

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546993
(P2024-546993A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	45/06		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125		
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P	31/20		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全183頁)
(21)出願番号	特願2024-536143(P2024-536143)		(71)出願人	591003013	
(86)(22)出願日	令和4年12月15日(2022.12.15)			エフ． ホフマンーラ ロシュ アーゲー	
(85)翻訳文提出日	令和6年7月19日(2024.7.19)			F． HOFFMANN-LA ROCH	
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/086212			E AKTIENGESSELLSCHA	
(87)国際公開番号	WO2023/111210			F T	
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)			スイス・シーエイチー 4 0 7 0 パーゼル	
(31)優先権主張番号	21215511.3			・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4	
(32)優先日	令和3年12月17日(2021.12.17)		(74)代理人	100118902	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)			弁理士 山本 修	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		(74)代理人	100106208	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			弁理士 宮前 徹	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		(74)代理人	100196508	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			弁理士 松尾 淳一	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		(74)代理人	100188374	
	最終頁に続く			弁理士 一宮 維幸	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 R T E L 1 及び F U B P 1 を調節するためのオリゴヌクレオチドの組み合わせ

(57)【要約】

本発明は、テロメア伸長ヘリカーゼ1制御因子 (Regulator of telomere elongation helicase 1) (RTEL1) 又は遠上流要素結合タンパク質1 (Far Upstream Element-Binding Protein 1) (FUBP1) にそれぞれ相補的であり、RTEL1及びFUBP1の発現の調節又はRTEL1及びFUBP1の活性の調節をもたらすオリゴヌクレオチド (オリゴマー) などの、RTEL1阻害剤とFUBP1阻害剤との組み合わせに関する。本発明は、特に、疾患、好ましくはB型肝炎ウイルス (HBV) 感染症、特に慢性HBV感染症の処置及び／又は予防に使用するためのRTEL1の阻害剤とFUBP1の阻害剤との組み合わせに関する。本発明は、特に、HBV cccDNAなどのcccDNAを不安定化するためのRTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤の組み合わせの使用に関する。HBV感染症の処置及び／又は予防における医薬組成物、キット及びそれらの使用も本発明に含まれる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

RTE L 1 の阻害剤及び FUB P 1 の阻害剤を含む組成物。

【請求項 2】

RTE L 1 の阻害剤及び FUB P 1 の阻害剤又はそれらの薬学的に許容され得る塩、並びに薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩及び／又はアジュバントを含む、医薬組成物。

【請求項 3】

RTE L 1 の阻害剤及び FUB P 1 の阻害剤を含むキット。

【請求項 4】

前記 RTE L 1 の阻害剤が感染細胞において cccDNA を減少させることができる、請求項 1 若しくは 2 に記載の組成物又は請求項 3 に記載のキット。

【請求項 5】

前記 RTE L 1 阻害剤が、哺乳動物 RTE L 1 標的核酸、特にヒト RTE L 1 標的核酸に対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、さらにより好ましくは少なくとも 95 % 相補的な少なくとも 10 ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む、12～60 ヌクレオチド長、好ましくは 12～30 ヌクレオチド長、より好ましくは 12～25 ヌクレオチド長、さらにより好ましくは 15～21 ヌクレオチド長の核酸分子であり、前記核酸分子が RTE L 1 の発現を減少させることができる、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【請求項 6】

前記哺乳動物 RTE L 1 標的核酸が配列番号 1 又は 2、好ましくは配列番号 1 から選択される、請求項 5 に記載の組成物又はキット。

【請求項 7】

前記 RTE L 1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、
A A T T t t a c a t a c t c t g G T (配列番号 243)、
A A t t t t a c a t a c t c t G G T C (配列番号 244)、
T T a c a t a c t c t g g t C A A A (配列番号 245)、
C T t t a t t a t a a c t T g a A t C T C (配列番号 246)、及び
C T t t a t t a t a a c t t g a a T C T C (配列番号 246)

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、請求項 6 に記載の組成物又はキット。

【請求項 8】

前記 FUB P 1 の阻害剤が、感染細胞において cccDNA 及び／又は pgRNA を減少させることができる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【請求項 9】

前記 FUB P 1 阻害剤が、10～30 ヌクレオチド長、好ましくは 12～25 ヌクレオチド長、特に 15～21 ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる、12～60 ヌクレオチド長、好ましくは 12～30 ヌクレオチド長、より好ましくは 12～25 ヌクレオチド長、さらにより好ましくは 15～21 ヌクレオチド長の核酸分子であり、前記連続ヌクレオチド配列が、哺乳動物 FUB P 1 標的核酸、特にヒト FUB P 1 標的核酸に対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、さらにより好ましくは少なくとも 95 % の相補性であり、前記核酸分子が、FUB P 1 の発現を阻害することができる、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【請求項 10】

前記哺乳動物 FUB P 1 標的核酸が、配列番号 247～254、好ましくは配列番号 2

10

20

30

40

50

47から選択される、請求項9に記載の組成物又はキット。

【請求項11】

前記FUBP1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

CTTatGcttttttatgGT（配列番号325）、
CTTaTgc ttttttatgGT（配列番号325）、
CTtATgc ttttttatgGTT（配列番号326）、
CTtAtgc ttttttatgGTT（配列番号326）、
CTtAtgc ttttttatGgTT（配列番号326）、
CTtAtgc ttttttatGGTT（配列番号326）、
GcttTttatggTtCAC（配列番号327）、
TATgcTtttttatggTtTC（配列番号328）、
AcCAA tttttcat tttCtAC（配列番号329）、及び
CcccataaccataGTC（配列番号330）

ここで、大文字はベータ-D-デオキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、
を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、請求項10に記載の組成物又はキット。

【請求項12】

疾患、好ましくはB型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置又は予防に使用するための、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【請求項13】

疾患の処置又は予防に使用するためのRTEL1の阻害剤であって、前記処置又は予防が、FUBP1の阻害剤の投与をさらに含む、RTEL1の阻害剤。

【請求項14】

疾患の処置又は予防に使用するためのFUBP1の阻害剤であって、前記処置又は予防が、RTEL1の阻害剤の投与をさらに含む、FUBP1の阻害剤。

【請求項15】

疾患の処置又は予防に使用するための、RTEL1の阻害剤とFUBP1の阻害剤との組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、テロメア伸長ヘリカーゼ1制御因子（Regulator of telomere elongation helicase 1）（RTEL1）又は遠上流要素結合タンパク質1（Far Upstream Element-Binding Protein 1）（FUBP1）にそれぞれ相補的であり、RTEL1及びFUBP1の発現の調節又はRTEL1及びFUBP1の活性の調節をもたらすオリゴヌクレオチド（オリゴマー）などの、RTEL1阻害剤とFUBP1阻害剤との組み合わせに関する。本発明は、特に、疾患、好ましくはB型肝炎ウイルス（HBV）感染症、特に慢性HBV感染症の処置及び／又は予防に使用するためのRTEL1の阻害剤とFUBP1の阻害剤との組み合わせに関する。本発明は、特に、HBV cccDNAなどのcccDNAを不安定化するためのRTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤の組み合わせの使用に関する。HBV感染症の処置及び／又は予防における医薬組成物、キット及びそれらの使用も本発明に含まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

B型肝炎は、逆転写を介して複製する小型肝臓指向性ウイルスであるB型肝炎ウイルス(HBV)に起因する感染性疾患である。慢性HBV感染症は、肝硬変及び肝細胞癌腫のような重篤な肝疾患に対する重要な因子である。慢性HBV感染症に対する現在の処置は、多機能逆転写酵素であるウイルスポリメラーゼを標的とする、ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、テノホビル・ジソプロキシル、及びテノホビル・アラフェナミドなどのペグ化1型インターフェロン又はヌクレオシ(チ)ド類似体の投与に基づいている。処置の成功は、通常、B型肝炎表面抗原(HBsAg)の消失として測定される。しかしながら、B型肝炎ウイルスDNAは感染後も体内に残存するため、完全なHBsAgクリアランスが達成されることは稀である。HBVの持続は、核内で安定に維持されているHBVゲノムのエピソーム型によって媒介される。このエピソーム型は「共有結合閉環状(cov

alentl y c l o s e d c i r c u l a r) DNA」(cccDNA)と呼ばれる。cccDNAは、ウイルス複製中間体であるプレゲノム(pregenomic)RNA(pgRNA)を含む、全てのHBV転写物の鋳型として役立つ。cccDNAのいくつかのコピーの存在は、末期のHBV感染症を再開するのに充分であろう。HBVに対する現在の処置はcccDNAを標的としない。しかしながら、慢性HBV感染症の治療には、cccDNAの排除が必要であろう(Nassal, Gut. 2015 Dec; 64(12): 1972-84. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809による概説)。

10

【0003】

テロメア伸長ヘリカーゼ1制御因子(regulator of telomere elongation helicase 1: RTEL1)は、テロメアの安定性、保護、及び伸長において機能し、DNA複製時にテロメアを保護することが知られているシェルトリン複合体中のタンパク質と相互作用するDNAヘリカーゼをコードする。この遺伝子の突然変異は、先天性角化異常症及びHoyeraall-Hreidarsson症候群と関連している(例えば、Vannier et al 2014 Trends Cell Biol. Vol 24 p. 416による概説を参照されたい)。

20

【0004】

核内に位置するRTEL1は、テロメア長調節、DNA修復、及びゲノム安定性の維持に関与するATP依存性DNAヘリカーゼとして機能する。RTEL1は抗リコンビナーゼとして作用して、毒性組換えに対抗し、減数分裂の間の交差を制限し、鎖侵入事象を物理的に解離することにより減数分裂組換え及び交差ホメオスタシスを制御し、これによって、減数分裂の合成依存性鎖アニーリング(synthesis dependent strand annealing: SDSA)及びDループ組換え中間体の分解による非交差修復を促進する。その上、RTEL1はTループを分解し、テロメアのG4-DNA構造に拮抗することによってテロメアの脆弱性を防ぎ、テロメアの動態及び安定性を共に確保する。

30

【0005】

RTEL1は、siRNAスクリーニングにおいてHPVエピソームの安定剤として同定されている:(Edwards et al 2013 PLoS One Vol 8, e75406)。RTEL1を標的とするsiRNAも、同様に、Hoyeraall-Hreidarsson症候群におけるRTEL1との相互作用物質を同定するために使用されている(Schertzer et al 2015 Nucleic Acid Res Vol 43 p. 1834)。加えて、RTEL1は、HIV感染を阻害する標的を提供する必須宿主タンパク質に対するsiRNAスクリーニングから、HIV宿主依存性因子として同定された(国際公開第2007/094818号)。

40

【0006】

国際公開第2020/011902号は、HBV感染症、特に慢性HBV感染症の処置に使用するためのRTEL1阻害剤に関する。

【0007】

遠上流要素結合タンパク質1(Far Upstream Element-Bind

50

ing Protein 1) (FUBP1又はFBP1)は、複数のDNAエレメントに結合する一本鎖DNA結合タンパク質である。このタンパク質はまた、RNAに結合すると考えられ、DNA-DNA二重鎖及びRNA-RNA二重鎖の両方に対してインビトロ活性を有する3'-5'ヘリカーゼ活性を含有する。FUBP1は、未分化細胞においてc-mycの上流に位置する遠上流要素(far upstream element)(FUSE)に結合することによって、癌原遺伝子c-mycの転写を活性化することが知られている。タンパク質は、主に細胞の核内に存在する。FUBP1の上方制御は、多くのタイプの癌において観察されている。さらに、FUBP1は、C型肝炎ウイルス及びエンテロウイルス由来のRNAに結合し、その複製を媒介することができる(Zhang and Chen 2013 Oncogene vol 32 p. 2907-2916)。

10

【0008】
FUBP1はまた、肝細胞癌腫(HCC)においても同定されており、HCC腫瘍形成に関与することが示唆されており(Ramdzan et al 2008 Proteomics Vol 8 p. 5086-5096)、FUBP1を標的とするレンチウイルス発現shRNAを使用して例示されるように、FUBP1がHCC腫瘍成長に必要であることが示唆されている(Rabenhorst et al 2009 Hepatology vol 50 p. 1121-1129)。

【0009】
レンチウイルス発現shRNAによるFUBP1のノックダウンは、卵巣癌における処置応答を増強することが実証されている(Zhang et al 2017 Oncology Letters Vol 14 p. 5819-5824)。

20

【0010】
国際公開第2004/027061号には、被検物質がFBPを阻害するか否かを解析する工程と、FBPを阻害する物質を有効成分として含有する増殖性疾患を処置するための医薬組成物とを含むスクリーニング方法が開示されている。

【0011】
FUBP1を阻害するいくつかの小分子が同定されており、これらは全て癌を処置することを目的としている(Huth et al 2004 J Med. Chem Vol 47 p. 4851-4857; Hauck et al 2016 Bioorganic & Medicinal Chemistry Vol 24 p. 5717-5729 Hosseini et al 2017 Biochemical Pharmacology Vol 146 p. 53-62及びXiong et al 2016 Int J Onc vol 49 p. 623)。国際公開第2004/017940号は、SN-38の脂質ベースの製剤を記載しており、ウイルス感染、特にHIVの処置を特許請求の範囲に掲げているが、これを支持する実施例はない。

30

【0012】
ポリ(U)結合スプライシング因子60(PUF60)は、HBVプレゲノム発現の転写及び転写後の工程の両方の潜在的制御因子である。PUF60は、c-myc抑制に関連して、FUBP1と複合体を形成することが知られている。しかしながら、FUBP1は、HBVプレゲノム発現のPUF60依存的調節に関与していない(Sun et al 2017 Scientific Reports 7:12874)。

40

【0013】
HBV感染症は、推定3億5000万人の慢性キャリアに関する世界的に大きな健康問題のままである。キャリアのおよそ25%は、慢性肝炎、肝硬変、又は肝臓癌で死亡する。B型肝炎ウイルスは、タバコに次いで2番目に重要な発癌物質であり、全原発性肝臓癌の60%~80%を引き起こす。HBVはHIVよりも100倍感染性が高い。

【0014】
国際公開第2019/193165号は、HBV感染症の処置に使用するためのFUBP1阻害剤に関する。

【発明の概要】

50

【0015】

発明の目的

発明の概要

本発明は、RTEL1の阻害剤とFUBP1の阻害剤との組み合わせ、例えば、RTEL1の阻害剤とFUBP1の阻害剤とを含む組成物又は医薬組成物に関する。RTEL1の阻害剤は、RTEL1の発現及び／又は活性を阻害することができる；FUBP1の阻害剤は、FUBP1の発現及び／又は活性を阻害することができる。適切には、RTEL1の阻害剤は、RTEL1核酸の発現を阻害することができる。適切には、FUBP1の阻害剤は、FUBP1核酸の発現を阻害することができる。本発明はさらに、疾患の処置又は予防に使用するための該組み合わせ、組成物又は医薬組成物に関する。

10

【0016】

本発明はまた、RTEL1の阻害剤及びFUBP1の阻害剤を含むキットに関する。RTEL1の阻害剤は、RTEL1の発現及び／又は活性を阻害することができる；FUBP1の阻害剤は、FUBP1の発現及び／又は活性を阻害することができる。適切には、RTEL1の阻害剤は、RTEL1核酸の発現を阻害することができる。適切には、FUBP1の阻害剤は、FUBP1核酸の発現を阻害することができる。本発明はさらに、疾患の処置又は予防に使用するための該キットに関する。

【0017】

本発明はまた、疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量のRTEL1の阻害剤を投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法であって、有効量のFUBP1の阻害剤の投与をさらに含む方法に関する。

20

【0018】

本発明はまた、疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量のFUBP1の阻害剤を投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法であって、有効量のRTEL1の阻害剤の投与をさらに含む方法に関する。

【0019】

本発明はまた、疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量のRTEL1の阻害剤と治療有効量又は予防有効量のFUBP1の阻害剤との組み合わせを投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法に関する。

【0020】

本発明はまた、B型肝炎ウイルス（HBV）及び／又は癌を処置又は予防するための医薬を調製するための、FUBP1の阻害剤及びRTEL1の阻害剤の使用に関する。

30

【0021】

本発明はまた、RTEL1及びFUBP1を発現している標的細胞においてRTEL1及びFUBP1の発現を調節するためのインビボ又はインビトロの方法であって、RTEL1の阻害剤及びFUBP1の阻害剤を有効量で該細胞に投与することを含む方法に関する。

【0022】

特定の実施形態では、疾患は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症及び／又は癌である。

40

【0023】

特定の実施形態では、疾患は、慢性B型肝炎ウイルス（HBV）感染症である。

【0024】

本発明者らは、驚くべきことに、RTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤の組み合わせがHBVの相乗的阻害を提供することを実証した。

【0025】

配列表

本出願と共に提出された配列表は、参照により本明細書に組み込まれる。配列表と明細書又は図面との間に不一致がある場合、明細書（図面を含む）に開示された情報は正しいと見なされる。

50

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】ホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドを介して三価G a l N A c部分にコンジュゲートした化合物243__1（配列番号243）

【図1A】化合物243__1の残基A（配列番号243）

【図2】ホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドを介して三価G a l N A c部分にコンジュゲートした化合物244__1（配列番号244）

【図2A】化合物244__1の残基A（配列番号244）

【図3】ホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドを介して三価G a l N A c部分にコンジュゲートした化合物245__1（配列番号245）

【図3A】化合物245__1の残基A（配列番号245）

【図4】ホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドを介して三価G a l N A c部分にコンジュゲートした化合物246__1（配列番号246）

【図4A】化合物246__1の残基A（配列番号246）

【図5-1】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。図5Lの化合物は、合成の一部として依然として固体支持体上にある間にオリゴヌクレオチドに添加された単量体G a l N A cホスホラミダイトから構成され、XはS又はOであり、YはS又はOであり、n = 1～3である（国際公開第2017／178656号を参照）。図5Bと図5Dは、本明細書ではG a l N A c 2又はG N 2とも呼ばれ、それぞれ、C6リンカーを有さないものと、有するものである。

【図5-2】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-3】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-4】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-5】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-6】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-7】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-8】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図5-9】図5は、例示的なG a l N A c部分を示す。

【図6-1】図6A～図6L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。図6A～Dにおける化合物は、ジリジンブランチャー（b r a n c h e r）分子、PEG3スパーサー、及び3つの末端G a l N A c炭水化物部分を含む。図6A（図6A-1及び図6A-2は、同じ化合物の2つの異なるジアステレオ異性体を示す）及び図6B（図6B-1及び図6B-2は、同じ化合物の2つの異なるジアステレオ異性体を示す）の化合物では、オリゴヌクレオチドはアルキルリンカーなしでアシアロ糖タンパク質受容体標的化コンジュゲート部分に直接結合している。図6C（図6C-1及び図6C-2は、同じ化合物の2つの異なるジアステレオ異性体を示す）及び図6D（図6D-1及び図6D-2は、同じ化合物の2つの異なるジアステレオ異性体を示す）の化合物では、オリゴヌクレオチドはC6リンカーを介してアシアロ糖タンパク質受容体標的化コンジュゲート部分に結合している。図6E-Kの化合物は、種々の長さ及び構造の市販のトレブラー（t r e b l e r）ブランチャー分子及びスパーサー、並びに3つの末端G a l N A c炭水化物部分を含む。図6Lの化合物は、合成の一部として依然として固体支持体上にある間にオリゴヌクレオチドに添加された単量体G a l N A cホスホラミダイトから構成され、X = S又はOであり、独立してY = S又はOであり、n = 1～3である（国際公開第2017／178656号参照）。

【図6-2】図6A～図6L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図6-3】図6A～図6L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図6-4】図6A～図6L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される

、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図 6-5】図 6 A～図 6 L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図 6-6】図 6 A～図 6 L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図 6-7】図 6 A～図 6 L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図 6-8】図 6 A～図 6 L：オリゴヌクレオチドが上記の「A」という用語で表される、例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを示す。

