	ASO-0477	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
393	102014	102031	103217	-	AGAAATGTAA CTTGTGTAAGT	ASO-0479	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
394	102014	102032	103235	-	TGAAATGTAA CTTGTGTAAGT	ASO-0480	Oxys OxyTs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs

FIG. 1B (cont.)

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	開始 #2 (配列番号:1)	終了 #2 (配列番号:1)	開始 #3 (配列番号:1)	終了 #3 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造を共有するASO
395	102014	102033	103217	103236	-	CTAGAAATGTA ACTTGTTGA	0481	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyA OxyYCs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyAs OxyGs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyYCs OxyTs OxyAs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
396	102015	102032	103218	103235	-	TAGAAATGTA CTTGTTG	ASO- 0485	OxyYCs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyYCs OxyTs OxyAs OxyGs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
397	102015	102033	103218	103236	-	CTAGAAATGTA ACTTGTTG	ASO- 0487	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
398	102015	102034	103218	103237	-	CTAGAAATG TCACTTGTTG	ASO- 0489	OxyYCs OxyYCs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
399	102016	102033	103219	103236	-	CTAGAAATGTA ACTTGTT	ASO- 0491	DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
400	102016	102034	103219	103237	-	CTAGAAATG TCACTTGTT	ASO- 0493	OxyYCs OxyYCs OxyTs OxyAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyGs OxyTs OxyTs OxyG
401	102016	102035	103219	103238	-	ACCTAGAAAT GTAACTTGTT	ASO- 0495	OxyAs OxyYCs OxyYCs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyT OxyG
402	102017	102034	103220	103237	-	CTAGAAATG TCACTTGTT	ASO- 0497	OxyYCs OxyYCs OxyTs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyT
403	102017	102035	103220	103238	-	ACCTAGAAAT GTAACTTGTT	ASO- 0499	OxyAs OxyYCs OxyYCs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs OxyTs OxyTs OxyG

【図 9 1】

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	開始 #2 (配列番号:1)	終了 #2 (配列番号:1)	開始 #3 (配列番号:1)	終了 #3 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造を有するASO
414	102024	102043	103227	103246	-	-	TACTATACACC TAGAAATGT	ASO-0821	OxyT DNAA DNAA OxyMCs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
415	102025	102043	103228	103246	-	-	TACTATACACC TAGATAATG	ASO-0823	OxyT DNAA DNAA OxyMCs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
416	102026	102043	103229	103246	-	-	TACTATACACC TAGAAAT	ASO-0825	OxyTs OxyAs OxyMCs OxyTs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
417	102028	102044	103229	103247	-	-	CTACTATACAC CTAGAAAT	ASO-0827	OxyMCs OxyTs OxyAs OxyMCs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
418	102026	102045	103229	103248	-	-	CCTACTATACA CCTAGAAAT	ASO-0829	DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyAs OxyT
419	102027	102044	103230	103247	-	-	CTACTATACAC CTAGAAA	ASO-0831	OxyMCs OxyTs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyT
420	102027	102045	103230	103248	-	-	CCTACTATACA CCTAGAA	ASO-0833	OxyMCs OxyMCs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
421	102027	102046	103230	103249	-	-	TCTCTACTATAC ACCTAGAAA	ASO-0835	DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
422	102028	102047	103231	103250	-	-	TTCTCTACTATAC CACTAGAAA	ASO-0837	DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT
423	102029	102046	103232	103249	-	-	TCTCTACTATAC	ASO-	OxyTs OxyMCs DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA DNAA OxyTs OxyT

【図 90】

FIG. 1B (cont.)

契約 番号	終了#1 (配列番号:1)	開始#2 (配列番号:1)	終了#2 (配列番号:1)	開始#3 (配列番号:1)	終了#3 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	化学構造を有するASO
404	102017	102036	103220	103239	-	CACCTAGAAA TGTAACTTGT	ASO- 0501	OyYmCs OyYsA DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYs OyYs OyYt
405	102018	102035	103221	103238	-	CACCTAGAAA GTAACTTGT	ASO- 0503	OyYs OyYmCs OyYmCs OyYt DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYs OyYs OyYt
406	102018	102036	103221	103239	-	CACCTAGAAA TGTAACTTG	ASO- 0505	OyYs OyYs OyYmCs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
407	102018	102037	103221	103240	-	ACATCTAGAA ATGTAACCTG	ASO- 0507	OyYt OyYt OyYs OyYs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
408	102019	102036	103222	103239	-	CACCTAGAAA TGTAACTT	ASO- 0509	OyYmCs OyYmCs OyYmCs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
409	102019	102037	103222	103240	-	ACACCTAGAA ATGTAACCT	ASO- 0511	OyYs OyYmCs OyYs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
410	102020	102036	103223	103239	-	CACCTAGAAA TGTAACT	ASO- 0513	OyYmCs OyYs OyYmCs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
411	102020	102037	103223	103240	-	ACACCTAGAA ATGTAACCT	ASO- 0515	OyYs OyYmCs OyYs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
412	102024	102041	103227	103244	-	CTATACACCTA GAAATGT	ASO- 0517	OyYmCs OyYt OyYs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt
413	102024	102042	103227	103245	-	ACTATACACCT AGAAATGT	ASO- 0519	OyYs OyYmCs OyYmCs OyYmCs DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas DmNas OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt OyYt

【圖 9 2】

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	欄幅 #2 (配列番号:1)	終了 #2 (配列番号:1)	間隔 #3 (配列番号:1)	終了 #3 (配列番号:1)	ASO 配列	ASO No.	北半球標準を有する ASO
424	102030	102047	103233	103250	-	-	TTCTACTATA GACCTATA	0559	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
425	102031	102047	103234	103250	-	-	TTCTACTATA GACCTA	ASO-0541	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
426	102033	102049	103236	103252	-	-	TTGTCTACTA TACACC	ASO-0543	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
427	102033	102050	103236	103253	-	-	TTGTCTACT ATACACC	ASO-0545	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
428	102033	102051	103236	103254	-	-	TTTGTCCTAC TATACACC	ASO-0547	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
429	102034	102050	103237	103253	-	-	TTTGTCCTAC ATACAC	ASO-0549	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
430	102034	102051	103237	103254	-	-	TTTGTCCTAC TATACAC	ASO-0551	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
431	102034	102052	103237	103255	-	-	TTTGTGCTCA CTATACAC	ASO-0553	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
432	102034	102053	103237	103256	-	-	GTTTGTCTCT ACTATACAC	ASO-0555	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
433	102035	102051	103238	103254	-	-	TTTGTCCTAC TATACA	ASO-0557	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs
434	102035	102052	103238	103255	-	-	TTTGTGCTCA	ASO-0559	DNAc DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs Oxyt's Oxyt's Oxyt's DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs DNAs

【図 9 3】

[illegible]

【図 9 4】

[illegible]

【図 9 5】

[illegible]

【圖 9 6】

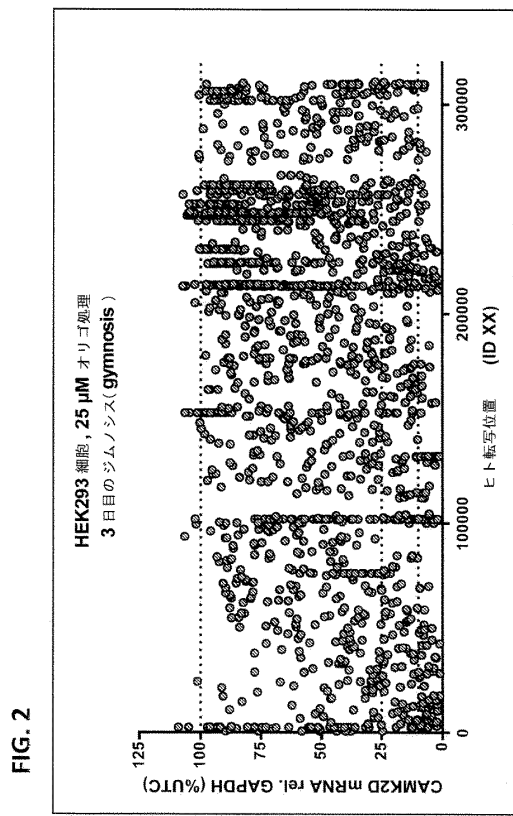


FIG. 1B (cont.)