【図 7】ヒト細胞株 MDA-MB-231 における濃度依存的な効力及び有効性について、オリゴヌクレオチド CMP 番号 243__1、244__1、245__1 及び 246__1 をインビトロで試験する。

【図 8】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 325__1 (配列番号 325)

【図 8 A】化合物 325__1 の残基 A (配列番号 325)

【図 9】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 325__2 (配列番号 325)

【図 9 A】化合物 325__2 の残基 A (配列番号 325)

【図 10】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 326__1 (配列番号 326)

【図 10 A】化合物 326__1 の残基 A (配列番号 326)

【図 11】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 326__2 (配列番号 326)

【図 11 A】化合物 326__2 の残基 A (配列番号 326)

【図 12】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 326__3 (配列番号 326)

【図 12 A】化合物 326__3 の残基 (配列番号 326)

【図 13】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 326__4 (配列番号 326)

【図 13 A】化合物 326__4 の残基 A (配列番号 326)

【図 14】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 327__1 (配列番号 327)

【図 14 A】化合物 327__1 の残基 A (配列番号 327)

【図 15】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 328__1 (配列番号 328)

【図 15 A】化合物 328__1 の残基 A (配列番号 328)

【図 16】ホスホジエステル結合 DNA ジヌクレオチドを介して GalNAc 部分にコンジュゲートした化合物 329__1 (配列番号 329)

【図 16 A】化合物 329__1 の残基 A (配列番号 329)

【図 17】図 17 は、Hela 細胞における抗 FUBP1 化合物のインビトロ有効性の分析の結果を示す。FUBP1 mRNA レベルを正規化し、対照の % として示す。

【図 18】標的結合：FUBP1 mRNA。実施例 2.3 に記載されるように、4 つのアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物が HBV 感染 PHH 細胞において試験されている。各化合物を 10 μ M の濃度で週に 1 回、3 週間細胞に送達した。最後の処置の 1 週間後に、FUBP1 mRNA 標的 KD を評価した。総 RNA を、Magna Pure ロボット及び Magna Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit を製造者のプロトコルに従って使用して細胞から抽出し、FUBP1 mRNA を TaqMan qPCR によって定量した。この図は、10 μ M で試験したオリゴを用いた陰性対照 (NDC = 1) と比較した標的 mRNA の残存発現を示す。データをヒト GUS B 参照遺伝子に対して正規化し、2 つの生物学的レプリケートからの平均 +

10

20

30

40

50

S Dを試験した各オリゴについて報告する。50%及び20%のFCがグラフ上で強調表示されている。CMP番号326__3は、それぞれ10μMで80%減少mRNA発現を有する最良のFUBP1 mRNA KDを示す。CMP番号329__1は、先行技術のオリゴ(CMP番号276__1及び291__1)と比較して、CMP番号326__3を有するオリゴヌクレオチドと同等に、FUBP1 mRNAの減少において最も強い効果を示す。それらは両方とも、NDCと比較して10μMで標的mRNA発現を約80%減少させる。

【図19】肝内HBV DNAのサザンブロットは、FUBP1及びRTEL1 LNA単剤処置アームにおけるcccDNA及び総HBV DNAの減少を明らかにし、これは、FUBP1+RTEL1組み合わせアームにおいてさらに増強される。検出のためにHBV特異的完全ゲノム長プローブを使用したPXBマウス肝臓からの全DNA抽出物のサザンブロット。DNA濃度をNanoDropによって調整し、15ugのDNAをレーン毎にロードした。赤色のボックスはcccDNAバンドを示す。

10

【図20】qPCRによる肝内cccDNA及び総HBV DNAレベルの半定量化。

【図21】ベースライン補正血清HBV DNAレベルの動態。

【図22】ベースライン補正血清HBsAgの動態

【図23】ベースライン補正血清HBeAgの動態

【図24】RT-qPCRによって評価したRTEL1及びFUBP1 LNA分子の肝内標的結合及び有効性

【図25】単一FUBP1 ASO (GalNAc-326__3)、単一RTEL1 ASO (GalNAc-245__1)、2つのRTEL1/FUBP1二重ASO (GalNAc-350__1及びGalNAc-351__1)、FUBP1 ASO (GalNAc-326__3)+RTEL1 ASO (GalNAc-245__1)の組み合わせ及び陰性対照 (GalNAc-352__1)を参照のために使用した、HBV感染PHHにおける肝内HBV pRNAのインビトロ減少。

20

【図26】単一FUBP1 ASO (GalNAc-326__3)、単一RTEL1 ASO (GalNAc-245__1)、2つのRTEL1/FUBP1二重ASO (GalNAc-350__1及びGalNAc-351__1)、FUBP1 ASO (GalNAc-326__3)+RTEL1 ASO (GalNAc-245__1)の組み合わせ及び陰性対照 (GalNAc-352__1)を参照のために使用した、HBV感染PHHにおける肝内HBV RNAのインビトロ減少。

30

【図27】別々に投与された(すなわち、2つの個々のASOとして添加された)、CMP番号352__1(対照)、326__3(FUBP1)、245__1(RTEL1)、350__1(二重)、351__1(二重)及び326__3(FUBP1)+245__1(RTEL1)のコンジュゲートバージョンのRTEL1遺伝子発現及び関連するEC50値の用量応答曲線。

【図28】別々に投与された(すなわち、2つの個々のASOとして添加された)、CMP番号352__1(対照)、326__3(FUBP1)、245__1(RTEL1)、350__1(二重)、351__1(二重)及び326__3(FUBP1)+245__1(RTEL1)のコンジュゲートバージョンのFUBP1遺伝子発現及び関連するEC50値の用量応答曲線。

40

【0027】

定義

2'糖修飾ヌクレオシド

2'糖修飾ヌクレオシドは、2'位にH若しくは-OH以外の置換基を有するヌクレオシド(2'置換ヌクレオシド)、又はリボース環の2'炭素と第2の炭素との間に架橋を形成できる2'結合バイラジカルを含むヌクレオシド、例えばLNA(2'-4'バイラジカル架橋)ヌクレオシドである。

【0028】

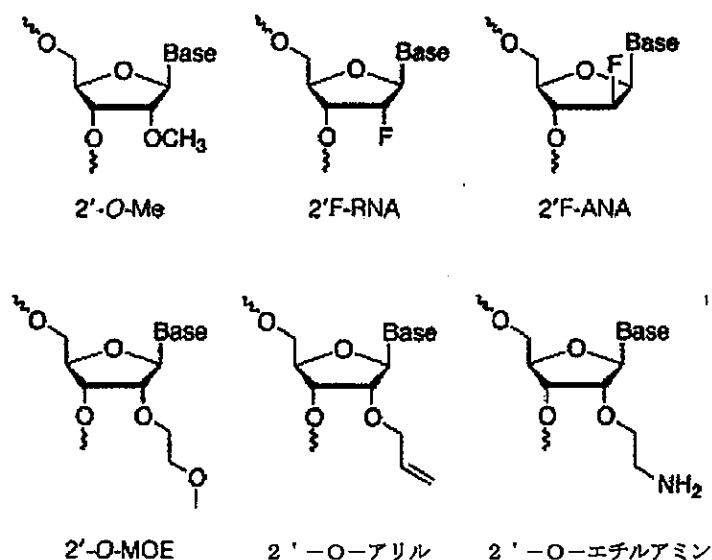
実際、2'糖置換ヌクレオシドの開発には多くの注目が集まっており、数多くの2'置換

50

ヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドに組み込まれた際に有益な特性を有することが見出されている。例えば、2' 修飾糖は、高められた結合親和性及び／又は増大されたヌクレアーゼ耐性をオリゴヌクレオチドにもたらしすることができる。2' 置換修飾ヌクレオシドの例は、2' -O-アルキル-RNAヌクレオシド、2' -O-メチル-RNAヌクレオシド、2' -アルコキシ-RNAヌクレオシド、2' -O-メトキシエチル-RNA (MOE)ヌクレオシド、2' -アミノ-DNAヌクレオシド、2' -フルオロ-RNAヌクレオシド及び2' -F-ANAヌクレオシドである。さらなる例については、例えばFreier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213、及びDeleavey and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937を参照されたい。以下は、いくつかの2' 置換修飾ヌクレオシドの例示である。

10

【化1】



20

【0029】

30

本発明に関して、2' 置換糖修飾ヌクレオシドは、LNAのような2' 架橋ヌクレオシドを含まない。

【0030】

交互フランクギャップマー

フランク領域は、LNAとDNAヌクレオシドの両方を含んでよく、それらはLNA-DNA-LNAヌクレオシドの交互のモチーフを含むことから、「交互フランク」と呼ばれる。少なくとも1つの交互フランクを含むギャップマーは、「交互フランクギャップマー」と称される。したがって、「交互フランクギャップマー」は、少なくとも1つのフランク (F又はF') がLNAヌクレオシド (複数可) に加えてDNAを含む、LNAギャップマーオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域F若しくはF'の少なくとも一方、又は領域FとF'の両方が、LNAヌクレオシドとDNAヌクレオシドの両方を含む。このような実施形態では、フランク領域F又はF'、若しくはF及びF'の両方が少なくとも3つのヌクレオシドを含み、F及び／又はF'領域の最も5'及び3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。交互フランクLNAギャップマーは、国際公開第2016/127002号に開示されている。

40

【0031】

交互フランク領域は、1~2つ、又は1つ、又は2つ、又は3つの連続するDNAヌクレオシド等の最大3つの連続するDNAヌクレオシドを含み得る。

【0032】

交互フランク領域は、一連の整数として注釈を付けることができ、これは、いくつかの

50

LNAヌクレオシド（L）とそれに続くいくつかのDNAヌクレオシド（D）、例えば [L] 1-3-[D] 1-3-[L] 1-3又は [L] 1-2-[D] 1-2-[L] 1-2-[D] 1-2-[L] 1-2を表す。オリゴヌクレオチド設計では、これらは、2-2-1が5' [L] 2-[D] 2-[L] 3'を表し、1-1-1-1-1が5' [L]-[D]-[L]-[D]-[L] 3'を表すような数として表されることが多い。交互フランクを有するオリゴヌクレオチド内のフランク（領域F及びF'）の長さは、これらの領域について本明細書で上述したように、例えば4~8、例えば5~6個のヌクレオシド、例えば4、5、6又は7個の修飾ヌクレオシドであり得る。追加のエキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、3'フランク（F'）の3'末端に少なくとも2つのLNAヌクレオシドを有することが有利であり得る。

10

【0033】

一実施形態では、本発明で使用するためのギャップマーオリゴヌクレオチドは、以下の式によって表すことができる：

$F_4-6-G_7-11-F'_2-6$ 、

式中、Fは、[L] 1-3-[D] 1-3-[L] 1-3の設計を有し、F'は、[L] 1-2-[D] 1-2-[L] 2-4、又は [L] 2-6の設計を有する。

ただし、ギャップマー領域F-G-F'の全長は、少なくとも16ヌクレオチド、例えば17又は18ヌクレオチド長であることを条件とする。

【0034】

したがって、本発明のギャップマーオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの交互フランクを含み得る。典型的には、少なくともF領域は、交互フランクである。いくつかの実施形態では、F領域とF'領域の両方が交互フランクである。いくつかの実施形態では、F領域は交互フランクであり、F'領域は均一なフランクである（すなわち、F'は、ベータ-D-オキシLNAのみなどの1種類のみの糖修飾ヌクレオシドからなる）。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、領域Fの設計は、3-2-1（すなわちLLLDDL）、3-1-1（すなわちLLLDL）、2-1-2（LLDLL）、2-1-1（LLDL）及び1-3-1（すなわちLDDDL）の設計から選択される。

【0036】

いくつかの実施形態では、領域F'の設計は、1-1-3（すなわちLDLLL）又は1-1-2（すなわちLDLL）である。いくつかの実施形態では、領域Fの設計は、LL、LLL又はLLLLである。

30

【0037】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書で用いられる「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ASO」という用語は、標的核酸、特に標的核酸上の連続配列にハイブリダイズすることによって標的遺伝子の発現を調節することができるオリゴヌクレオチドとして定義される。本明細書のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本質的に二本鎖ではなく、したがってsiRNA又はshRNAではない。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖である。本発明の単鎖オリゴヌクレオチドは、自己内又は自己間の相補性の程度がオリゴヌクレオチドの全長にわたって50%未満である限り、ヘアピン又は分子間二重構造（同じオリゴヌクレオチドの2つの分子間の二重鎖）を形成することができるものと理解される。

40

【0038】

有利には、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性を低減させるためRNAヌクレオシドを含まない。

【0039】

有利には、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、例えば2'糖修飾ヌクレオシドなどの1つ又は複数の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含む。さらに、修飾されていないヌクレオシドがDNAヌクレオシドであることは有利である。

【0040】

50

c c c DNA (共有結合閉環状DNA)

c c c DNA (共有結合閉環状DNA)は、細胞核内のいくつかのDNAウイルス(ポリオーマウイルス科)の増殖中に生じる特別なDNA構造である。c c c DNAは、DNAリガーゼによって共有結合的に閉じた環に連結される線状形態で生じる二本鎖DNAである。ほとんどの場合、ウイルスDNAの転写は環状形態からのみ起こり得る。ウイルスのc c c DNAは、エピソームDNA又は時折ミニ染色体としても知られている。

【0041】

c c c DNAは、B型肝炎ウイルス(HBV)を含むカリモウイルス科(Caulimoviridae)及びヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)に典型的である。HBVゲノムは、肝細胞核内で、共有結合閉環状DNA(c c c DNA)である安定なミニ染色体を形成する。c c c DNAは、カプシド結合弛緩型環状DNA(rcDNA)の変換によって形成される。HBV c c c DNA形成は、細胞DNA修復機構を必要とし、rcDNA中の正鎖DNAの完成に寄与する異なる細胞成分との特異的相互作用に依存する多段階プロセスを含む(Alweiss et al. 2017, Viruses, 9(6):156)。

【0042】

c c c DNAは感染した肝細胞の核に存在するウイルスの遺伝的鋳型であり、増殖性感染に必要な全てのHBV RNA転写物を生じ、慢性HBV感染症の自然経過中のウイルス持続に関与する(Locarnini & Zoulim, 2010 Antivir Ther. 15 Suppl 3:3-14. doi:10.3851/IMP1619)。c c c DNAはウイルスのリザーバとして作用し、処置中止後のウイルスリバウンド源であって、長期の、時として生涯の処置を必要とする。PEG-IFNは、その種々の副作用に起因して、CHBの小サブセットにしか投与できない。

【0043】

したがって、HBV c c c DNAの分解又は除去により定義される完全治癒をCHB患者の大部分にもたらすことができる新規の治療法が、強く必要とされている。

【0044】

組み合わせ

「組み合わせ」という用語は、疾患を処置するための少なくとも2つの異なる活性化化合物又はプロドラッグ(医療用化合物又は医薬)の組み合わせとして理解される。医薬組み合わせは、物理的、化学的、又は他の方法で組み合わせられる化合物(例えば、同じバイアル内)；一緒にパッケージ化される化合物(例えば、同時投与、逐次投与又は別々の投与のいずれかのための同じパッケージ(キットオブパーツ)内の2つの別々の物体として)；又は別々に提供されているが一緒に使用されることが意図されている化合物(例えば、組み合わせが化合物ラベル又は添付文書に明示的に記載されている)を含み得る。適切には、医薬組み合わせは、経口投与用に製剤化された医療用化合物及び皮下注射用に製剤化された医療用化合物からなる。適切には、本発明の組み合わせのRTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤は、同じ又は別個の組成物中に存在し得る。適切には、本発明の組み合わせのRTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤は、同時に、連続的に、又は別々に投与され得る。適切には、本発明の組み合わせのRTEL1阻害剤及びFUBP1阻害剤は、本出願で定義されるような生理学的に不安定なリンカーによって互いに結合される。適切な生理学的に不安定なリンカーは、AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC又はGGからなる群から選択される配列を有するDNAジヌクレオチドを含み得るか、又はそれからなり得、2つのDNAヌクレオシド間にホスホジエステル結合が存在する。例えば、リンカーはCAジヌクレオチドによるものであり得る。

【0045】

相補性

「相補性」という用語は、ヌクレオシド／ヌクレオチドのワトソン・クリック塩基対合能力を説明する。ワトソン・クリック塩基対は、グアニン(G)－シトシン(C)及びア

10

20

30

40

50

デニン（A）ーチミン（T）／ウラシル（U）である。オリゴヌクレオチドは修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを含んでいてもよく、例えば5ーメチルシトシンは、しばしばシトシンの代わりに用いられ、したがって、相補性という用語は、非修飾核酸塩基と修飾核酸塩基との間のワトソン・クリック塩基対合を包含することが理解されよう（例えば、H i r a o e t a l (2 0 1 2) A c c o u n t s o f C h e m i c a l R e s e a r c h v o l 4 5 p a g e 2 0 5 5 及び B e r g s t r o m (2 0 0 9) C u r r e n t P r o t o c o l s i n N u c l e i c A c i d C h e m i s t r y S u p p l . 3 7 1 . 4 . 1 を参照されたい）。

【0046】

用語「%相補的」とは、本明細書で使用される場合、連続ヌクレオチド配列にわたって参照配列（例えば、標的配列又は配列モチーフ）に対して相補的である、核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）の連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドの割合（パーセント）を指す。したがって、相補性のパーセンテージは、2つの配列間（標的配列5'ー3'と3'ー5'からのオリゴヌクレオチド配列とを整列させた場合）で相補的である（ワトソン・クリック塩基対から）整列した核酸塩基の数を数え、その数をオリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数で割り、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、整列（塩基対を形成）しない核酸塩基／ヌクレオチドは、ミスマッチと称される。挿入及び欠失は、連続ヌクレオチド配列の%相補性の計算において許容されない。相補性の決定において、核酸塩基の化学的修飾は、核酸塩基がワトソン・クリック塩基対合を形成する機能的な能力が保持される限り、無視されることが理解されるであろう（例えば、5'ーメチルシトシンは、%同一性の計算の目的のために、シトシンと同一であると見なされる）。

【0047】

「完全に相補的」という用語は、100%の相補性を指す。

【0048】

以下は、標的核酸（配列番号12）に完全に相補的なオリゴヌクレオチドモチーフ（配列番号38）の例である。

5'ーCTTTGACCAAGAGTATGTAAATTCCTCー3'（配列番号12）

3'ーAAACTGTGCTCTCATACATTTTー5'（配列番号38）

【0049】

化合物

本明細書では、「化合物」という用語は、RTEL1又はFUBP1の発現又は活性を阻害することができる任意の分子を意味する。本発明の組み合わせの特定の化合物は、本発明に係るRNAi分子若しくはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの核酸分子、又はそのような核酸分子を含む任意のコンジュゲートである。例えば、本明細書において、化合物は、RTEL1又はFUBP1を標的とする核酸分子、特にアンチセンスオリゴヌクレオチド又はsiRNAであり得る。

【0050】

コンジュゲート

本明細書で用いられるコンジュゲートという用語は、非ヌクレオチド部分（コンジュゲート部分又は領域C又は第3の領域）に共有結合したオリゴヌクレオチドを指す。

【0051】

1つ又は複数の非ヌクレオチド部分に対する本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチド（又は核酸分子）のコンジュゲーションは、例えば、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞取込み、又は安定性に影響を及ぼすことにより、薬効薬理を改善し得る。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、オリゴヌクレオチドの細胞分布、バイオアベイラビリティ、代謝、排泄、浸透性、及び／又は細胞取込みを改善することにより、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を調節又は向上させる。特に、コンジュゲートは、オリゴヌクレオチドを特定の器官、組織、又は細胞型に標的化し、それによって、その器官、組織、又は細胞型におけるオリゴヌクレオチドの有効性を高めることができる。同時に、コ

ンジュゲートは、非標的細胞型、組織又は器官内のオリゴヌクレオチドの活性を減少させるのに役立ち得る（例えば、非標的細胞型、組織又は器官におけるオフターゲット活性又は活性）。s i R N A 核酸分子の場合、コンジュゲート部分は最も一般的には s i R N A のパッセンジャー鎖に共有結合しており、s h R N A 分子の場合、コンジュゲート部分は最も一般的には s h R N A の連続ヌクレオチド配列から最も離れた分子の末端に結合している。アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、コンジュゲート部分は、有利には、2～5個のホスホジエステル結合DNAヌクレオシドなどの生体切断可能なリンカーを使用して、任意の末端に共有結合することができる。

【0052】

国際公開第93／07883号及び同第2013／033230号は、好適なコンジュゲート部分を提供し、これらは参照により本明細書に組み込まれる。さらなる適切なコンジュゲート部分は、アジア糖タンパク質受容体（ASGPR）に結合することができるものである。特に、三価N－アセチルガラクトサミンのコンジュゲート部分は、ASGPRへの結合に適しており、例えば、US2009／02398、国際公開第2014／076196号、国際公開第2014／207232号、及び国際公開第2014／179620号（参照することによって本明細書に組み込まれる）を参照されたい。このようなコンジュゲートは、肝臓へのオリゴヌクレオチドの取込みを促進する一方で、腎臓におけるその存在を減少させるのに役立ち、それによって、同じオリゴヌクレオチドの非コンジュゲートバージョンと比較して、コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの肝臓／腎臓比を増加させる。

【0053】

オリゴヌクレオチドコンジュゲート及びそれらの合成はまた、ManoharanによるAntisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S. T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001及びManoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103の包括的レビューに報告されており、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。

【0054】

一実施形態では、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、原薬、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）又はそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0055】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012／143379号に開示されているような、トランスフェリン受容体に対して特異的親和性を有する抗体又は抗体断片である。いくつかの実施形態では、非ヌクレオチド部分は、抗体又は抗体断片、例えば血液脳関門を通る送達を促進する抗体又は抗体断片、特にトランスフェリン受容体を標的とする抗体又は抗体断片である。

【0056】

連続ヌクレオチド配列

「連続ヌクレオチド配列」という用語は、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書で「連続核酸塩基配列」という用語及び「オリゴヌクレオチドモチーフ配列」という用語と互換的に用いられる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドが連続ヌクレオチド配列を構成する。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、s i R N A 分子のガイド鎖に含まれる。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、標的核酸に対して100%相補的であるs h R N A 分子の一部である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、F－G－F'ギャップマー領域のような連続ヌクレオチド配列を含み、任意には、さらなるヌクレオチド（複数可）、例えば、官能基（例えば、標的化のためのコンジュゲート基）を連続ヌ

クレオチド配列に結合するために使用され得るヌクレオチドリンカー領域を含み得る。ヌクレオチドリンカー領域は、標的核酸に相補的であっても相補的でなくてもよい。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、連続ヌクレオチド配列を構成である。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、標的核酸に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%相補的である。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、標的核酸に対して100%相補的である。

【0057】

ギャップマー

アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列はギャップマーであってもよく、また、ギャップマーオリゴヌクレオチド又はギャップマー設計とも称され得る。アンチセンスギャップマーは、通常、RNase H媒介分解を介した標的核酸の阻害に用いられる。本発明の一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNase Hを動員することが可能である。ギャップマー型オリゴヌクレオチドは、少なくとも3つの別個の構造領域、5'-フランク、ギャップ及び3'-フランク、F-G-F'を5'→3'方向で含む。「ギャップ」領域(G)は、オリゴヌクレオチドがRNase Hを動員することを可能にする連続DNAヌクレオチドのストレッチを含む。ギャップ領域は、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、有利には高親和性糖修飾ヌクレオシドを含む5'フランキンク領域(F)と、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、有利には高親和性糖修飾ヌクレオシドを含む3'フランキンク領域(F')が隣接する。領域F及びF'の1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシドは、標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を向上させる(すなわち、親和性向上糖修飾ヌクレオシドである)。いくつかの実施形態では、領域F及びF'の1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシドは、例えばLNA及び2'-MOEから独立して選択される、高親和性2'糖修飾などの2'糖修飾ヌクレオシドである。

【0058】

ギャップマー設計において、ギャップ領域の最も5'及び3'のヌクレオシドはDNAヌクレオシドであり、それぞれ、5'(F)又は3'(F')領域の糖修飾ヌクレオシドに隣接して配置されている。フランクはさらに、ギャップ領域から最も遠い端、すなわち5'フランクの5'末端及び3'フランクの3'末端に少なくとも1つの糖修飾ヌクレオシドを有することによって定義されてもよい。

【0059】

領域F-G-F'は、連続ヌクレオチド配列を形成する。本発明で使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、式F-G-F'のギャップマー領域を含み得る。いくつかの実施形態では、式F-G-F'のギャップマー領域のヌクレオシド間の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0060】

ギャップマー設計F-G-F'の全長は、例えば12から32ヌクレオシド、例えば13から24、例えば14から22ヌクレオシド、例えば14から17、例えば16から18ヌクレオシドであり得る。いくつかの実施形態では、全長は17個のヌクレオシドである。いくつかの実施形態では、全長は17個のヌクレオシドである。

【0061】

例として、本発明のギャップマーオリゴヌクレオチドは、以下の式によって表すことができる：

F₁₋₈-G₅₋₁₈-F'₁₋₈、例えば

F₁₋₈-G₅₋₁₆-F'₁₋₈、又は

F₁₋₈-G₇₋₁₆-F'₂₋₈、又は

F₄₋₈-G₇₋₁₂-F'₂₋₈、又は

F₄₋₆-G₇₋₁₁-F'₂₋₆

ただし、ギャップマー領域F-G-F'の全長は、少なくとも12、例えば少なくとも

14ヌクレオチド長であることを条件とする。

【0062】

本発明の一態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、式5'-F-G-F'-3'のギャップマーからなるか又はそれを含み、式中、領域F及びF'は独立して1~8個のヌクレオシドを含み、そのうち1~4個は2'糖修飾され、F及びF'領域の5'及び3'末端を規定し、GはRNase Hを動員することが可能な6~18個のヌクレオシドの領域、例えば6~16個のヌクレオシドの領域である。いくつかの実施形態では、G領域はDNAヌクレオシドからなる。

【0063】

いくつかの実施形態では、領域F及びF'の全ての修飾ヌクレオシドは、ベーターデオキシRNAヌクレオシドである。さらに、領域F若しくはF'、又は、F及びF'は、任意に、DNAヌクレオシドを含む。任意に、フランキング領域F若しくはF'、又は両方のフランキング領域F及びF'は、1つ又は複数のDNAヌクレオシド（交互フランク、より詳細については交互フランクの定義を参照されたい。）を含み得る

【0064】

領域F、G、及びF'は、さらに以下に定義され、F-G-F'式に組み込むことができる。

ギャップマー領域G

【0065】

ギャップマーの領域G（ギャップ領域）は、オリゴヌクレオチドがRNase H、例えばヒトRNase H1を動員することを可能にするヌクレオシド、典型的にはDNAヌクレオシドの領域である。RNase Hは、DNAとRNAとの間の二重鎖を認識し、RNA分子を酵素的に切断する細胞性酵素である。適切には、ギャップマーは、少なくとも5又は6連続DNAヌクレオシド、例えば5~18連続DNAヌクレオシド、5~17連続DNAヌクレオシド、例えば5~16連続DNAヌクレオシド、例えば6~15連続DNAヌクレオシド、例えば7~14連続DNAヌクレオシド、例えば8~12連続DNAヌクレオチド、例えば8~12連続DNAヌクレオチド長のギャップ領域（G）を有してもよい。ギャップ領域Gは、いくつかの実施形態では、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、又は18連続DNAヌクレオシドからなってもよい。ギャップ領域のシトシン（C）DNAは、いくつかの場合においてメチル化されていてもよく、そのような残基には5'-メチルシトシン^{me}C、又はcの代わりにe）と注釈が付けられる。ギャップ中のシトシンDNAのメチル化は、cgジヌクレオチドが潜在的な毒性を減少させるようにギャップ中に存在する場合に有利であり、修飾はオリゴヌクレオチドの効力に有意な影響を及ぼさない。5'メチルDNAヌクレオシドのような5'置換DNAヌクレオシドは、DNAギャップ領域での使用が報告されている（欧州特許出願公開第EP2742136号）。

【0066】

いくつかの実施形態では、ギャップ領域Gは、12個以下の連続したDNAヌクレオシド、例えば7、8、9、10、又は11個の連続したDNAヌクレオシド、例えば9、10、又は11個の連続したDNAヌクレオシドからなり得る。

【0067】

ギャップ領域内の1つ又は複数のシトシン（C）DNAは、いくつかの場合、メチル化され得る（例えば、DNA^cにDNA^gが続く場合）。そのような残基は、いずれも5'-メチルシトシン（^{me}C）として注釈が付けられている。

【0068】

いくつかの実施形態では、ギャップ領域Gは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、又は18連続ホスホロチオエート結合DNAヌクレオシドからなってもよい。いくつかの実施形態では、ギャップ内の全てのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合である。

【0069】

10

20

30

40

50

従来のギャップマーはDNAギャップ領域を有するが、ギャップ領域内で用いられる場合にRNase Hの動員を可能にする修飾ヌクレオシドの例が数多く存在する。ギャップ領域内に含まれる場合にRNase Hを動員することができると報告されている修飾ヌクレオシドには、例えば、アルファ-L-LNA、C4'アルキル化DNA (PCT/EP 2009/050349及びVester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300に記載 (ともに参照により本明細書に組み込まれる))、ANA及び2'F-ANAのようなアラビノース由来ヌクレオシド (Mangos et al., 2003 J. AM. CHEM. SOC. 125, 654-661)、UNA (アンロックド核酸) (Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039に記載 (参照により本明細書に組み込まれる)) が含まれる。UNAは、典型的には、リボースのC2とC3との間の結合が除去され、アンロックド「糖」残基を形成するアンロックド核酸である。このようなギャップマーに使用されている修飾ヌクレオシドは、ギャップ領域内に導入された場合に2'エンド (endo) (DNA様) 構造を採用する (すなわち、RNase H動員を可能にする修飾) ヌクレオシドであってもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のDNAギャップ領域 (G) は、任意に、ギャップ領域内に導入された際に2'エンド (DNA様) 構造を採用する1~3つの糖修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

10

【0070】

ギャップマー—フランキング領域、F及びF'

領域Fは、領域Gの5' DNAヌクレオシドのすぐ隣に配置されている。領域Fの最も3'のヌクレオシドは、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、例えば2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシド、又はLNAヌクレオシドである。

20

【0071】

領域F'は、領域Gの3' DNAヌクレオシドのすぐ隣に配置されている。領域Fの最も5'のヌクレオシドは、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、例えば2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシド、又はLNAヌクレオシドである。

【0072】

領域Fは、1~8個の連続ヌクレオチド長、例えば2~6個、例えば3~4個の連続ヌクレオチド長又は例えば4~6個の連続したヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、領域Fの長さは4個の連続ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域Fの長さは5個の連続ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域Fの長さは6個の連続ヌクレオチドである。有利には、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態では、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシドヌクレオシド、例えば2つの3' MOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドである。

30

【0073】

領域F'は、2~8連続ヌクレオチド長、例えば3~6、例えば4~5連続ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、領域F'の長さは2個の連続ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域F'の長さは3個の連続ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域F'の長さは4個の連続ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、領域F'の長さは5個の連続ヌクレオチドである。有利には、実施形態では、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、

40

50

2'置換ヌクレオシドヌクレオシド、例えば2つの3' MOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドである。

【0074】

領域F又はF'の長さが1である場合、それは、有利には、LNAヌクレオシドであることに留意すべきである。

【0075】

いくつかの実施形態では、領域F及びF'は、独立して、糖修飾ヌクレオシドの連続する配列からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、領域Fの糖修飾ヌクレオシドは、独立して、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-O-メチル-RNA、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-アルコキシ-RNA、MOE単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位及び2'-フルオロ-ANA単位から選択されてもよい。

【0076】

いくつかの実施形態において、領域F及びF'は、独立して、LNA及び2'置換修飾ヌクレオシドの両方を含む(混合ウイング設計)。

【0077】

いくつかの実施形態において、領域F及びF'は、1種類のための糖修飾ヌクレオシド、例えばMOEのみ、又はベター-D-オキシLNAのみ、又はScETのみからなる。このような設計は、均一フランク又は均一ギャップマー設計とも称される。

【0078】

いくつかの実施形態では、領域F若しくはF'、又はF及びF'の全ヌクレオシドは、例えばベター-D-オキシLNA、ENA又はScETヌクレオシドから独立して選択されるような、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態では、領域Fは、1~5つ、例えば2~4つ、例えば3~4つ、例えば1、2、3、4又は5つの連続するLNAヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、領域F及びF'の全ヌクレオシドは、ベター-D-オキシLNAヌクレオシドである。

【0079】

いくつかの実施形態では、領域F若しくはF'、又はF及びF'の全ヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばOMe又はMOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態では、領域Fは、1、2、3、4、5、6、7又は8つの連続するOMe又はMOEヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、フランキン領域の一方のみが、2'置換ヌクレオシド、例えばOMe又はMOEヌクレオシドからなり得る。いくつかの実施形態では、2'置換ヌクレオシド、例えばOMe又はMOEヌクレオシドからなるのは5'(F)フランキン領域であり、一方、3'(F')フランキン領域は、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えばベター-D-オキシLNAヌクレオシド又はcETヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、2'置換ヌクレオシド、例えばOMe又はMOEヌクレオシドからなるのは3'(F')フランキン領域であり、一方、5'(F)フランキン領域は、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えばベター-D-オキシLNAヌクレオシド又はcETヌクレオシドを含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、領域F及びF'の全修飾ヌクレオシドは、例えばベター-D-オキシLNA、ENA又はScETヌクレオシドから独立して選択されるようなLNAヌクレオシドであり、領域F若しくはF'、又はF及びF'は、任意に、DNAヌクレオシドを含んでもよい(交互フランク、より詳細にはこれらの定義を参照)。いくつかの実施形態において、領域F及びF'の全修飾ヌクレオシドはベター-D-オキシLNAヌクレオシドであり、一方、領域F若しくはF'、又はF及びF'は、任意に、DNAヌクレオシドを含んでもよい(交互フランク、より詳細にはこれらの定義を参照)。

【0081】

さらなるギャップマー設計は、参照することによって本明細書に組み込まれる、国際公

10

20

30

40

50

開第2004/046160号、国際公開第2007/146511号、及び国際公開第2008/113832号に開示されている。

【0082】

いくつかの実施形態において、領域F及びF'の最も5'及び最も3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシド、例えばベーターD-オキシLNAヌクレオシド又はScETヌクレオシドである。

【0083】

いくつかの実施形態において、領域Fと領域Gとの間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態において、領域F'と領域Gとの間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態では、領域F又はF'、F及びF'のヌクレオシド間のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0084】

HBV感染症

用語「B型肝炎ウイルス感染症」又は「HBV感染症」とは、当該技術分野では一般的に知られており、B型肝炎ウイルス(HBV)によって引き起こされ、かつ肝臓に影響を及ぼす感染性疾患を指す。HBV感染症は急性感染症又は慢性感染症であり得る。

【0085】

感染者の中には、初期感染中に症候がなく、嘔吐、黄色がかった皮膚、疲労、暗色尿及び腹痛を伴う病気を急速に発症する者もいる(「B型肝炎ファクトシート204番」。who.int. 2014年7月。2014年11月4日検索)。多くの場合、これらの症候は数週間続き、死に至る可能性がある。症候が始まるのに30~180日かかることがある。出生時の頃に感染した人の90%が慢性B型肝炎感染を発症し、5歳以降に感染した人の10%未満が発症する(2011年11月29日に検索された米国疾病管理予防センター(CDC)の「公衆伝染に関するB型肝炎のFAQs」)。慢性疾患を有する人の大部分は症状を有しないが、肝硬変及び肝臓癌が最終的に発症し得る(Chang, 2007, Semin Fetal Neonatal Med, 12:160-167)。これらの合併症は、慢性疾患を有する者の15~25%の死亡をもたらす(「B型肝炎ファクトシート204番」。who.int. 2014年7月。2014年11月4日検索)。本明細書において、「HBV感染症」という用語は、急性及び慢性B型肝炎感染症を含む。「HBV感染症」という用語はまた、HBV感染症の初期感染の無症候性段階、症候性段階、並びに無症候性慢性段階を含む。

【0086】

慢性B型肝炎ウイルス(chronic hepatitis B virus: CHB)感染は、世界中で2億4800万人に影響する世界的な疾病負荷である。年間およそ686,000人の死亡は、HBV関連末期肝疾患及び肝細胞癌腫(HCC)に起因する(GBD, 2013年; Schweitzerら, 2015年)。WHOは、さらなる介入がなければ、CHB感染者の数は今後40~50年間にわたり現在の高い水準を維持し、累積2000万人が2015~2030年の間に死亡すると予測した(WHO, 2016年)。CHB感染症は特異な臨床症状を呈する同種疾患ではない。感染した個体は、生涯でCHB関連肝疾患のいくつかの段階を経て進行している。これらの病期もまた標準治療(standard of care: SOC)による処置の基礎となる。現在のガイドラインでは、血清ALTレベル、HBV DNAレベル、及び肝疾患の重症度の3つの基準に基づいて、CHBに感染した特定の個人のみを処置することを推奨している(EASL, 2017年)。この推奨は、SOC、すなわちヌクレオシ(チ)ド類似体(NA)及びペグ化インターフェロン-α(PEG-IFN)が治癒的ではなく、かつ長期間投与しなければならず、それによって安全性リスクが増加するという事実による。NAはHBV DNA複製を効果的に抑制する。しかしながら、他のウイルスマーカーには非常に限られた影響しか及ぼさない/一切影響を及ぼさない。HBV感染の2つの特徴である、B型肝炎表面抗原(HBsAg)及び共有結合閉環状DNA(cccDNA)は、HBV治

癒を目的とする新薬の主な標的である。CHB患者の血漿中において、HBsAgサブウイルス（中空）粒子は、HBVビリオンを数で103～105倍上回る（Ganem & Prince、2014年）。その過剰は、急性HBV感染の消散後に観察された血清学的マーカーである中和抗HBs抗体を発現できない個体を含む、該疾患の免疫病理発生に寄与すると考えられている。

【0087】

高親和性修飾ヌクレオシド

高親和性修飾ヌクレオシドは、修飾されたヌクレオチドであり、これは、オリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、例えば融解温度（ T_m ）によって測定されるように、その相補的標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を高める。本発明の高親和性修飾ヌクレオシドは、好ましくは、修飾ヌクレオシドあたり+0.5～+12℃、より好ましくは+1.5～+10℃、最も好ましくは+3～+8℃の融解温度の上昇をもたらす。数多くの高親和性修飾ヌクレオシドが当該技術分野において知られており、例えば、多くの2'置換ヌクレオシド（例えばOme及びMOE）及びロックド核酸（LNA）が挙げられる（例えば、Freier & Altman; Nucleic Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213を参照されたい）。

【0088】

ハイブリダイゼーション

本明細書で用いられる「ハイブリダイズ」又は「ハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸鎖（例えば、siRNAガイド鎖などのオリゴヌクレオチド及び標的核酸）が対向する鎖上の塩基対間に水素結合を形成することにより二重鎖を形成することと理解されるべきである。2つの核酸鎖の間の結合の親和性は、ハイブリダイゼーションの強度である。これは、オリゴヌクレオチドの半分が標的核酸と二重鎖を形成する温度として定義される、融解温度（ T_m ）によって説明されることが多い。生理学的条件では、 T_m は親和性に厳密に比例しない（Mergny及びLacroix（2003年）「Oligonucleotides」第13巻、第515～537頁）。標準状態ギブス自由エネルギー ΔG° は、結合親和性をより正確に表し、 $\Delta G^\circ = -RT \ln(K_d)$ によって反応の解離定数（ K_d ）に関連付けられ、式中、 R は気体定数であり、 T は絶対温度である。したがって、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の反応の非常に低い ΔG° は、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の強いハイブリダイゼーションを反映している。 ΔG° は、水性濃度が1M、pHが7、温度が37℃の反応に関連したエネルギーである。標的核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、自発反応であり、自発反応の場合、 ΔG° はゼロ未満である。 ΔG° は、Hansen et al., 1965, Chem. Comm. 36-38及びHoldgate et al., 2005, Drug Discov Todayに記載されているように、例えば等温滴定熱量測定（ITC）により、実験的に測定し得る。当業者は、 ΔG° 測定のために市販の装置が入手可能であることを知るであろう。 ΔG° はまた、Santa Lucia, 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95:1460-1465によって記載された最近傍モデルを使用することによって、Sugimoto et al., 1995, Biochemistry 34:11211-11216及びMcTigue et al., 2004, Biochemistry 43:5388-5405によって記載された適切に導出された熱力学パラメータを使用して、数値的に推定することができる。その意図した核酸標的をハイブリダイゼーションによって調節する可能性を確保するために、本発明のオリゴヌクレオチドは、10～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドに対して-10 kcal未満の概算 ΔG° 値で標的核酸にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションの程度又は強度は、標準状態ギブス自由エネルギー ΔG° により測定される。オリゴヌクレオチドは、8～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドに対して-10 kcalの範囲未満、例えば-15 kcal未満、例えば-20 kcal未満、及び例えば-25 kcal未満の推定 ΔG° 値で標的核酸にハイブリダイズ

し得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、 $-10 \sim -60 \text{ kcal}$ 、例えば $-12 \sim -40$ 、例えば $-15 \sim -30 \text{ kcal}$ 又は $-16 \sim -27 \text{ kcal}$ 、例えば $-18 \sim -25 \text{ kcal}$ の推定 ΔG° 値で標的核酸にハイブリダイズする。

【0089】

同一性

本明細書で使用される「同一性」という用語は、連続ヌクレオチド配列にわたって参照配列（例えば、配列モチーフ）と同一である、核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）内の連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドの割合（パーセントで表される）を指す。したがって、同一性のパーセンテージは、2つの配列（本発明で使用するための化合物の連続ヌクレオチド配列及び参照配列における）の間で同一の（一致する）整列された核酸塩基の数を数え、その数をオリゴヌクレオチドのヌクレオチドの総数で割り、100を掛けることにより計算される。したがって、同一性の百分率 $= (\text{一致数} \times 100) / \text{整列領域}$ （例えば、連続ヌクレオチド配列）の長さ。挿入及び欠失は、連続ヌクレオチド配列の同一性の百分率の計算において許容されない。同一性の決定において、核酸塩基の化学的修飾は、核酸塩基がワトソン・クリック塩基対合を形成する機能的能力が保持される限り、無視されることが理解されよう（例えば、5-メチルシトシンは、同一性%の計算の目的のために、シトシンと同一であると見なされる）。

10

【0090】

発現の阻害

本明細書で使用される場合、「発現の阻害」という用語は、標的細胞における標的（すなわち、RTEL1又はFUBP1）の量又は活性を阻害するオリゴヌクレオチドの能力の全体的な用語として理解されるべきである。活性の阻害は、標的pre-mRNA若しくは標的mRNAのレベルを測定することによって、又は細胞中の標的若しくは標的活性のレベルを測定することによって決定され得る。したがって、発現の阻害をインビトロ又はインビボで決定することができる。

20

【0091】

典型的には、発現の阻害は、有効量のアンチセンスオリゴヌクレオチドを標的細胞に投与することによる活性の阻害を比較する、及びそのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与しない標的細胞から得られた参照レベル（対照実験）、又は既知の参照レベル（例えば、有効量のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与前の発現レベル、又は所定の若しくは他の既知の発現レベル）と比較することによって決定される。

30

【0092】

例えば、対照実験は、生理食塩水組成物又は参照オリゴヌクレオチド（多くの場合、スクランブル対照）で処置した動物若しくはヒト、又は標的細胞であり得る。

【0093】

「阻害」又は「阻害する」という用語は、標的の発現を下方調節する、減少させる、抑制する、減らす、低下させるとも呼ばれ得る。

【0094】

発現の阻害は、例えばpre-mRNA又はmRNAの分解（例えば、RNase H動員オリゴヌクレオチド、例えばギャップマーを使用する）によって起こり得る。

40

【0095】

阻害剤

「阻害剤」という用語は当技術分野で公知であり、(a)特定のタンパク質（複数可）（例えば、FUBP1又はRTEL1）の生理学的機能（すなわち、活性）を完全に又は部分的に防止又は減少させることができる化合物／物質又は組成物に関する。

【0096】

本発明の文脈において、FUBP1の「阻害剤」は、FUBP1遺伝子産物の発現を防止又は減少させることによって、それぞれFUBP1の活性／機能を防止又は減少させることができる。

【0097】

50

同様に、本発明の文脈において、RTE L 1の「阻害剤」は、RTE L 1遺伝子産物の発現を防止又は減少させることによって、それぞれRTE L 1の活性／機能を防止又は減少させることができる。

【0098】

したがって、FUBP 1又はRTE L 1の阻害剤は、それぞれFUBP 1又はRTE L 1の発現レベルの低減（例えば、それぞれ、FUBP 1若しくはRTE L 1のmRNA、又はFUBP 1若しくはRTE L 1のタンパク質のレベルの低減）をもたらす得、これは、FUBP 1又はRTE L 1の機能性（すなわち、活性）の低減に反映され、該機能はポリAポリメラーゼ機能を含む。したがって、本発明の文脈において、FUBP 1の阻害剤は、FUBP 1のレベルを減少させることができるFUBP 1発現の転写抑制因子も包含し得る。

10

【0099】

したがって、本発明の文脈において、RTE L 1の阻害剤は、RTE L 1のレベルを減少させることができるRTE L 1発現の転写抑制因子も包含し得る。「阻害剤」という用語はまた、その薬学的に許容され得る塩を包含する。好ましい阻害剤は核酸分子である。

【0100】

リンカー

結合又はリンカーは、1つ又は複数の共有結合を介して目的の1つの化学基又はセグメントを目的の別の化学基又はセグメントに連結する、2つの原子間の接続である。コンジュゲート部分は、直接又は連結部分（例えば、リンカー又はテザー）を介してオリゴヌクレオチドに結合させることができる。リンカーは、第3の領域、例えばコンジュゲート部分（領域C）を、第1の領域、例えば、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列（領域A）に共有結合する役割を果たす。

20

【0101】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、任意に、標的核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列（領域A又は第1の領域）と、コンジュゲート部分（領域C又は第3の領域）との間に位置するリンカー領域（第2の領域又は領域B及び／又は領域Y）を含み得る。

【0102】

領域Bは、哺乳動物の体内で通常遭遇する又は遭遇するものに類似した条件下で切断可能である生理学的に不安定な結合を含むか、又はそれからなる生体切断可能なリンカーを指す。生理学的に不安定なリンカーが化学的変換（例えば、切断）を受ける条件には、pH、温度、酸化又は還元条件、若しくは薬剤などの化学条件、並びに哺乳動物の細胞で見られる又は遭遇するものに類似した塩濃度が含まれる。哺乳動物の細胞内条件には、タンパク質分解酵素又は加水分解酵素又はヌクレアーゼなどの哺乳動物細胞に通常存在する酵素活性の存在も含まれる。一実施形態において、生体切断可能なリンカーは、S1ヌクレアーゼ切断の影響を受けやすい。好ましい実施形態では、ヌクレアーゼ感受性リンカーは、少なくとも2つの連続したホスホジエステル結合、例えば、少なくとも3つ又は4つ又は5つの連続したホスホジエステル結合を含む、1から10の間のヌクレオシド、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のヌクレオシド、より好ましくは2から6の間のヌクレオシド、最も好ましくは2から4の間の結合したヌクレオシドを含む。好ましくは、ヌクレオシドは、DNA又はRNAである。一実施形態では、オリゴヌクレオチドとコンジュゲート部分との間のリンカーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列の5'又は3'末端に少なくとも2個の連続するホスホジエステル結合を含む2～5個の連続するホスホジエステル結合ヌクレオシドで構成される生理学的に不安定なリンカーである。

30

40

【0103】

いくつかの実施形態では、生理学的に不安定なリンカーは、AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC又はGGからなる

50

群から選択される配列を有するDNAジヌクレオチドを含むか又はそれからなり、2つのDNAヌクレオシドの間にホスホジエステル結合が存在し、少なくとも1つのさらなるホスホジエステルが、核酸分子のオリゴヌクレオチドをジヌクレオチドに連結するか又はコンジュゲート部分をジヌクレオチドに連結するジヌクレオチドの5'又は3'末端に存在する。例えば、リンカーはCAジヌクレオチドによるものであり得る。いくつかの実施形態では、生理学的に不安定なリンカーは、配列AAA、AAT、AAC、AAG、ATA、ATT、ATC、ATG、ACA、ACT、ACC、ACG、AGA、AGT、AGC、AGG、TAA、TAT、TAC、TAG、TTA、TTT、TTC、TAG、TCA、TCT、TCC、TCG、TGA、TGT、TGC、TGG、CAA、CAT、CAC、CAG、CTA、CTG、CTC、CTT、CCA、CCT、CCC、CCG、CGA、CGT、CGC、CGG、GAA、GAT、GAC、CAG、GTA、GTT、GTC、GTG、GCA、GCT、GCC、GCG、GGA、GGT、GGC、又はGGGのDNAトリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、DNAヌクレオシドの間にホスホジエステル結合が存在し、トリヌクレオチドの5'又は3'末端にさらなるホスホジエステルが潜在的に存在する。ホスホジエステルを含む生体切断可能なリンカーは、WO2014/076195（参照により本明細書に組み込まれる）においてより詳細に記載されている。生体切断可能なリンカーを有するコンジュゲート化合物では、標準と比較した場合、コンジュゲート部分の少なくとも約50%がオリゴヌクレオチドから切断され、例えば、少なくとも約60%が切断され、例えば、少なくとも約70%が切断され、例えば、少なくとも約80%が切断され、例えば、少なくとも約85%が切断され、例えば、少なくとも約90%が切断され、例えば、コンジュゲート部分の少なくとも約95%がオリゴヌクレオチドから切断される。

10

20

30

40

50

【0104】

領域Yは、必ずしも生体切断可能ではないが、主にコンジュゲート部分（領域C又は第3の領域）をオリゴヌクレオチド（領域A又は第1の領域）に共有結合させるのに役立つリンカーを指す。領域Yリンカーは、鎖構造、又はエチレングリコール、アミノ酸単位若しくはアミノアルキル基などの繰返し単位のオリゴマーを含み得る。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、以下の局所要素A-C、A-B-C、A-B-Y-C、A-Y-B-C又はA-Y-Cから構築することができる。いくつかの実施形態では、リンカー（領域Y）は、例えばC6～C12アミノアルキル基を含むC2～C36アミノアルキル基などのアミノアルキルである。好ましい実施形態において、リンカー（領域Y）は、C6アミノアルキル基である。

【0105】

LNAギャップマー

LNAギャップマーは、領域F及びF'の一方又は両方に、LNAヌクレオシドを含むか、若しくはそれからなるギャップマーである。ベーターD-オキシギャップマーは、領域F及びF'の一方又は両方に、ベーターD-オキシLNAヌクレオシドを含むか、若しくはそれからなるギャップマーである。

【0106】

いくつかの実施形態では、LNAギャップマーは、式：[LNA]₁₋₅-[領域G]-[LNA]₁₋₅のものであり、領域Gはギャップマー領域Gの定義に規定したとおりである。

【0107】

ロックド核酸ヌクレオシド（LNAヌクレオシド）

「LNAヌクレオシド」は、該ヌクレオシドのリボース糖環のC2'とC4'とを結合するバイラジカル（「2'-4'架橋」とも称される）を含む2'糖修飾ヌクレオシドであり、これはリボース環の立体配座を制限又は固定する。これらのヌクレオシドはまた、文献において、架橋核酸又は二環式核酸（BNA）とも称されている。リボースの立体配座の固定は、LNAが相補的RNA又はDNA分子の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親和性の向上（二重鎖の安定化）に関連している。これは、

オリゴヌクレオチド／相補二重鎖の融解温度を測定することによって、日常的に決定され得る。

【0108】

非限定的で例示的なLNAヌクレオシドは、国際公開第99／014226、国際公開第00／66604、国際公開第98／039352、国際公開第2004／046160、国際公開第00／047599、国際公開第2007／134181、国際公開第2010／077578、国際公開第2010／036698、国際公開第2007／090071、国際公開第2009／006478、国際公開第2011／156202、国際公開第2008／154401、国際公開第2009／067647、国際公開第2008／150729、Morita et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. 12, 73-76、Seth et al. J. Org. Chem. 2010, Vol 75 (5) pp. 1569-81、Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009, 37 (4), 1225-1238、及びWan and Seth, J. Medical Chemistry 2016, 59, 9645-9667に開示されている。

10

【0109】

LNAヌクレオシドの特定の例がスキーム1に示されている（ここで、Bは上記定義されたとおりである）。

20

30

40

50

【化 2】

スキーム 1



【0110】

特定のLNAヌクレオシドは、ベータ-D-オキシ-LNA、6'-メチル-ベータ-D-オキシLNA、例えば(S)-6'-メチル-ベータ-D-オキシ-LNA (ScET) 及びENAである。特定の有利なLNAは、ベータ-D-オキシ-LNAである。

【0111】

混合ウイングギャップマー

混合ウイングギャップマーは、領域F及びF'の一方又は両方が、2'置換ヌクレオシド、例えば2'-O-アルキル-RNA単位、2'-O-メチル-RNA、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-アルコキシ-RNA、MOE単位、アラビノ核酸(ANA)単位及び2'-フルオロ-ANA単位から独立して選択される2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドを含むLNAギャップマーである。領域F及びF'の少なくとも一方、又は領域FとF'の両方が少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含むいくつかの実施形態では、領域F及びF'の残りのヌクレオシドが、MOE及びLNA

からなる群から独立して選択される。領域 F 及び F' の少なくとも一方、又は領域 F と F' の両方が少なくとも 2 つの LNA ヌクレオシドを含むいくつかの実施形態では、領域 F 及び F' の残りのヌクレオシドが、MOE 及び LNA からなる群から独立して選択される。いくつかの混合ウイング実施形態では、領域 F 及び F' の一方又は両方が、1 つ又は複数の DNA ヌクレオシドをさらに含んでもよい。

【0112】

修飾ヌクレオシド間結合

「修飾ヌクレオシド間結合」という用語は、2 つのヌクレオシドを互いに共有結合する、ホスホジエステル (PO) 結合以外の結合として当業者に一般的に理解されるように定義される。したがって、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、1 つ又は複数のホスホロチオエートヌクレオシド間結合又は 1 つ又は複数のホスホロジチオエートヌクレオシド間結合などの、1 つ又は複数の修飾ヌクレオシド間結合を含むことができる。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増大させる。天然に存在するオリゴヌクレオチドでは、ヌクレオシド間結合は、隣接するヌクレオシド間のホスホジエステル結合を生成するリン酸基を含む。修飾ヌクレオシド間結合は、インビボ使用のためのオリゴヌクレオチドの安定化に特に有用であり、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチド中の DNA 又は RNA ヌクレオシドの領域、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域 G 内、並びに領域 F 及び F' などの修飾ヌクレオシドの領域におけるヌクレアーゼ切断から保護する役割を果たし得る。

【0113】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1 つ又は複数の修飾ヌクレオシド間結合が、例えばヌクレアーゼ攻撃に対してより耐性であるように、天然のホスホジエステルから修飾された 1 つ又は複数のヌクレオシド間結合を含む。ヌクレアーゼ耐性は、オリゴヌクレオチドを血清中でインキュベートすることによって、又はヌクレアーゼ耐性アッセイ (例えば、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ (SVPD)) を使用することによって決定することができ、これらの両方は当該技術分野でよく知られている。オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増強することができるヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合と呼ばれる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列の少なくとも 50 % のヌクレオシド間結合が修飾されており、例えばオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列の、少なくとも 60 %、例えば少なくとも 70 %、例えば少なくとも 75 %、例えば少なくとも 80 %、又は例えば少なくとも 90 % のヌクレオシド間結合が、修飾されている。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列のヌクレオシド間結合の全てが修飾されている。いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドを非ヌクレオチド官能基、例えばコンジュゲートに結合するヌクレオシドは、ホスホジエステルであり得ることが認識されるであろう。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列のヌクレオシド間結合は全て、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合である。

【0114】

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドでは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を用いることが有利である。

【0115】

ホスホロチオエートヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性、有益な薬物動態、及び製造の容易さに起因して、特に有用である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列の少なくとも 50 % のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートであり、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列の少なくとも 60 %、例えば少なくとも 70 %、例えば少なくとも 75 %、例えば少なくとも 80 % 又は例えば少なくとも 90 % のヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列のヌクレオシド間結合の全てが、ホスホロチオエートである。

【0116】

ホスホロチオエート (phosphorothioate) 結合などのヌクレアーゼ耐性結合は、標的核酸と二重鎖を形成するときにヌクレアーゼを動員することができるオリゴヌクレオチド領域、例えばギャップマーの領域 G において特に有用である。しかしながら、ホスホロチオエート結合は、非ヌクレアーゼ動員領域及び／又は親和性増強領域、例えばギャップマーの領域 F 及び F' においても有用であり得る。ギャップマーオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態では、領域 F 若しくは F'、又は領域 F 及び F' の両方に 1 つ又は複数のホスホジエステル結合を含んでもよく、領域 G のヌクレオシド間結合の全てはホスホロチオエートであり得る。

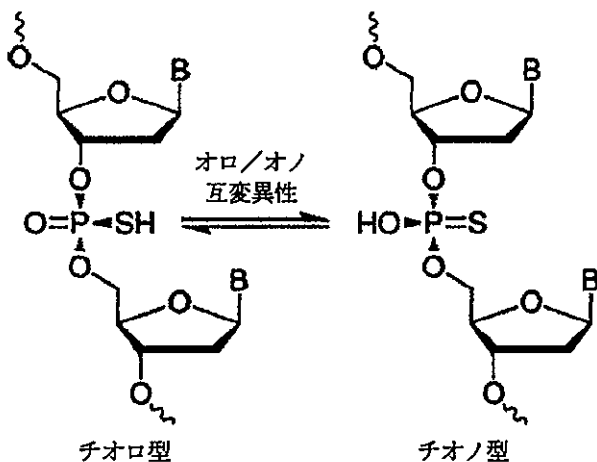
【0117】

有利には、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列の全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートであるか、又はオリゴヌクレオチドの全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。

【0118】

ホスホロチオエート結合は、例えば以下に示すように、種々の互変異性形態で存在し得る。

【化 3】



【0119】

欧州特許第 2 7 4 2 1 3 5 号に開示されているように、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、他のヌクレオシド間結合（ホスホジエステル及びホスホロチオエート以外の）、例えばアルキルホスホネート／メチルホスホネートヌクレオシド間結合を含んでもよいことが認識され、これは欧州特許第 2 7 4 2 1 3 5 号によれば、例えば別の DNA ホスホロチオエートのギャップ領域内で耐性であり得る。

【0120】

修飾ヌクレオシド

本明細書で用いられる「修飾ヌクレオシド」又は「ヌクレオシド修飾」という用語は、糖部分又は（核酸）塩基部分の 1 つ又は複数の修飾の導入によって、同等の DNA 又は RNA ヌクレオシドと比較して修飾されたヌクレオシドを指す。好ましい実施形態では、修飾ヌクレオシドは、修飾された糖部分を含む。修飾ヌクレオシドという用語はまた、「ヌクレオシド類似体」又は修飾「ユニット」又は修飾「モノマー」という用語と互換的に使用されてもよい。非修飾 DNA 又は RNA 糖部分を有するヌクレオシドは、本明細書では DNA 又は RNA ヌクレオシドと称される。DNA 又は RNA ヌクレオシドの塩基領域に修飾を有するヌクレオシドは、それらがワトソン・クリック塩基対合可能な場合には、依然として一般的に DNA 又は RNA と称される。

【0121】

修飾オリゴヌクレオチド

修飾オリゴヌクレオチドという用語は、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド及び／又は修飾ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを表す。「キメラ」オリゴヌクレオチドという用語は、修飾ヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを記述するために文献で使用されている用語である。本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、有利にはキメラオリゴヌクレオチドである。

【0122】

発現の調節

用語「発現の調節」は、本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドの投与前の標的の量と比較した場合の、標的（すなわちRTEL1又はFUBP1）の量を変更するオリゴヌクレオチドの能力の総称として理解されるべきである。あるいは、発現の調節は、対照実験を参照することによって決定され得る。対照は、生理食塩水組成物で処置された個体若しくは標的細胞、又は非標的化オリゴヌクレオチド（モック）で処置された個体若しくは標的細胞であると一般的に理解されている。

【0123】

調節の1つのタイプは、例えばmRNAの分解又は転写の遮断による、標的（すなわちRTEL1又はFUBP1）の発現を阻害、ダウンレギュレート、低減、抑制、除去、停止、遮断、防止、減少、低下、回避、又は終了するオリゴヌクレオチドの能力である。別のタイプの調節は、例えばスプライス部位の修復若しくはスプライシングの防止、又はマイクロRNA抑制などの阻害メカニズムの除去若しくは遮断による、標的の発現を回復、増加、又は増強するオリゴヌクレオチドの能力である。

【0124】

MOEギャップマー

MOEギャップマーは、領域F及びF'がMOEヌクレオシドからなるギャップマーである。いくつかの実施形態において、MOEギャップマーは、設計[MOE]₁₋₈-[領域G]-[MOE]₁₋₈、例えば[MOE]₂₋₇-[領域G]₅₋₁₆-[MOE]₂₋₇、例えば[MOE]₃₋₆-[領域G]-[MOE]₃₋₆のものであり、領域Gはギャップマーの定義に規定したとおりである。5-10-5設計(MOE-DNA-MOE)を有するMOEギャップマーは、当技術分野で広く使用されている。

【0125】

天然に存在するバリエーション

「天然に存在するバリエーション」という用語は、標的核酸と同じ遺伝子座に由来するが、例えば、同じアミノ酸をコードする多数のコドンを引き起こす遺伝コードの縮重のために、又はブレ mRNA の選択的スプライシング、又は多型、例えば単一ヌクレオチド多型(SNP)の存在に起因して異なり得る遺伝子又は転写産物（例えば、RTEL1又はFUBP1）のバリエーション、及び対立遺伝子バリエーションを指す。オリゴヌクレオチドに対する十分な相補的な配列の存在に基づいて、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、したがって、標的核酸及びその天然に存在するバリエーションを標的とし得る。

【0126】

いくつかの実施形態では、天然に存在するバリエーションは、哺乳動物RTEL1又はFUBP1標的核酸に対して、例えばRTEL1については配列番号1及び／又は2、又はFUBP1については配列番号247及び／又は251の標的核酸に対して、少なくとも95%、例えば少なくとも98%又は少なくとも99%の相同性を有する。いくつかの実施形態では、RTEL1の天然に存在するバリエーションは、配列番号1のヒトRTEL1標的核酸に対して少なくとも99%相同性を有する。いくつかの実施形態において、FUBP1の天然に存在するバリエーションは、配列番号247のヒトFUBP1標的核酸に対して少なくとも99%の相同性を有する。いくつかの実施形態では、天然に存在するバリエーションは、既知の多型である。

【0127】

ヌクレアーゼ媒介分解

ヌクレアーゼ媒介分解は、相補的なヌクレオチド配列と二重鎖を形成するときに、その

10

20

30

40

50

ような配列の分解を媒介することができるオリゴヌクレオチドを指す。

【0128】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的核酸のヌクレアーゼ媒介分解を介して機能し得、本発明の組み合わせ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RNA/DNAハイブリダイゼーションを認識し、RNA核酸の切断をもたらすエンドヌクレアーゼ（RNase Hなど）、好ましくはエンドリボヌクレアーゼ（RNase）を動員することができる。ヌクレアーゼ媒介機構を介して作用するオリゴヌクレオチド設計の例は、典型的には少なくとも5個又は6個の連続DNAヌクレオシドの領域を含み、親和性増強ヌクレオシド、例えばギャップマー、ヘッドマー及びテールマーが片側又は両側にフランキングするオリゴヌクレオチドである。

10

【0129】

核酸分子（又は「オリゴヌクレオチド」）

本明細書で使用される「核酸分子」又は「治療用核酸分子」又は「オリゴヌクレオチド」という用語は、それが当業者により、2つ以上の共有結合したヌクレオシド（すなわち、ヌクレオチド配列）を含む分子として一般的に理解されているように定義される。そのような共有結合ヌクレオシドはまた、核酸分子又はオリゴマーとも称することができ、これは互換的に使用することができる。

【0130】

本発明の組み合わせにおいて言及される核酸分子（複数可）は、一般に、50ヌクレオチド長未満の治療用オリゴヌクレオチドである。核酸分子は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、若しくはそれを含み得、又は例えばCRISPR RNA、siRNA、shRNA、アプタマー若しくはリボザイムなどの他のオリゴマー核酸分子であり得る。治療用核酸分子は、通常、固相化学合成と、その後の精製及び単離によって、研究室で作製される。しかしながら、shRNAは、多くの場合、レンチウイルスベクターを用いて細胞に送達され、次いで転写されて一本鎖RNAを生成し、これにより、RNA干渉機構（RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を含む）と相互作用することができるステムループ（ヘアピン）RNA構造を形成するであろう。核酸分子の配列に言及する場合、共有結合したヌクレオチド又はヌクレオシドの核酸塩基部分の配列若しくは順序、又はその修飾が参照される。本発明の組み合わせの核酸分子は、人工であり、化学的に合成され、典型的には精製又は単離される。いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせの核酸分子は標的細胞への侵入時にベクターから転写されるshRNAではない。本発明の組み合わせの核酸分子は、1つ又は複数の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含み得る。

20

30

【0131】

いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせの核酸分子は、12～60ヌクレオチド長、例えば13～50、例えば14～40、例えば15～30、例えば16～22、例えば16～18又は15～17の連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態では、12～25ヌクレオチドの長さを有し得る。あるいは、本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態では、15～22ヌクレオチドの長さを有し得る。

40

【0132】

いくつかの実施形態では、核酸分子又はその連続ヌクレオチド配列は、24個以下のヌクレオチド、例えば22個以下のヌクレオチド、例えば20個、例えば18個以下のヌクレオチド、例えば14個、15個、16個又は17個のヌクレオチドを含むか、又はそれらからなる。本明細書で提供されるいずれの範囲も、範囲の終点を含むことを理解すべきである。したがって、核酸分子が12～30ヌクレオチドを含むと記される場合、12ヌクレオチド及び30ヌクレオチドの両方が含まれる。

【0133】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、少なくとも10個、例えば11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、2

50

5、26、27、28、29又は30個の連続ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0134】

この核酸分子（複数可）は、哺乳動物における標的核酸の発現の調節用である。いくつかの実施形態では、siRNA、shRNA、及びアンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸分子は、典型的には、標的核酸（複数可）の発現を阻害するためのものである。

【0135】

本発明の一実施形態において、核酸分子は、RNAi剤、例えばsiRNA又はshRNAから選択される。別の実施形態では、核酸分子は、RNase Hと相互作用する高親和性修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド等の、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0136】

いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせの核酸分子は、例えば2'糖修飾ヌクレオシドなどの1つ又は複数の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含んでもよい。

【0137】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。

【0138】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、非ヌクレオシド部分（コンジュゲート部分）に結合され得る。

【0139】

核酸分子のライブラリは、バリエーション核酸分子の集合体として理解されるべきである。核酸分子のライブラリの目的は変化し得る。いくつかの実施形態では、核酸分子のライブラリは、オリゴヌクレオチドのライブラリ内で最も強力な配列を同定する目的で、1つ又は複数の哺乳動物標的核酸（すなわちRTEL1又はFUBP1）を標的とする重複する核酸塩基配列を有する核酸分子から構成される。いくつかの実施形態では、核酸分子のライブラリは、親核酸分子又は祖先核酸分子の核酸分子設計バリエーション（子核酸分子）のライブラリであり、核酸分子設計バリエーションは、親核酸分子のコア核酸塩基配列を保持する。

【0140】

核酸塩基

核酸塩基という用語は、ヌクレオシド及びヌクレオチドに存在するプリン（例えばアデニン及びグアニン）及びピリミジン（例えばウラシル、チミン及びシトシン）部分を含み、これら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。本発明の文脈において、核酸塩基という用語はまた、天然に存在する核酸塩基とは異なってもよいが、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。この文脈において、「核酸塩基」とは、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、及びヒポキサンチンなどの天然に存在する核酸塩基と、天然に存在しないバリエーションとの両方を指す。このようなバリエーションは、例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1に記載されている。

【0141】

いくつかの実施形態では、核酸塩基部分は、プリン又はピリミジンを修飾されたプリン又はピリミジン、例えば、置換されたプリン又は置換されたピリミジン、例えば、イソシトシン、シュドイソシトシン、5-メチルシトシン、5-チアゾローシトシン、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-チアゾローウラシル、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-ジアミノプリン及び2-クロロ-6-アミノプリ

10

20

30

40

50

ンから選択される核酸塩基 (n u c l e o b a s e d) に変えることにより修飾される。

【0142】

核酸塩基部分は、対応する各核酸塩基についての文字コード、例えば、A、T、G、C又はUにより示されてもよく、各文字は、任意に等価機能の改変された核酸塩基を含んでもよい。例えば、例示したオリゴヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分は、A、T、G、C、及び5-メチルシトシンから選択される。任意に、LNAギャップマーについて、5-メチルシトシンLNAヌクレオシドが使用され得る。

【0143】

ヌクレオチド及びヌクレオシド

ヌクレオチド及びヌクレオシドは、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの構成単位であり、本発明の目的のために、天然に存在するヌクレオチド及びヌクレオシドと、天然に存在しないヌクレオチド及びヌクレオシドとの両方を含む。本来、DNAヌクレオチド及びRNAヌクレオチドなどのヌクレオチドは、リボース糖部分、核酸塩基部分、及び1つ又は複数のリン酸基（ヌクレオシドには存在しない）を含む。ヌクレオシド及びヌクレオチドはまた、「単位」又は「モノマー」と互換的に称されてもよい。

【0144】

患者

本発明の目的について、「対象」（又は「患者」）は、脊椎動物であり得る。本発明に関連して、用語「対象」は、ヒト及び他の動物、特に哺乳動物と、他の生物との両方を含む。したがって、本明細書に提供される手段及び方法は、ヒト治療及び獣医学的用途の両方に適用可能である。したがって、本明細書では、対象は、マウス、ラット、ハムスタ、ウサギ、モルモット、フェレット、ネコ、イヌ、ニワトリ、ヒツジ、ウシ種、ウマ、ラクダ、又は霊長類などの動物であり得る。好ましくは、対象は、哺乳動物である。より好ましくは、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、患者は、HBV感染症等の本明細書で言及される疾患に罹患している。いくつかの実施形態では、患者は当該疾患にかかりやすい。

【0145】

医薬組成物

さらなる態様では、本発明は、本発明で使用するためのオリゴヌクレオチド、並びに、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、塩、及び／又はアジュバントを含む、医薬組成物を提供する。薬学的に許容され得る希釈剤には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれ、薬学的に許容され得る塩には、限定するものではないが、ナトリウム塩及びカリウム塩が含まれる。

【0146】

本発明は、本発明に有用なオリゴヌクレオチドと、水性希釈剤又は溶媒とを含む本発明による医薬組成物を提供する。

【0147】

本発明は、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドのリン酸緩衝生理食塩水などの溶液を提供する。適切には、本発明のリン酸緩衝生理食塩水等の溶液は滅菌溶液である。

【0148】

国際公開第2007／031091号は、薬学的に許容され得る希釈剤、担体及びアジュバントの適切で好ましい例を提供している（参照により本明細書に組み込まれる）。適切な用量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤もまた、国際公開第2007／031091号に提供されている。

【0149】

本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドは、医薬組成物又は製剤の調製のために、薬学的に許容され得る活性又は不活性物質と混合することができる。医薬組成物の調製のための組成物及び方法は、限定されるものではないが、投与経路、疾患の程度、又は投与される用量を含む多くの基準に依存する。

【0150】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、本発明において有用なオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートはプロドラッグである。特に、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関して、オリゴヌクレオチドのコンジュゲート部分は、プロドラッグが作用部位、例えば標的細胞に送達されると切断される。

【0151】

薬学的に許容され得る塩

用語「薬学的に許容され得る塩」は、生物学的に又はそれ以外の点で望ましくないものではない、遊離塩基又は遊離酸の生物学的な有効性及び特性を保持する塩を指す。塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸、特に塩酸、並びに、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ビルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、N-アセチルシステインなどの有機酸と共に形成される。加えて、これらの塩は、無機塩基又は有機塩基を遊離酸に加えることにより調製され得る。無機塩基から誘導される塩には、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウムの塩が含まれるがこれらに限定されない。有機塩基から誘導される塩には、第一級、第二級、及び第三級アミン、天然に存在する置換アミンを含む置換アミン、環式アミン及び塩基性イオン交換樹脂、例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、リジン、アルギニン、N-エチルピペリジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂の塩が含まれるが、これらに限定されない。式(I)の化合物は、双性イオンの形態で存在することもできる。特に好ましくは、式(I)の化合物の薬学的に許容され得る塩は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、及びメタンスルホン酸の塩である。

10

20

【0152】

予防

本明細書において、用語「予防すること」、「予防」、又は「予防する」とは、予防的処置、すなわち、その目的が疾患を治癒することよりむしろ予防することである、測定又は手段に関する。予防とは、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果が、疾患又はその症状を完全に又は部分的に予防するという観点から、予防的に得られることを意味する。したがって、本明細書における「HBV感染予防」とは、対象におけるHBV感染の発生を予防すること、及びHBV感染の症状の発生を予防することを含む。本発明では、特に、HBVに感染した母親からの小児におけるHBV感染の予防が企図される。また、急性HBV感染が慢性HBV感染に変化することを防ぐことも企図される。

30

【0153】

オリゴヌクレオチドにおける領域D'又はD''

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態では、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列、例えばギャップマーF-G-F'、並びにさらに5'及び／又は3'ヌクレオシドを含むか、又はそれからなり得る。さらなる5'及び／又は3'ヌクレオシドは、標的核酸に対して完全に相補的であっても、完全に相補的でなくてもよい。このようなさらなる5'及び／又は3'ヌクレオシドは、本明細書では領域D'及びD''と称され得る。

40

【0154】

領域D'又はD''の付加は、連続ヌクレオチド配列、例えばギャップマーをコンジュゲート部分又は別の官能基に連結する目的のために使用され得る。連結に用いられる場合、コンジュゲート部分を有する連続ヌクレオチド配列は、生体切断可能なリンカーとしての役割を果たし得る。あるいは、それはエキソヌクレアーゼ保護を提供するために、若しくは合成又は製造を容易にするために使用されてもよい。

【0155】

領域D'及びD''は、それぞれ、領域Fの5'末端又は領域F'の3'末端に結合して、以下の式D'-F-G-F'、F-G-F'-D''又はD'-F-G-F'-D''の設計を生成することができる。この場合、F-G-F'はオリゴヌクレオチドのギャップマー部分であり

50

、領域 D' 又は D'' は、オリゴヌクレオチドの別個の部分構成する。

【0156】

領域 D' 又は D'' は、独立して、1、2、3、4又は5個の追加のヌクレオチドを含むか、又はそれからなり、標的核酸に対して相補的であっても、相補的でなくてもよい。F又はF'領域に隣接するヌクレオチドは、DNA又はRNAなどの糖修飾ヌクレオチドではなく、若しくはこれらの塩基修飾バージョンでもない。D'又はD'領域は、ヌクレアーゼ感受性の生体切断可能なリンカーとしての役割を果たし得る（リンカーの定義を参照されたい）。いくつかの実施形態では、追加の5'及び／又は3'末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で結合されており、DNA又はRNAである。領域 D' 又は D'' としての使用に好適なヌクレオチドベースの生体切断可能なリンカーは、国際公開第2014/076195号に開示されており、これには例としてホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドが含まれる。ポリオリゴヌクレオチド構築物における生体切断可能なリンカーの使用は国際公開第WO2015/113922号に開示されており、それらは複数のアンチセンス構築物（例えば、ギャップマー領域）を単一のオリゴヌクレオチド内で結合するのに使用されている。

10

【0157】

一実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、ギャップマーを構成する連続ヌクレオチド配列に加えて、領域 D' 及び／又は D'' を含む。

【0158】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、以下の式によって表すことができる：

20

$F - G - F'$; 特に $F_1 - 8 - G_{5-16} - F'_{2-8}$

$D' - F - G - F'$, 特に $D'_1 - 3 - F_{1-8} - G_{5-16} - F'_{2-8}$

$F - G - F' - D''$, 特に $F_{1-8} - G_{5-16} - F'_{2-8} - D''_{1-3}$

$D' - F - G - F' - D''$, 特に $D'_1 - 3 - F_{1-8} - G_{5-16} - F'_{2-8} - D''_{1-3}$

【0159】

いくつかの実施形態では、領域 D' と領域 F との間に位置するヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態では、領域 F' と領域 D'' との間に位置するヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合である。

【0160】

30

RNAi 分子

本明細書では、用語「RNA干渉（RNAi）分子」とは、細胞の細胞質中のRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）を介してRNA依存性遺伝子サイレンシングを誘導することができる短い二本鎖RNAベースのオリゴヌクレオチドであって、触媒RISC成分アルゴノートと相互作用するものを指す。RNAi分子は、細胞、例えば哺乳動物対象などの対象内の細胞における標的核酸の発現を調節、例えば阻害する。RNAi分子の1つのタイプは低分子干渉RNA（small interfering RNA: siRNA）であり、これは、2つの相補的オリゴヌクレオチドから構成される二本鎖RNA分子であり、転写後に一方の鎖が相補的mRNAに結合すると、その分解及び翻訳の喪失が生じる。小ヘアピンRNA（small hairpin RNA: shRNA）はステムループ（ヘアピン）構造を形成する一本鎖RNAベースオリゴヌクレオチドであり、これはDICER及びRNA減少サイレンシング複合体（RISC）を介してmRNAを減少させることができる。RNAi分子は、目的の遺伝子（標的核酸）の配列に基づいて設計することができる。次いで、対応するRNAiは、化学的に若しくはin vitro転写によって合成され得るか、又はベクター若しくはPCR産物から発現され得る。

40

【0161】

RNase Hの活性及び動員

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RNA分子との二重鎖にあるときにRNase Hを動員する能力を指す。国際公開第01/23613号は、RNase H活性を決定するインビトロ方法を提供し、これはRNase Hを動

50

員する能力の決定に使用され得る。典型的には、オリゴヌクレオチドが、相補的標的核酸配列が提供された場合に、試験されている修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、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DNAモノマーのみを含有するオリゴヌクレオチドを使用し、国際公開第01/23613号（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例91～95により提供される方法論を使用したときに決定された初期速度の少なくとも5%、例えば、少なくとも10%又は20%超の pmol/l/分 で測定された初期速度を有する場合に、このオリゴヌクレオチドはRNase Hを動員することができると見なされる。RNase H活性の決定での使用について、組換えヒトRNase H1は、Creative Biomart（登録商標）（大腸菌で発現したHisタグと融合した組換えヒトRNase H1）から入手できる。

10

【0162】

s h RNA

短ヘアピンRNA又はshRNA分子は、一般に40～70ヌクレオチド長、例えば45～65ヌクレオチド長、例えば50～60ヌクレオチド長であり、ステムループ（ヘアピン）RNA構造を形成し、これは、特徴的な2塩基3'オーバーハングを有する19～23塩基対の短干渉RNAにdsRNAをプロセッシングすると考えられるDicerとして既知のエンドヌクレアーゼと相互作用し、次いでRNA誘導サイレンシング複合体（RNA-induced silencing complex: RISC）に組み込まれる。適切な標的mRNAに結合すると、RISC内の1つ又は複数のエンドヌクレアーゼが標的を切断して、サイレンシングを誘導する。RNAiオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド間結合及び2'糖修飾ヌクレオシド、例えば2'-4'二環式リボース修飾ヌクレオシド（LNA及びcET又は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-DNA、アラビノ核酸（ANA）、2'-フルオロ-ANAのような2'置換修飾を含む）を用いて化学的に修飾されてもよい。

20

【0163】

いくつかの実施形態では、shRNA核酸分子は、1つ又は複数のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。RNAi分子において、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合は、RISCにおけるヌクレアーゼ切断を減少し得るため、したがってshRNA分子のステムループにおける全てのヌクレオシド間結合が修飾されはしないことが有利である。ホスホロチオエートヌクレオシド間結合は、shRNA分子のステムループの3'及び/又は5'末端、特に標的核酸に相補的ではない分子の部分（例えば、siRNA分子のセンス鎖又はパッセンジャー鎖）に配置されることが有利であり得る。標的核酸に対して相補的なshRNA分子の領域は、しかしながら、Dicerによる切断後に3'末端及び/又は5'末端になると予測される部分における最初の2～3個のヌクレオシド間結合でもまた修飾され得る。

30

【0164】

s i RNA

用語「siRNA」とは、低分子干渉リボ核酸RNAi分子を指す。それは、二本鎖RNA分子の一種であり、当該技術分野においては、短鎖干渉RNA又はサイレンシングRNAとしても知られている。siRNAは典型的には、（パッセンジャー鎖とも呼ばれる）センス鎖、及び（ガイド鎖とも呼ばれる）アンチセンス鎖を含み、各鎖は17～30ヌクレオチド長、典型的には19～25ヌクレオシド長であり、アンチセンス鎖は、標的核酸（適切には成熟mRNA配列）に対して相補的、例えば少なくとも95%相補的であり、例えば完全に相補的であり、センス鎖はアンチセンス鎖に相補的であるために、センス鎖とアンチセンス鎖はデュプレックス又はデュプレックス領域を形成する。siRNA鎖は、平滑末端二重鎖を形成し得るか、又は有利には、センス鎖及びアンチセンス鎖3'末端は、例えば、1、2、又は3ヌクレオシドの3'オーバーハングを形成することがあり、これは、インビボでRISC基質を形成するDicerによって生成される生成物に類

40

50

似する。Dicer基質の有効な拡張形態は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,349,809号及び米国特許第8,513,207号に記載されている。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方は、2nt3'オーバーハングを有する。したがって、二重鎖領域は、例えば17~25ヌクレオチド長、例えば21~23ヌクレオチド長であり得る。

【0165】

一旦細胞内に入ると、アンチセンス鎖は、標的核酸の標的分解又は標的阻害を媒介するRISC複合体に組み込まれる。siRNAは、典型的には、RNAヌクレオシドに加えて修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態では、siRNA分子はまた、修飾ヌクレオチド間結合及び2'糖修飾ヌクレオシド、例えば2'-4'二環式リボース修飾ヌクレオシド (LNA及びcET又は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-DNA、アラビノ核酸 (ANA)、2'-フルオロ-ANAのような2'置換修飾を含む)を用いて化学的に修飾されてもよい。特に、2'フルオロ、2'-O-メチル、又は2'-O-メトキシエチルをsiRNAに組み込むことができる。

【0166】

いくつかの実施形態では、siRNAセンス (パッセンジャー) 鎖のヌクレオチドの全ては、LNAなどの2'糖修飾ヌクレオシドで修飾され得る (例えば、国際公開第2004/083430号、同第2007/085485号を参照されたい)。いくつかの実施形態では、siRNAのパッセンジャー鎖は不連続であり得る (例えば、国際公開第2007/107162号を参照されたい)。siRNAのアンチセンス鎖のシード領域で生じる熱不安定化ヌクレオチドの取込みは、siRNAのオフターゲット活性の減少に有用であることが報告されている (例えば、国際公開第2018/098328号を参照されたい)。適切には、siRNAは、アンチセンス鎖の5'末端に5'リン酸基又は5'リン酸模倣物を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端は、RNAヌクレオシドである。

【0167】

一実施形態では、siRNA分子は、少なくとも1つのホスホロチオエート又はメチルホスホネートのヌクレオシド間結合をさらに含む。ホスホロチオエート (phosphorothioate) 若しくはメチルホスホネートのヌクレオシド間結合は一方若しくは両方の鎖の3'末端にあり得る (例えば、アンチセンス鎖又はセンス鎖) か、又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネートのヌクレオシド間結合は一方若しくは両方の鎖の5'末端にあり得る (例えば、アンチセンス鎖又はセンス鎖) か、又はホスホロチオエート若しくはメチルホスホネートのヌクレオシド間結合は一方又は両方の鎖の5'末端及び3'末端の両方にあり得る (例えば、アンチセンス鎖又はセンス鎖)。いくつかの実施形態では、残りのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合である。いくつかの実施形態では、siRNA分子は、1つ又は複数のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。siRNA分子において、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合はRISCにおけるヌクレアーゼ切断を減少し得るため、したがって、アンチセンス鎖における全てのヌクレオシド間結合が修飾されはしないことが有利である。

【0168】

siRNA分子は、リガンドをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、リガンドは、センス鎖の3'末端にコンジュゲートされる。

【0169】

生物学的分布については、siRNAを標的リガンドにコンジュゲートさせるか、及び/又は例えば、脂質ナノ粒子に製剤化することができる。

【0170】

本発明の他の態様は、治療的使用に適したsiRNA分子などのこれらのdsRNAを含む医薬組成物と、例えば本明細書に開示されている種々の疾患症状の処置のために、本発明の組み合わせのsiRNAなどのdsRNA分子を投与することによって標的遺伝子

の発現を減少させる方法と、に関する。

【0171】

糖修飾

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、修飾された糖部分、すなわち、DNA及びRNAに見られるリボース糖部分と比較した場合の糖部分の修飾を有する1つ又は複数のヌクレオシドを含み得る。

【0172】

リボース糖部分の修飾を有する数多くのヌクレオシドは、親和性及び／又はヌクレアーゼ耐性などのオリゴヌクレオチドのある特定の性質を改善することを主な目的として作製されてきた。

【0173】

そのような修飾には、例えば、ヘキソース環（HNA）又は二環式環（典型的には、リボース環（LNA）のC2とC4炭素の間にピラジカル架橋を有する）、又は典型的にはC2とC3炭素の間の結合を欠く非結合リボース環（例えば、UNA）で置き換えることにより、リボース環構造が修飾されているものが含まれる。他の糖修飾ヌクレオシドには、例えばビシクロヘキソース核酸（国際公開第2011/017521号）又は三環式核酸（国際公開第2013/154798号）が含まれる。修飾ヌクレオシドにはまた、糖部分が例えばペプチド核酸（PNA）又はモルホリノ核酸の場合には非糖部分で置き換えられているヌクレオシドが含まれる。

【0174】

糖修飾にはまた、リボース環上の置換基を、水素以外の基、又はDNA及びRNAヌクレオシド中に天然に存在する2'-OH基に変更することによってなされる修飾も含まれる。置換基は、例えば2'、3'、4'又は5'位で導入され得る。

【0175】

標的細胞

本明細書で使用される用語「標的細胞」は、標的核酸を発現している細胞を指す。本発明の治療的使用のためには、標的細胞がHBVに感染している場合が有利である。いくつかの実施形態では、標的細胞は、インビボ又はインビトロであり得る。いくつかの実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞、例えばげっ歯類細胞、例えばマウス細胞若しくはラット細胞、若しくはウッドチャック細胞、又は霊長類細胞、例えばサル細胞（例えば、カニクイザル細胞）若しくはヒト細胞である。

【0176】

好ましい実施形態では、標的細胞は、プレmRNA又は成熟mRNAなどのRTEL1及び／又はFUBP1のmRNAを発現する。好ましくは、標的細胞は、RTEL1及びFUBP1のmRNA、例えばプレmRNA又は成熟mRNAの両方を発現する。RTEL1及び／又はFUBP1のmRNAのポリAテールは、典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化では考慮されない。

【0177】

典型的には、標的細胞は、RTEL1プレmRNA又はRTEL1成熟mRNA等のRTEL1 mRNAを発現する。実験評価のために、ヒトRTEL1プレmRNA、例えば配列番号1等の標的配列を含む核酸を発現する標的細胞を使用してもよい。RTEL1 mRNAのポリAテールは、典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化では考慮されない。

【0178】

本発明の組み合わせは、典型的には、例えばインビボ又はインビトロのいずれかで、RTEL1標的核酸を発現している細胞（標的細胞）におけるRTEL1標的核酸の発現を阻害することができる。

【0179】

典型的には、標的細胞は、FUBP1プレmRNA又はFUBP1成熟mRNAなどのFUBP1 mRNAも発現する。例えば、標的細胞は、ヒトFUBP1プレmRNA、

10

20

30

40

50

例えば配列番号 247、又は配列番号 249 若しくは 250 などのエクソン 14 を含むヒト FUBP1 成熟 mRNA、又は配列番号 247 のエクソン 20 を発現する。実験的評価のために、標的配列を含む核酸を発現する標的細胞が使用され得る。FUBP1 mRNA のポリ A テールは、典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化では考慮されない。本発明の組み合わせは、典型的には、例えばインビボ又はインビトロのいずれかで、FUBP1 標的核酸を発現している標的細胞における FUBP1 標的核酸の発現を阻害することができる。

【0180】

さらに、標的細胞は肝細胞であってもよい。一実施形態では、標的細胞は、HBV に感染した初代ヒト肝細胞であり、HBV 感染個体に由来するか、又はヒト化肝臓を有する HBV に感染したマウス（Phoenix Bio、PXB マウス）に由来するかのいずれかである。

10

【0181】

本発明によれば、標的細胞は、HBV に感染していてもよい。さらに、標的細胞は、HBV cccDNA を含み得る。したがって、標的細胞は、プレ mRNA 又は成熟 mRNA などの RTE L 1 及び／又は FUBP1 の mRNA 及び HBV cccDNA を含むことが好ましい。より好ましくは、標的細胞は、RTE L 1 及び FUBP1 の両方の mRNA、例えばプレ mRNA 又は成熟 mRNA、及び HBV cccDNA を含む。

【0182】

RTE L 1 標的核酸

20

本発明によれば、標的核酸は、哺乳動物 RTE L 1 をコードする核酸であり、例えば遺伝子、RNA、mRNA、及びプレ mRNA、成熟 mRNA 又は cDNA 配列であり得る。したがって、標的は、RTE L 1 標的核酸と呼ばれ得る。

【0183】

本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドは、例えば、哺乳動物 RTE L 1 のエクソン領域（特に、siRNA 及び shRNA の標的エクソン領域だけでなく、アンチセンスオリゴヌクレオチド）を標的とすることができるか、又は例えば、RTE L 1 プレ mRNA のイントロン領域を標的とすることができる（特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドはイントロン領域を標的とする）。ヒト RTE L 1 遺伝子は、タンパク質をコードするこれらの 7 つの転写物のうち 15 の転写物をコードし、したがって、潜在的な核酸標的である。

30

【0184】

表 1 は、配列番号 1 のヒト RTE L 1 プレ mRNA 上に位置する 7 つの転写物の予測されるエクソン及びイントロン領域を列挙する。本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドは、表 1 に列挙された転写物の 1 つ又は複数の成熟 mRNA 配列を標的とすることができることが理解されよう。

40

50

【表 1 - 1】

表 1. RTEL1 mRNA 転写物をコードする種々のタンパク質に対する、ヒト RTEL1 プレ mRNA (配列番号 1) 中の転写、エクソン、及びイントロン領域

転写物 ID	転写領域		エクソン領域			イントロン領域		
	開始	終了	エクソン	開始	終了	イントロン	開始	終了
RTEL1-205 ENST000000370018	1	38444	1	1	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4737
			5	4737	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37671	34	37671	37969

10

20

30

40

50

【表 1－2】

転写物 ID	転写領域		エクソン領域			イントロン領域		
	開始	終了	エクソン	開始	終了	イントロン	開始	終了
RTEL1-203 ENST000000360203			35	37969	38444			
	485	38433	1	485	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4737
			5	4737	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37841	34	37841	37969
			35	37969	38433			

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

転写物ID	転写領域		エクソン領域			イントロン領域		
	開始	終了	エクソン	開始	終了	イントロン	開始	終了
RTEL1-212 ENST000000508582	482	38171	1	482	657	1	657	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041
			4	4041	4134	4	4134	4665
			5	4665	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284	10	16284	20336
			11	20336	20374	11	20374	20459
			12	20459	20537	12	20537	22040
			13	22040	22137	13	22137	22855
			14	22855	22910	14	22910	27714
			15	27714	27788	15	27788	27982
			16	27982	28063	16	28063	29829
			17	29829	29961	17	29961	30128
			18	30128	30241	18	30241	30330
			19	30330	30370	19	30370	30492
			20	30492	30577	20	30577	30719
			21	30719	30796	21	30796	31246
			22	31246	31323	22	31323	31693
			23	31693	31839	23	31839	31941
			24	31941	32056	24	32056	32278
			25	32278	32401	25	32401	32485
			26	32485	32632	26	32632	32996
			27	32996	33138	27	33138	33933
			28	33933	34028	28	34028	34996
			29	34996	35194	29	35194	35334
			30	35334	35474	30	35474	36563
			31	36563	36679	31	36679	36932
			32	36932	37165	32	37165	37257
			33	37257	37412	33	37412	37519
			34	37519	37671	34	37671	37969
			35	37969	38171			
RTEL1-201	505	38434	1	505	650	1	650	3489

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

転写物ID	転写領域		エクソン領域			イントロン領域		
	開始	終了	エクソン	開始	終了	イントロン	開始	終了
ENST000000318100			2	3489	3687	2	3687	4041
			3	4041	4134	3	4134	4737
			4	4737	4818	4	4818	5020
			5	5020	5080	5	5080	8195
			6	8195	8270	6	8270	9660
			7	9660	9744	7	9744	14747
			8	14747	14812	8	14812	16131
			9	16131	16284	9	16284	20336
			10	20336	20374	10	20374	20459
			11	20459	20537	11	20537	22040
			12	22040	22137	12	22137	22855
			13	22855	22910	13	22910	27714
			14	27714	27788	14	27788	27982
			15	27982	28063	15	28063	29829
			16	29829	29961	16	29961	30128
			17	30128	30241	17	30241	30330
			18	30330	30370	18	30370	30492
			19	30492	30577	19	30577	30719
			20	30719	30796	20	30796	31246
			21	31246	31323	21	31323	31693
			22	31693	31839	22	31839	31941
			23	31941	32056	23	32056	32278
			24	32278	32401	24	32401	32485
			25	32485	32632	25	32632	32996
			26	32996	33138	26	33138	33933
			27	33933	34028	27	34028	34996
			28	34996	35194	28	35194	35334
			29	35334	35474	29	35474	36563
			30	36563	36679	30	36679	36932
			31	36932	37165	31	37165	37257
			32	37257	37412	32	37412	37519
			33	37519	37671	33	37671	37969
			34	37969	38434			
RTEL1-202	551	16284	1	551	650	1	650	1424
ENST000000356810			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3687	3	3687	4041

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

転写物ID	転写領域		エクソン領域			イントロン領域		
	開始	終了	エクソン	開始	終了	イントロン	開始	終了
			4	4041	4134	4	4134	4587
			5	4587	4818	5	4818	5020
			6	5020	5080	6	5080	8195
			7	8195	8270	7	8270	9660
			8	9660	9744	8	9744	14747
			9	14747	14812	9	14812	16131
			10	16131	16284			
RTEL1-206 ENST00000425905	30530	33067	1	30530	30577	1	30577	30719
			2	30719	30796	2	30796	31246
			3	31246	31323	3	31323	31941
			4	31941	32056	4	32056	32278
			5	32278	32401	5	32401	32485
			6	32485	32632	6	32632	32996
			7	32996	33067			
RTEL1-214 ENST00000646389	811	3653	1	811	943	1	943	1424
			2	1424	1695	2	1695	3489
			3	3489	3653			

10

20

【0185】

適切には、標的核酸は、RTEL1タンパク質、特に哺乳動物RTEL1、例えばヒトRTEL1をコードする（例えば、表2及び表3を参照されたい）。これは、ヒト及びサルRTEL1についてのプレmRNA配列を提供する。

30

【0186】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号1及び／若しくは2、又はそれらの天然に存在するバリエーション（例えば、表1の哺乳動物RTEL1タンパク質をコードする配列）から選択される。

【0187】

本発明の組み合わせを研究又は診断に使用する場合、標的核酸は、cDNA、又はDNA若しくはRNAに由来する合成核酸であり得る。

【0188】

インビボ又はインビトロでの適用のために、本発明の組み合わせは、典型的には、RTEL1標的核酸を発現している細胞内のRTEL1標的核酸の発現を阻害することができる。本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドの核酸塩基の連続配列は、典型的には、オリゴヌクレオチドの長さによって測定して、任意に、1つ又は2つのミスマッチを除いて、また任意に、オリゴヌクレオチドをコンジュゲートなどの任意の官能基に結合し得るヌクレオチドベースのリンカー領域、又は他の非相補的末端ヌクレオチド（例えば、領域D'又はD''）を除いて、RTEL1標的核酸に相補的である。標的核酸は、いくつかの実施形態では、成熟mRNA（例えば、表1に列挙した転写物のエクソン領域）又はプレmRNAなどのメッセンジャーRNAといったRNA又はDNAであり得る。

40

【0189】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、ヒトRTEL1などの哺乳動物RTEL1タンパク質をコードするRNA又はDNA、例えば、配列番号1として開示されているような

50

ヒト R T E L 1 mRNA 配列である。例示的な標的核酸に関するさらなる情報は、表 2 及び表 3 に提供される。

【表 2】

表 2. 種にわたる R T E L 1 に関するゲノム及びアセンブリ情報

種	染色体	鎖	ゲノム座標		アセンブリ	ensembl gene_id
			開始	終了		
ヒト	20	fwd	63657810	63696253	GRCh38. p12	ENSG00000258366
カニクイザル	10	fwd	95853726	95890939	Macaca_fascicularis_5.0	ENSMFAG00000043680

10

Fwd = フォワード鎖。ゲノム座標は、プレ mRNA 配列 (ゲノム配列) を提供する。NCBI 参照は、mRNA 配列 (cDNA 配列) を提供する。

【表 3】

表 3. 種にわたる R T E L 1 についての配列の詳細。

種	RNA 型	長さ (nt)	配列番号
ヒト	pre mRNA	38444	1
サル	pre mRNA	37214	2

20

注記 配列番号 2 は、配列決定が配列を正確に精製することができず、したがって縮重配列が含まれる、複数の NNNN の領域を含む。疑いを避けるため、本発明で使用するための化合物は実際の標的配列に対して相補的であり、したがって、縮重化合物ではない。

【0190】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号 1 である。

【0191】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号 2 である。

【0192】

F U B P 1 標的核酸

本発明によれば、標的核酸は、哺乳動物 F U B P 1 をコードする核酸であり、例えば遺伝子、RNA、mRNA、及びプレ mRNA、成熟 mRNA 又は cDNA 配列であり得る。したがって、標的は、F U B P 1 標的核酸と称することができる。

30

【0193】

適切には、標的核酸は、F U B P 1 タンパク質、特に、本明細書で配列番号 247、249 及び／又は 250 として提供されるプレ mRNA 又は mRNA 配列をコードするヒト F U B P 1 遺伝子などの哺乳動物 F U B P 1 をコードする。配列番号 247 は、ヒト F U B P 1 プレ mRNA の配列である。配列番号 249 及び 250 は、ヒト F U B P 1 mRNA の配列である。

【0194】

本発明の組み合わせの核酸分子は、例えば、哺乳動物 F U B P 1 のエクソン領域 (特に、siRNA 及び shRNA であるが、アンチセンスオリゴヌクレオチドでもある) を標的とすることができるか、又は例えば、F U B P 1 プレ mRNA (特に、アンチセンスオリゴヌクレオチド) の任意のイントロン領域を標的とすることができる。表 4 は、配列番号 247 の予測エクソン及びイントロン領域を列挙する。

40

【表 4】

表 4. ヒト F U B P 1 プレ m R N A 中のエクソン及びイントロン領域。

ヒト F U B P 1 プレ m R N A の エクソン領域 (配列番号 2 4 7)			ヒト F U B P 1 プレ m R N A の イントロン領域 (配列番号 2 4 7)		
I D	開始	終了	I D	開始	終了
E 1	1 9	2 2 6	I 1	2 2 7	9 0 9 5
E 2	9 0 9 6	9 1 8 6	I 2	9 1 8 7	1 0 9 0 7
E 3	1 0 9 0 8	1 0 9 4 6	I 3	1 0 9 4 7	1 1 4 4 4
E 4	1 1 4 4 5	1 1 4 8 4	I 4	1 1 4 8 5	1 2 0 0 9
E 5	1 2 0 1 0	1 2 0 6 2	I 5	1 2 0 6 3	1 2 1 5 5
E 6	1 2 1 5 6	1 2 2 2 7	I 6	1 2 2 2 8	1 2 3 5 9
E 7	1 2 3 6 0	1 2 4 1 7	I 7	1 2 4 1 8	1 3 8 7 9
E 8	1 3 8 8 0	1 4 0 4 2	I 8	1 4 0 4 3	1 4 1 4 2
E 9	1 4 1 4 3	1 4 2 4 1	I 9	1 4 2 4 2	1 4 3 6 3
E 1 0	1 4 3 6 4	1 4 4 6 5	I 1 0	1 4 4 6 6	1 4 7 5 4
E 1 1	1 4 7 5 5	1 4 8 5 7	I 1 1	1 4 8 5 8	1 4 9 4 8
E 1 2	1 4 9 4 9	1 5 0 4 9	I 1 2	1 5 0 5 0	1 5 3 9 5
E 1 3	1 5 3 9 6	1 5 5 3 7	I 1 3	1 5 5 3 8	1 6 1 8 0
E 1 4	1 6 1 8 1	1 6 3 4 1	I 1 4	1 6 3 4 2	1 8 6 1 5
E 1 5	1 8 6 1 6	1 8 7 6 7	I 1 5	1 8 7 6 8	1 8 8 4 7
E 1 6	1 8 8 4 8	1 8 9 2 7	I 1 6	1 8 9 2 8	2 2 4 1 0
E 1 7	2 2 4 1 1	2 2 5 3 9	I 1 7	2 2 5 4 0	2 3 7 8 1
E 1 8	2 3 7 8 2	2 3 8 5 6	I 1 8	2 3 8 5 7	2 9 8 1 0
E 1 9	2 9 8 1 1	2 9 9 5 6	I 1 9	2 9 9 5 7	3 0 1 9 6
E 2 0	3 0 1 9 7	3 0 7 0 6			

【0 1 9 5】

適切には、標的核酸は、ヒト、サル及びマウスの F U B P 1 のゲノム配列、成熟 m R N A 及びプレ m R N A 配列を提供する、F U B P 1 タンパク質、特に哺乳動物 F U B P 1、例えばヒト F U B P 1（例えば、表 5 及び 6 を参照）をコードする。

【0 1 9 6】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、カニクイザルの F U B P 1 核酸、例えば m R N A 又はプレ m R N A であり得る。

【0 1 9 7】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、マウスの F U B P 1 核酸、例えば m R N A 又はプレ m R N A であり得る。

【0 1 9 8】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号 2 4 7、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 7、2 5 8、2 5 9、2 6 0、2 6 1、2 6 2、2 6 3、2 6 4、2 6 5、及び／若しくは 2 6 6、又はそれらの天然に存在するバリエーション（例えば、哺乳動物 F U B P 1 をコードする配列）からなる群より選択

10

20

30

40

50

される。

【0199】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号247、251及び／若しくは255、又はそれらの天然に存在するバリエーション（例えば、哺乳動物FUBP1をコードする配列）からなる群より選択される。

【0200】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号247及び251、又はそれらの天然に存在するバリエーション（例えば、哺乳動物FUBP1をコードする配列）からなる群より選択される。

【0201】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号247～254、又はそれらの天然に存在するバリエーション（例えば、哺乳動物FUBP1をコードする配列）からなる群より選択される。

【0202】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、ヒトFUBP1などの哺乳動物FUBP1タンパク質をコードするRNA又はDNA、例えば、配列番号247として開示されているようなヒトFUBP1 mRNA配列である。例示的な標的核酸に関するさらなる情報は、表5及び表6に提供される。

【表5】

表5. 種にわたるFUBP1に関するゲノム及びアセンブリ情報

種	染色体	鎖	ゲノム座標		アセンブリ	ensembl gene_id
			開始	終了		
ヒト	1	Rv	77944055	77979110	GRCh38. p10	ENSG 00000162613
カニクイ ザル	1	Fwd	149243675	149283374	Macaca_fascicularis _5. 0	ENSMFAG 00000031825
マウス	3	Fwd	152210422	152236826	GRCh38. p5	ENSMUSG 00000028034

Fwd=フォワード鎖。Rv=リバース鎖。ゲノム座標は、プレmRNA配列（ゲノム配列）を提供する。

【0203】

本発明で使用するために核酸分子を研究又は診断に使用する場合、標的核酸は、cDNA、又はDNA若しくはRNAに由来する合成核酸であり得る。

【0204】

インビボ又はインビトロ用途に関して、治療用核酸分子は、典型的には、FUBP1標的核酸を発現する細胞内で、FUBP1標的核酸の発現を阻害することが可能である。核酸分子の核酸塩基の連続配列は、典型的には、オリゴヌクレオチドの長さによって測定して、任意に1つ又は2つのミスマッチを除いて、また任意にオリゴヌクレオチドをコンジュゲートなどの任意の官能基に結合し得るヌクレオチドベースのリンカー領域、又は他の非相補的末端ヌクレオチドを除いて、FUBP1標的核酸の保存された領域に対して相補的である。

【0205】

標的核酸は、ヒトFUBP1などの哺乳動物FUBP1タンパク質、例えば配列番号247として開示されているものなどのヒトFUBP1プレmRNA配列、配列番号251として開示されているものなどのカニクイザルFUBP1プレmRNA配列、又は配列番号255として開示されているものなどのマウスFUBP1プレmRNA配列、又は配列番号248、249及び250として開示されているヒト成熟mRNAなどの成熟FUBP1 mRNAをコードするプレmRNAなどのメッセンジャーRNAであり得る。配列番号247～266はDNA配列である。標的RNA配列は、チミジン塩基（T）の代わ

りに、ウラシル（U）塩基を有することが理解されよう。

【0206】

例示的な標的核酸に関するさらなる情報は、表6に提供される。

【表6】

表6．種にわたるFUBP1についての配列の詳細

種	RNA型	長さ（nt）	配列番号
ヒト	プレmRNA	305056	247
ヒト	成熟mRNA	696	248
ヒト	成熟mRNA	1968	249
ヒト	成熟mRNA	1935	250
カニクイザル	プレmRNA	39750	251
カニクイザル	成熟mRNA	1968	252
カニクイザル	成熟mRNA	6825	253
カニクイザル	成熟mRNA	1959	254
マウス	プレmRNA	26405	255
マウス	成熟mRNA	4525	256
マウス	成熟mRNA	800	257
マウス	成熟mRNA	2526	258
マウス	成熟mRNA	809	259
マウス	成熟mRNA	1040	260
マウス	成熟mRNA	796	261
マウス	成熟mRNA	585	262
マウス	成熟mRNA	2374	263
マウス	成熟mRNA	3163	264
マウス	成熟mRNA	6523	265
マウス	成熟mRNA	2552	266

注記 配列番号251は、配列決定が配列を正確に精製することができず、したがって縮重配列が含まれる、複数のNNNNの領域を含む。疑いを避けるため、本発明の組み合わせの化合物は実際の標的配列に対して相補的であり、したがって、縮重化合物ではない。

【0207】

標的配列

本明細書で使用される用語「標的配列」は、本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドに相補的な核酸塩基配列を含む、標的核酸中に存在するヌクレオチドの配列を指す。いくつかの実施形態では、標的配列は、本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列に相補的な核酸塩基配列を有する標的核酸上の領域からなる。標的核酸のこの領域は、互換的に標的ヌクレオチド配列、標的配列、又は標的領域と称され得る。いくつかの実施形態では、標的配列は、単一オリゴヌクレオチドの相補的配列よりも長く、例えばいくつかのオリゴヌクレオチドによって標的化され得る標的核酸の好ましい領域を表すことができる。

【0208】

RTE L 1 標的配列

いくつかの実施形態では、標的配列は、上記の表 1 のリストから選択される RTE L 1 ヒト mRNA エクソンなどのヒト RTE L 1 mRNA エクソンからなる群から選択される配列である。

【0209】

いくつかの実施形態では、標的配列は、上記の表 1 のリストから選択される RTE L 1 ヒト mRNA イントロンなどのヒト RTE L 1 mRNA イントロンからなる群から選択される配列である。

【0210】

本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドは、標的核酸、例えば本明細書に記載される標的配列に相補的又はハイブリダイズする連続ヌクレオチド配列を含む。

【0211】

オリゴヌクレオチドが相補的又はハイブリダイズする標的配列は、一般に、少なくとも 10 ヌクレオチドの連続核酸塩基配列を含む。連続ヌクレオチド配列は、10～35 ヌクレオチド、例えば 12～30、例えば 14～20、例えば 16～20 連続ヌクレオチドである。本発明の一実施形態では、標的配列は、表 7 に示す配列番号 3～26 からなる群から選択される。

【表 7】

表 7：ヒト RTE L 1 プレ mRNA 上の標的配列（配列番号 1）

配列番号	標的配列	配列番号 1 における 開始	配列番号 1 における 終了
3	gaccactgtccttccatg	8 2 9 4	8 3 1 1
4	ttcagagattcaagttataataaagctcttctatattgaggggga	8 6 7 7	8 7 2 2
5	gagattcaagttataataaag	8 6 8 1	8 7 0 1
6	aggaatagggttggttt	9 3 7 7	9 3 9 4
7	cctfactacctgtcccg	9 6 6 7	9 6 8 3
8	acaattactgttgatgcc	9 7 2 2	9 7 4 1
9	agcttctaaccaaccag	1 0 9 2 1	1 0 9 3 8
10	tataaacctaaatgtaaaagc	1 1 4 8 2	1 1 5 0 2
11	ttcaccaaaatttaaagctt	1 1 6 2 2	1 1 6 4 1
12	cttgaccagagtatgtaaaattctc	1 1 7 5 2	1 1 7 7 7
13	ttgaccagagtatgtaaaatt	1 1 7 5 3	1 1 7 7 4
14	ttgaccagagtatgtaa	1 1 7 5 3	1 1 7 7 0
15	gaccagagtatgtaaaatt	1 1 7 5 6	1 1 7 7 4
16	accagagtatgtaaaatt	1 1 7 5 7	1 1 7 7 4
17	aagacgtgttcaaagatt	1 2 8 6 8	1 2 8 8 5
18	ggacctactgtttttg	1 3 2 3 4	1 3 2 5 0
19	ggacctactgttttatcc	1 3 5 5 0	1 3 5 6 8
20	gtccctctcttctcctctgtag	1 4 7 2 5	1 4 7 4 6
21	cgtgatcttgacgaagct	1 4 7 8 5	1 4 8 0 3
22	cgcaaacctttctgga	1 4 8 7 4	1 4 8 8 9
23	agcctgtgtgtggagtatgagca	3 3 0 2 5	3 3 0 4 7
24	cgtttccgtgtgtgtctggg	3 4 5 7 1	3 4 5 9 0
25	gaclacaagggttccgatg	3 5 1 0 4	3 5 1 2 2
26	agtttgaggaggtctgtatc	3 5 3 7 0	3 5 3 8 9

【0212】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 5 である。

【0213】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 13 である。

【0214】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 14 である。

【0215】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 15 である。

【0216】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 16 である。

【0217】

配列番号 5 : G A G A T T C A A G T T A T A A T A A A G

配列番号 13 : T T T G A C C A G A G T A T G T A A A A T T

配列番号 14 : T T T G A C C A G A G T A T G T A A

配列番号 15 : G A C C A G A G T A T G T A A A A T T

配列番号 16 : A C C A G A G T A T G T A A A A T T

【0218】

配列番号 3 ~ 26 は DNA 配列である。標的 RNA 配列は、チミジン塩基 (T) の代わりに、ウラシル (U) 塩基を有することが理解されよう。

【0219】

配列番号 13 ~ 16 に示される標的配列は、ヒト RTEL1 のイントロン 8 に見出すことができる。配列番号 5 に示される標的配列は、ヒト RTEL1 のイントロン 7 に見出すことができる。

【0220】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 11753 ~ 11774 の領域である。

【0221】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 11757 ~ 11774 の領域である。

【0222】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 11756 ~ 11774 の領域である。

【0223】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 11753 ~ 11770 の領域である。

【0224】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 8681 ~ 8701 の領域である。

【0225】

いくつかの実施形態では、標的配列は、表 8 A 又は表 8 B に示される領域から選択される。

10

20

30

40

50

【表 8 A - 1】

表 8 A : 本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドを用いて標的化され得る配列番号 1 の領域

領域A	配列番号 1 における位置		長さ	領域A	配列番号 1 における位置		長さ	領域A	配列番号 1 における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
1 A	1 5 9 4	1 6 2 3	3 0	3 2 1 A	1 4 2 9 5	1 4 3 2 0	2 6	6 4 1 A	2 4 4 9 9	2 4 5 1 4	1 6
2 A	1 6 3 6	1 6 8 5	5 0	3 2 2 A	1 4 3 0 8	1 4 3 5 2	4 5	6 4 2 A	2 4 5 6 0	2 4 5 7 5	1 6
3 A	1 6 8 7	1 7 0 8	2 2	3 2 3 A	1 4 3 2 3	1 4 3 5 2	3 0	6 4 3 A	2 4 6 2 1	2 4 6 3 6	1 6
4 A	1 7 7 3	1 7 9 4	2 2	3 2 4 A	1 4 3 2 6	1 4 3 5 2	2 7	6 4 4 A	2 4 6 8 2	2 4 6 9 7	1 6
5 A	1 8 1 0	1 8 2 4	1 5	3 2 5 A	1 4 3 3 4	1 4 3 5 1	1 8	6 4 5 A	2 4 7 1 7	2 4 7 5 3	3 7
6 A	1 8 2 4	1 8 7 0	4 7	3 2 6 A	1 4 3 4 0	1 4 3 6 4	2 5	6 4 6 A	2 4 8 4 2	2 4 8 5 7	1 6
7 A	2 8 9 0	2 9 0 7	1 8	3 2 7 A	1 4 3 4 0	1 4 3 5 9	2 0	6 4 7 A	2 4 9 0 2	2 4 9 1 8	1 7
8 A	2 9 3 1	2 9 5 2	2 2	3 2 8 A	1 4 3 4 8	1 4 3 6 2	1 5	6 4 8 A	2 4 9 3 2	2 4 9 6 2	3 1
9 A	2 9 8 4	2 9 9 9	1 6	3 2 9 A	1 4 3 7 4	1 4 4 0 6	3 3	6 4 9 A	2 5 0 1 8	2 5 0 5 6	3 9
10 A	3 0 0 2	3 0 2 1	2 0	3 3 0 A	1 4 4 1 6	1 4 4 4 6	3 1	6 5 0 A	2 5 1 6 0	2 5 1 7 6	1 7
11 A	3 0 2 6	3 0 8 1	5 6	3 3 1 A	1 4 4 6 2	1 4 4 8 9	2 8	6 5 1 A	2 5 2 1 9	2 5 2 5 1	3 3
12 A	3 0 8 3	3 1 0 0	1 8	3 3 2 A	1 4 5 0 5	1 4 5 2 1	1 7	6 5 2 A	2 5 2 5 9	2 5 2 7 8	2 0
13 A	3 1 7 5	3 2 0 2	2 8	3 3 3 A	1 4 5 2 3	1 4 5 4 1	1 9	6 5 3 A	2 5 3 3 2	2 5 3 4 6	1 5
14 A	3 2 0 5	3 2 2 8	2 4	3 3 4 A	1 4 5 7 7	1 4 5 9 8	2 2	6 5 4 A	2 5 3 6 3	2 5 3 7 9	1 7
15 A	3 2 5 3	3 2 7 0	1 8	3 3 5 A	1 4 7 2 5	1 4 7 6 2	3 8	6 5 5 A	2 5 3 6 7	2 5 3 8 3	1 7
16 A	3 2 8 9	3 3 2 0	3 2	3 3 6 A	1 4 7 6 4	1 4 7 8 1	1 8	6 5 6 A	2 5 4 0 5	2 5 4 3 5	3 1
17 A	3 3 5 3	3 3 6 8	1 6	3 3 7 A	1 4 7 8 3	1 4 8 0 8	2 6	6 5 7 A	2 5 4 0 5	2 5 4 3 6	3 2
18 A	3 3 7 4	3 3 8 8	1 5	3 3 8 A	1 4 8 7 4	1 4 9 0 5	3 2	6 5 8 A	2 5 4 0 7	2 5 4 2 5	1 9
19 A	3 4 4 3	3 4 7 2	3 0	3 3 9 A	1 4 9 7 4	1 5 0 3 0	5 7	6 5 9 A	2 5 4 1 0	2 5 4 3 6	2 7
20 A	3 5 2 5	3 5 4 7	2 3	3 4 0 A	1 5 0 3 2	1 5 0 5 9	2 8	6 6 0 A	2 5 4 1 8	2 5 4 3 5	1 8
21 A	3 5 4 9	3 5 8 1	3 3	3 4 1 A	1 5 0 8 4	1 5 0 9 8	1 5	6 6 1 A	2 5 4 7 5	2 5 4 9 5	2 1
22 A	3 5 8 4	3 6 1 2	2 9	3 4 2 A	1 5 0 8 7	1 5 1 0 6	2 0	6 6 2 A	2 5 5 0 2	2 5 5 1 8	1 7
23 A	3 6 4 8	3 6 7 5	2 8	3 4 3 A	1 5 1 0 8	1 5 1 2 6	1 9	6 6 3 A	2 5 5 5 9	2 5 5 8 2	2 4
24 A	3 6 8 1	3 7 0 8	2 8	3 4 4 A	1 5 1 4 7	1 5 1 8 0	3 4	6 6 4 A	2 5 5 9 6	2 5 6 4 0	4 5
25 A	3 7 1 6	3 7 3 1	1 6	3 4 5 A	1 5 1 8 3	1 5 2 0 2	2 0	6 6 5 A	2 5 6 7 1	2 5 6 8 8	1 8
26 A	3 7 3 3	3 7 5 5	2 3	3 4 6 A	1 5 2 3 0	1 5 2 4 7	1 8	6 6 6 A	2 5 7 9 6	2 5 8 1 6	2 1
27 A	3 7 5 7	3 7 7 5	1 9	3 4 7 A	1 5 2 5 5	1 5 2 7 0	1 6	6 6 7 A	2 5 8 1 8	2 5 8 3 2	1 5
28 A	3 7 9 7	3 8 1 1	1 5	3 4 8 A	1 5 2 7 2	1 5 2 9 8	2 7	6 6 8 A	2 5 8 3 4	2 5 8 5 7	2 4
29 A	3 8 2 3	3 8 4 4	2 2	3 4 9 A	1 5 2 8 8	1 5 3 1 2	2 5	6 6 9 A	2 5 8 6 7	2 5 8 8 1	1 5
30 A	3 8 4 6	3 8 8 1	3 6	3 5 0 A	1 5 3 1 9	1 5 3 4 9	3 1	6 7 0 A	2 5 9 2 8	2 5 9 4 3	1 6
31 A	3 9 2 2	3 9 5 5	3 4	3 5 1 A	1 5 3 5 9	1 5 3 7 3	1 5	6 7 1 A	2 5 9 8 6	2 6 0 0 1	1 6
32 A	3 9 5 7	3 9 7 5	1 9	3 5 2 A	1 5 3 7 0	1 5 3 8 5	1 6	6 7 2 A	2 6 0 1 4	2 6 0 3 7	2 4
33 A	4 0 1 6	4 0 3 6	2 1	3 5 3 A	1 5 3 8 2	1 5 4 0 0	1 9	6 7 3 A	2 6 1 8 7	2 6 2 1 0	2 4

10

20

30

40

50

【表 8 A - 2】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
34A	4038	4053	16	354A	15388	15408	21	674A	26212	26228	17
35A	4067	4098	32	355A	15410	15435	26	675A	26268	26286	19
36A	4100	4150	51	356A	15435	15452	18	676A	26300	26319	20
37A	4271	4290	20	357A	15456	15498	43	677A	26359	26394	36
38A	4312	4330	19	358A	15459	15474	16	678A	26396	26426	31
39A	4345	4362	18	359A	15479	15498	20	679A	26465	26482	18
40A	4364	4379	16	360A	15486	15502	17	680A	26505	26529	25
41A	4420	4448	29	361A	15528	15543	16	681A	26547	26565	19
42A	4480	4512	33	362A	15543	15561	19	682A	26576	26600	25
43A	4527	4552	26	363A	15572	15591	20	683A	26588	26603	16
44A	4651	4674	24	364A	15623	15642	20	684A	26588	26606	19
45A	4733	4784	52	365A	15646	15660	15	685A	26609	26624	16
46A	4786	4811	26	366A	15662	15690	29	686A	26615	26638	24
47A	4830	4848	19	367A	15702	15740	39	687A	26615	26642	28
48A	4857	4874	18	368A	15740	15754	15	688A	26632	26669	38
49A	4915	4937	23	369A	15743	15773	31	689A	26649	26669	21
50A	4944	4966	23	370A	15746	15761	16	690A	26658	26672	15
51A	4969	4983	15	371A	15764	15789	26	691A	26695	26716	22
52A	4995	5015	21	372A	15777	15803	27	692A	26706	26725	20
53A	5017	5033	17	373A	15791	15816	26	693A	26713	26735	23
54A	5035	5075	41	374A	15832	15848	17	694A	26715	26733	19
55A	5109	5136	28	375A	15855	15873	19	695A	26737	26768	32
56A	5155	5173	19	376A	15870	15890	21	696A	26755	26770	16
57A	5175	5191	17	377A	15878	15908	31	697A	26756	26789	34
58A	5209	5225	17	378A	15880	15898	19	698A	26759	26789	31
59A	5241	5261	21	379A	15891	15908	18	699A	26787	26813	27
60A	5263	5287	25	380A	15896	15916	21	700A	26795	26812	18
61A	5299	5346	48	381A	15911	15929	19	701A	26815	26829	15
62A	5394	5409	16	382A	15911	15930	20	702A	26861	26880	20
63A	5428	5447	20	383A	15947	15963	17	703A	26862	26882	21
64A	5472	5514	43	384A	16023	16056	34	704A	26865	26883	19
65A	5579	5606	28	385A	16068	16091	24	705A	26868	26883	16
66A	5617	5632	16	386A	16083	16097	15	706A	26870	26885	16
67A	5690	5711	22	387A	16129	16150	22	707A	26871	26892	22
68A	5713	5754	42	388A	16170	16229	60	708A	26880	26898	19

10

20

30

40

50

【表 8 A - 3】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
69A	5727	5741	15	389A	16245	16265	21	709A	26889	26910	22
70A	5756	5770	15	390A	16269	16300	32	710A	26908	26924	17
71A	5812	5854	43	391A	16308	16334	27	711A	26917	26939	23
72A	5871	5886	16	392A	16336	16356	21	712A	26948	26962	15
73A	5896	5932	37	393A	16336	16358	23	713A	26955	26973	19
74A	5992	6009	18	394A	16360	16391	32	714A	27097	27113	17
75A	6011	6038	28	395A	16360	16397	38	715A	27101	27128	28
76A	6057	6072	16	396A	16425	16465	41	716A	27112	27127	16
77A	6101	6122	22	397A	16472	16493	22	717A	27116	27183	68
78A	6127	6165	39	398A	16498	16515	18	718A	27133	27165	33
79A	6187	6203	17	399A	16545	16562	18	719A	27188	27209	22
80A	6210	6227	18	400A	16564	16586	23	720A	27218	27232	15
81A	6243	6261	19	401A	16588	16613	26	721A	27218	27234	17
82A	6271	6299	29	402A	16615	16639	25	722A	27235	27253	19
83A	6378	6393	16	403A	16651	16667	17	723A	27237	27253	17
84A	6468	6496	29	404A	16669	16695	27	724A	27237	27251	15
85A	6498	6526	29	405A	16696	16716	21	725A	27237	27252	16
86A	6558	6574	17	406A	16704	16718	15	726A	27238	27254	17
87A	6720	6737	18	407A	16732	16760	29	727A	27238	27252	15
88A	6735	6749	15	408A	16737	16760	24	728A	27238	27253	16
89A	6785	6825	41	409A	16849	16865	17	729A	27239	27255	17
90A	6879	6894	16	410A	16853	16868	16	730A	27239	27253	15
91A	6921	6959	39	411A	16853	16867	15	731A	27239	27254	16
92A	6995	7060	66	412A	16882	16897	16	732A	27240	27254	15
93A	7062	7084	23	413A	16885	16902	18	733A	27240	27255	16
94A	7114	7146	33	414A	16914	16938	25	734A	27241	27255	15
95A	7155	7186	32	415A	16942	16956	15	735A	27269	27320	52
96A	7188	7203	16	416A	16990	17004	15	736A	27281	27297	17
97A	7230	7267	38	417A	17016	17042	27	737A	27286	27307	22
98A	7281	7299	19	418A	17097	17115	19	738A	27340	27358	19
99A	7291	7316	26	419A	17105	17119	15	739A	27360	27404	45
100A	7344	7369	26	420A	17105	17126	22	740A	27411	27438	28
101A	7375	7391	17	421A	17114	17128	15	741A	27458	27474	17
102A	7400	7414	15	422A	17133	17158	26	742A	27531	27572	42
103A	7427	7441	15	423A	17160	17174	15	743A	27575	27600	26

10

20

30

40

50

【表 8 A - 4】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
104A	7437	7453	17	424A	17162	17178	17	744A	27602	27616	15
105A	7449	7463	15	425A	17166	17183	18	745A	27618	27637	20
106A	7467	7481	15	426A	17178	17199	22	746A	27670	27684	15
107A	7500	7518	19	427A	17187	17201	15	747A	27707	27721	15
108A	7532	7546	15	428A	17203	17223	21	748A	27723	27747	25
109A	7573	7587	15	429A	17213	17230	18	749A	27772	27816	45
110A	7607	7621	15	430A	17213	17235	23	750A	27772	27790	19
111A	7659	7685	27	431A	17237	17259	23	751A	27829	27847	19
112A	7732	7767	36	432A	17249	17279	31	752A	27850	27868	19
113A	7779	7793	15	433A	17267	17285	19	753A	27870	27905	36
114A	7844	7882	39	434A	17273	17288	16	754A	27927	27942	16
115A	7888	7910	23	435A	17297	17315	19	755A	27963	27987	25
116A	7966	7980	15	436A	17300	17315	16	756A	27989	28083	95
117A	8033	8047	15	437A	17302	17317	16	757A	28085	28103	19
118A	8049	8063	15	438A	17303	17324	22	758A	28120	28138	19
119A	8160	8178	19	439A	17312	17330	19	759A	28167	28188	22
120A	8180	8195	16	440A	17346	17375	30	760A	28190	28207	18
121A	8216	8237	22	441A	17349	17375	27	761A	28209	28231	23
122A	8239	8341	103	442A	17357	17374	18	762A	28234	28250	17
123A	8357	8373	17	443A	17363	17382	20	763A	28260	28303	44
124A	8415	8430	16	444A	17371	17385	15	764A	28427	28444	18
125A	8449	8465	17	445A	17420	17447	28	765A	28446	28462	17
126A	8541	8560	20	446A	17524	17551	28	766A	28464	28484	21
127A	8574	8596	23	447A	17562	17580	19	767A	28503	28519	17
128A	8677	8703	27	448A	17622	17636	15	768A	28521	28536	16
129A	8705	8722	18	449A	17702	17734	33	769A	28538	28565	28
130A	8748	8763	16	450A	17730	17745	16	770A	28595	28612	18
131A	8792	8807	16	451A	17733	17755	23	771A	28694	28709	16
132A	8796	8811	16	452A	17743	17758	16	772A	28701	28715	15
133A	8799	8818	20	453A	17810	17824	15	773A	28715	28751	37
134A	8807	8821	15	454A	17900	17940	41	774A	28801	28825	25
135A	8814	8828	15	455A	17942	17968	27	775A	28832	28846	15
136A	8837	8853	17	456A	17988	18002	15	776A	28846	28870	25
137A	8837	8851	15	457A	18007	18024	18	777A	28878	28893	16
138A	8841	8858	18	458A	18026	18042	17	778A	28895	28911	17

10

20

30

40

50

【表 8 A - 5】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
139A	8884	8911	28	459A	18044	18059	16	779A	28938	28961	24
140A	8918	8937	20	460A	18126	18159	34	780A	29010	29025	16
141A	8918	8933	16	461A	18179	18205	27	781A	29057	29072	16
142A	8969	9005	37	462A	18237	18253	17	782A	29119	29134	16
143A	8969	8999	31	463A	18272	18290	19	783A	29179	29193	15
144A	8969	9000	32	464A	18299	18314	16	784A	29235	29256	22
145A	8971	8989	19	465A	18328	18344	17	785A	29330	29349	20
146A	8974	9000	27	466A	18329	18344	16	786A	29367	29381	15
147A	8982	8999	18	467A	18347	18361	15	787A	29530	29556	27
148A	9024	9042	19	468A	18380	18402	23	788A	29587	29605	19
149A	9026	9042	17	469A	18385	18399	15	789A	29652	29692	41
150A	9026	9040	15	470A	18406	18421	16	790A	29695	29710	16
151A	9026	9041	16	471A	18446	18473	28	791A	29722	29742	21
152A	9027	9043	17	472A	18527	18543	17	792A	29743	29768	26
153A	9027	9041	15	473A	18554	18569	16	793A	29770	29797	28
154A	9027	9042	16	474A	18631	18645	15	794A	29818	29836	19
155A	9028	9044	17	475A	18673	18693	21	795A	29838	29873	36
156A	9028	9042	15	476A	18746	18765	20	796A	29875	29946	72
157A	9028	9043	16	477A	18797	18824	28	797A	29948	29983	36
158A	9029	9045	17	478A	18842	18860	19	798A	30028	30048	21
159A	9029	9043	15	479A	18872	18892	21	799A	30046	30060	15
160A	9029	9044	16	480A	18901	18915	15	800A	30051	30067	17
161A	9030	9046	17	481A	18901	18940	40	801A	30069	30090	22
162A	9030	9044	15	482A	18942	18976	35	802A	30093	30107	15
163A	9030	9045	16	483A	18951	18976	26	803A	30116	30136	21
164A	9031	9047	17	484A	18971	18994	24	804A	30138	30202	65
165A	9031	9045	15	485A	18998	19016	19	805A	30220	30262	43
166A	9031	9046	16	486A	19020	19039	20	806A	30303	30320	18
167A	9032	9048	17	487A	19027	19043	17	807A	30349	30372	24
168A	9032	9046	15	488A	19027	19050	24	808A	30387	30418	32
169A	9032	9047	16	489A	19088	19102	15	809A	30417	30441	25
170A	9033	9047	15	490A	19109	19129	21	810A	30476	30516	41
171A	9033	9048	16	491A	19128	19145	18	811A	30524	30576	53
172A	9034	9048	15	492A	19240	19258	19	812A	30602	30628	27
173A	9038	9052	15	493A	19280	19366	87	813A	30658	30680	23

10

20

30

40

50

【表 8 A - 6】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
174A	9046	9064	19	494A	19372	19387	16	814A	30682	30747	66
175A	9069	9090	22	495A	19422	19444	23	815A	30749	30799	51
176A	9074	9089	16	496A	19446	19462	17	816A	30801	30821	21
177A	9078	9093	16	497A	19489	19506	18	817A	30823	30844	22
178A	9095	9110	16	498A	19546	19571	26	818A	30908	30922	15
179A	9101	9124	24	499A	19597	19615	19	819A	30924	30980	57
180A	9126	9161	36	500A	19624	19648	25	820A	31027	31045	19
181A	9135	9155	21	501A	19680	19695	16	821A	31047	31080	34
182A	9147	9162	16	502A	19713	19727	15	822A	31086	31113	28
183A	9163	9186	24	503A	19775	19792	18	823A	31128	31146	19
184A	9203	9222	20	504A	19789	19803	15	824A	31150	31164	15
185A	9210	9253	44	505A	19811	19825	15	825A	31166	31193	28
186A	9210	9230	21	506A	19838	19862	25	826A	31229	31271	43
187A	9223	9254	32	507A	20241	20257	17	827A	31276	31310	35
188A	9241	9256	16	508A	20259	20290	32	828A	31312	31333	22
189A	9258	9272	15	509A	20309	20381	73	829A	31400	31417	18
190A	9266	9303	38	510A	20404	20419	16	830A	31419	31433	15
191A	9291	9308	18	511A	20470	20492	23	831A	31456	31470	15
192A	9311	9329	19	512A	20495	20557	63	832A	31517	31569	53
193A	9370	9394	25	513A	20593	20609	17	833A	31578	31599	22
194A	9406	9420	15	514A	20626	20646	21	834A	31661	31689	29
195A	9569	9591	23	515A	20648	20669	22	835A	31706	31739	34
196A	9653	9708	56	516A	20683	20699	17	836A	31741	31763	23
197A	9712	9758	47	517A	20718	20735	18	837A	31765	31805	41
198A	9771	9788	18	518A	20749	20765	17	838A	31807	31855	49
199A	9812	9829	18	519A	20751	20765	15	839A	31819	31834	16
200A	9844	9862	19	520A	20769	20785	17	840A	31851	31866	16
201A	9872	9917	46	521A	20773	20791	19	841A	31857	31872	16
202A	9958	9983	26	522A	20777	20798	22	842A	31938	31984	47
203A	9985	10002	18	523A	20779	20798	20	843A	31986	32032	47
204A	10017	10054	38	524A	20779	20797	19	844A	32034	32071	38
205A	10113	10132	20	525A	20798	20819	22	845A	32082	32097	16
206A	10113	10130	18	526A	20800	20819	20	846A	32124	32151	28
207A	10120	10137	18	527A	20800	20818	19	847A	32197	32216	20
208A	10183	10204	22	528A	20819	20840	22	848A	32233	32262	30

10

20

30

40

50

【表 8 A - 7】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
209A	10185	10204	20	529A	20819	20853	35	849A	32264	32289	26
210A	10185	10202	18	530A	20821	20840	20	850A	32306	32325	20
211A	10192	10209	18	531A	20821	20853	33	851A	32357	32408	52
212A	10192	10210	19	532A	20821	20839	19	852A	32410	32459	50
213A	10231	10251	21	533A	20833	20851	19	853A	32474	32492	19
214A	10236	10251	16	534A	20833	20855	23	854A	32494	32508	15
215A	10320	10337	18	535A	20841	20864	24	855A	32527	32543	17
216A	10338	10353	16	536A	20855	20869	15	856A	32545	32560	16
217A	10397	10415	19	537A	20866	20895	30	857A	32570	32636	67
218A	10563	10584	22	538A	20881	20902	22	858A	32697	32713	17
219A	10591	10607	17	539A	20881	20915	35	859A	32744	32765	22
220A	10703	10723	21	540A	20883	20902	20	860A	32801	32823	23
221A	10766	10784	19	541A	20883	20915	33	861A	32865	32892	28
222A	10805	10822	18	542A	20883	20901	19	862A	32944	32959	16
223A	10844	10870	27	543A	20895	20913	19	863A	32962	32985	24
224A	10873	10893	21	544A	20895	20917	23	864A	32998	33104	107
225A	10895	10913	19	545A	20903	20926	24	865A	33126	33140	15
226A	10915	10942	28	546A	20917	20931	15	866A	33142	33194	53
227A	10961	10975	15	547A	20928	20946	19	867A	33213	33252	40
228A	10983	10999	17	548A	20937	20951	15	868A	33277	33298	22
229A	11001	11015	15	549A	20955	20973	19	869A	33318	33365	48
230A	11021	11035	15	550A	20975	20993	19	870A	33375	33390	16
231A	11033	11059	27	551A	20975	20997	23	871A	33402	33417	16
232A	11061	11082	22	552A	20983	21004	22	872A	33419	33443	25
233A	11084	11104	21	553A	20983	21017	35	873A	33456	33488	33
234A	11124	11154	31	554A	20985	21004	20	874A	33509	33542	34
235A	11156	11170	15	555A	20985	21017	33	875A	33562	33583	22
236A	11175	11192	18	556A	20985	21003	19	876A	33607	33622	16
237A	11227	11260	34	557A	20997	21015	19	877A	33655	33700	46
238A	11239	11254	16	558A	20997	21019	23	878A	33704	33720	17
239A	11274	11302	29	559A	21005	21028	24	879A	33735	33753	19
240A	11290	11305	16	560A	21019	21033	15	880A	33755	33780	26
241A	11299	11317	19	561A	21030	21048	19	881A	33806	33820	15
242A	11305	11329	25	562A	21030	21052	23	882A	33829	33845	17
243A	11344	11361	18	563A	21057	21075	19	883A	33916	33962	47

10

20

30

40

50

【表 8 A - 8】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
244A	11372	11400	29	564A	21057	21079	23	884A	33964	33982	19
245A	11402	11416	15	565A	21067	21085	19	885A	33989	34026	38
246A	11418	11445	28	566A	21088	21118	31	886A	34028	34072	45
247A	11457	11471	15	567A	21127	21153	27	887A	34089	34104	16
248A	11482	11511	30	568A	21155	21169	15	888A	34113	34130	18
249A	11550	11566	17	569A	21155	21180	26	889A	34141	34158	18
250A	11622	11645	24	570A	21205	21220	16	890A	34281	34309	29
251A	11722	11737	16	571A	21222	21283	62	891A	34377	34407	31
252A	11745	11777	33	572A	21347	21370	24	892A	34423	34498	76
253A	11824	11844	21	573A	21431	21445	15	893A	34507	34521	15
254A	11824	11840	17	574A	21463	21487	25	894A	34524	34545	22
255A	12622	12638	17	575A	21489	21518	30	895A	34552	34596	45
256A	12673	12691	19	576A	21520	21535	16	896A	34688	34703	16
257A	12693	12724	32	577A	21551	21573	23	897A	34742	34759	18
258A	12747	12763	17	578A	21574	21591	18	898A	34770	34798	29
259A	12783	12806	24	579A	21595	21618	24	899A	34860	34882	23
260A	12818	12837	20	580A	21622	21641	20	900A	34919	34938	20
261A	12856	12885	30	581A	21664	21678	15	901A	34950	34988	39
262A	12890	12912	23	582A	21758	21789	32	902A	34990	35012	23
263A	12914	12945	32	583A	21799	21816	18	903A	35022	35048	27