FIG. 2

【図 9 7】

FIG. 3

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	DES No.	デザインを有するASO	ASO No.
24	2566	2583	DES-0002	GAta attttg gcag CAT A	ASO-0002
25	2566	2584	DES-0003	T GAta attttg gcag cAT A	ASO-0003
27	2567	2584	DES-0005	T GAta attttg gcag CAT	ASO-0005
55	3576	3593	DES-0135	ATTT gcaataaataTGGA	ASO-0135
61	5256	5274	DES-0141	GATTtatttcagtaTTTG	ASO-0141
63	6204	6221	DES-0143	ACTTtatataatttGACA	ASO-0143
71	8068	8085	DES-0150	TTTCtttaaatcaaTACT	ASO-0150
75	9246	9263	DES-0154	TGTAtagttagataTTTT	ASO-0154
79	10665	10684	DES-0158	GAAAtcaaattatccAGAA	ASO-0158
84	12135	12154	DES-0162	AGAAaactgaattaTACA	ASO-0162
85	12329	12346	DES-0163	GTAGaatggtcaaaAATT	ASO-0163
92	14390	14407	DES-0170	ATCTtagttttggaTTTG	ASO-0170
102	17218	17235	DES-0179	ACAGtttatagatAAGA	ASO-0179
105	17708	17725	DES-0182	AGTCattaattcttTATC	ASO-0182
114	21808	21826	DES-0190	TCCTtggttcttgAAT	ASO-0190
128	26381	26397	DES-0203	GAGAtcaataaagTATA	ASO-0203
130	28249	28265	DES-0208	AGATatagttactTAAC	ASO-0208
138	29430	29446	DES-0212	AATAttatgttgGAGC	ASO-0212
158	35743	35762	DES-0231	TACatattatattactCTC	ASO-0231

【図 9 8】

FIG. 3 (cont.)

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	DES No.	デザインを有するASO	ASO No.
161	37100	37119	DES-0234	ATTTtagcacatattTAAC	ASO-0234
178	41742	41758	DES-0249	CACAaatcattagTCTA	ASO-0249
180	42531	42548	DES-0251	TT CAattatg ctg TTTT	ASO-0251
186	44345	44361	DES-0257	AAAGtgagtgtaAGGT	ASO-0257
190	46568	46586	DES-0261	TGTttctagggttcatTTT	ASO-0261
195	47770	47788	DES-0265	TAAttatcaltgatTCAG	ASO-0265
200	49272	49289	DES-0270	GAAAtcgtggaataCTTT	ASO-0270
202	50024	50041	DES-0272	CATTaaataactG TTC	ASO-0272
234	58780	58796	DES-0304	GTTGagaatacagATTG	ASO-0304
264	69068	69086	DES-0332	ATACattttacattaTTCT	ASO-0332
327	84562	84581	DES-0409	TTTgtttcacatttaTAC	ASO-0409
387	102012	102030	DES-0467	GAAAtgtaactgttGAGT	ASO-0467
390	102013	102030	DES-0473	GAAAtgtaactgtTGAG	ASO-0473
396	102015	102032	DES-0485	TAGAaatgtaactgtTTTG	ASO-0485
441	103690	103708	DES-0570	AAATcgttctttacaTGAA	ASO-0570
446	104608	104625	DES-0574	ATTAttatgggtttTGT	ASO-0574
457	114694	114710	DES-0583	TAGAtttaaaggATTG	ASO-0583
463	116502	116519	DES-0589	TTTatgaagtcttgTGG	ASO-0589
467	117904	117921	DES-0593	GTCTtatattacataAAA	ASO-0593
513	131977	131995	DES-0637	GTGgagatttaggataTTG	ASO-0637

10

20

【図 9 9】

FIG. 3 (cont.)

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	DES No.	デザインを有するASO	ASO No.
516	131978	131997	DES-0643	CAGTggagatttaggatATT	ASO-0643
519	131980	131997	DES-0649	CAGTggagatttaggATA	ASO-0649
523	132017	132034	DES-0657	TGTAtaatccaaTGTT	ASO-0657
524	132017	132035	DES-0659	ATGTataattccaaTGTT	ASO-0659
636	157447	157465	DES-0769	TTTAtaatctattTACT	ASO-0769
640	159834	159851	DES-0773	ACACTttattgttCTTT	ASO-0773
657	165142	165160	DES-0788	ATTtttagtgacaggCAG	ASO-0788
659	166220	166239	DES-0790	ATGgtctattaagtlyCAA	ASO-0790
700	176162	176178	DES-0836	GATaglatagatTAGT	ASO-0836
740	184958	184975	DES-0874	TTGTttagtattcaTTTC	ASO-0874
822	209852	209868	DES-0951	T G cca ctatg tcttCAA	ASO-0951
827	210416	210435	DES-0956	TTAgatattcattgttcAGT	ASO-0956
832	211327	211344	DES-0960	TTTT a atttca a ccAGT A	ASO-0960
965	216411	216429	DES-1081	TTTAactttactataTTGG	ASO-1081
981	220916	220933	DES-1096	CAACA a ccatattAG CA	ASO-1096
982	220916	220934	DES-1097	TCAacaaccatttataGCA	ASO-1097
983	220917	220934	DES-1098	TCAacaaccatttataAGC	ASO-1098
984	220917	220935	DES-1099	GTCAacaaccatttataGC	ASO-1099
986	220918	220935	DES-1101	GTCAacaaccatttataTAG	ASO-1101
989	220919	220936	DES-1104	TGTCAacaaccatttataTA	ASO-1104

【図 1 0 0】

FIG. 3 (cont.)

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	DES No.	デザインによるASO	ASO No.
1015	223970	223987	DES-1131	T CAAtg ttcca a a CAAT	ASO-1131
1065	227969	227987	DES-1179	ATTAtctattatgttGTTT	ASO-1179
1071	229629	229646	DES-1185	TCTTttctattacATTG	ASO-1185
1155	244274	244291	DES-1266	GTAGaatatagagaATGA	ASO-1266
1247	248053	248069	DES-1357	TCaagcagctctacaGTC	ASO-1357
1249	248054	248070	DES-1359	TTCaagcagctctacAGT	ASO-1359
1326	251988	252004	DES-1435	CAGttgtgtttattGGA	ASO-1435
1359	253080	253097	DES-1468	ATTAttaattcccAAGA	ASO-1468
1363	253647	253664	DES-1472	CttttctgaattgaCCAG	ASO-1472
1371	253676	253691	DES-1480	AT CActg aacacTCG	ASO-1480
1387	256887	256904	DES-1495	TttgtgtttatctGTGG	ASO-1495
1389	256888	256905	DES-1497	CttgtgtttatctTG TG	ASO-1497
1390	256889	256906	DES-1498	GCttgtgtttatctGT	ASO-1498
1409	258296	258315	DES-1517	TAAcactataaattgaGGC	ASO-1517
1415	258714	258732	DES-1523	G CAAa aga ccttattCT G	ASO-1523
1420	258716	258732	DES-1528	G CAAa aga ccttatT CT	ASO-1528
1429	258966	258982	DES-1537	TCagggttggtgaTTAC	ASO-1537
1475	261720	261737	DES-1582	TCATtattagttgCATT	ASO-1582
1508	277421	277440	DES-1612	ATTGtatttcttgatTTAC	ASO-1612
1524	282021	282039	DES-1627	GTTattattatttcaGGT	ASO-1627

30

40

50

【図 1 0 1】

FIG. 3 (cont.)

配列番号	開始 #1 (配列番号:1)	終了 #1 (配列番号:1)	DES No.	デザインを有するASO	ASO No.
1530	283532	283549	DES-1632	TGTtagttttattctCAG	ASO-1632
1659	308035	308052	DES-1756	GatgtgaatttttcCAGT	ASO-1756
1662	308896	308912	DES-1759	AGGactgtgaatttaCTA	ASO-1759
1663	309052	309069	DES-1760	ATCagaaaagcttcAACC	ASO-1760
1676	309428	309444	DES-1773	TATatacagtgltccCAT	ASO-1773
1685	309482	309501	DES-1782	CACAaatttattaactCTTA	ASO-1782
1686	309483	309501	DES-1783	CACAaatttattaacTCTT	ASO-1783
1687	309483	309502	DES-1784	TCACaaatttattaacTCTT	ASO-1784
1688	309484	309501	DES-1785	CACAaatttattaacTCT	ASO-1785
1690	309484	309503	DES-1787	ATCAcaaatttattaaCTCT	ASO-1787

【図 1 0 2】

FIG. 4

ASO_NO	シングルポイント, 25 pM, HEK293, mRNA, %UTC	シングルポイント, 500 nM, ヒト iPSC-CM, mRNA, %UTC
ASO-0003	12.99	
ASO-0005	12.40	
ASO-0190	17.39	
ASO-0231	2.69	12.27
ASO-0261	7.88	43.24
ASO-0409	18.68	
ASO-0589	17.40	
ASO-0637	4.23	17.48
ASO-0643	10.78	
ASO-0649	8.04	
ASO-0788	13.01	
ASO-0790	11.02	
ASO-0956	5.12	15.39
ASO-1359	14.79	19.47
ASO-1435	6.76	12.42
ASO-1517	19.20	
ASO-1627	10.31	
ASO-1632	13.79	
ASO-1759	12.88	
ASO-1773	12.70	

10

【図 1 0 3】

FIG. 5

ASO_NO	CAMK2D/GAPDH (% Ctrl)
ASO-0002	82
ASO-1104	56
ASO-1099	87
ASO-1096	69
ASO-1101	65
ASO-1097	77
ASO-1098	77
ASO-0951	75
ASO-1528	81
ASO-1756	76
ASO-1784	70
ASO-1472	83
ASO-1787	69
ASO-1760	71
ASO-1783	59
ASO-1782	74
ASO-1497	70
ASO-1498	67
ASO-1785	66
ASO-1523	73
ASO-1468	70
ASO-1357	88
ASO-1537	78
ASO-1495	70
ASO-1480	70

30

【配列表】

0007500426000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/665,998

(32)優先日 平成30年5月2日(2018.5.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/778,679

(32)優先日 平成30年12月12日(2018.12.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 リチャード・イー・オルソン

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、コーポラル・マクターナン・ストリート20番、アパートメント206

(72)発明者 ブライアン・アール・アンダーソン

アメリカ合衆国08542ニュージャージー州プリンストン、パイン・ストリート25番、アパートメント・エイ

(72)発明者 ピーター・ヘーイドーン

デンマーク、デーコー2970ヘアスホルム、フレムティズヴァイ3番

(72)発明者 マリアンネ・レアベック・イェンセン

デンマーク、デーコー4600ケーエ、トアスヴァイ7番

(72)発明者 アイバー・エム・マクドナルド

アメリカ合衆国06423コネチカット州イースト・ハダム、パーマー・マーティン・ロード60番

(72)発明者 スティーブン・イー・マーサー

アメリカ合衆国01880マサチューセッツ州ウェイクフィールド、ホーランド・ロード4番

審査官 藤山 純

(56)参考文献 特表2009-528826(JP, A)

特表2012-529279(JP, A)

Jie Qiu et al., Gene expression profiles of adipose tissue of obese rats after central administration of neuropeptide Y-Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides by cDNA microarrays, Peptides, 29(11), 2008年, pp.2052-2060

Wang X, et al., MicroRNA-494 targeting both pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury, Circulation, 122(13), 2010年09月28日, pp.1308-1318

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 5/071

A61K 31/33-33/44

A61K 48/00

A61P 1/00-43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed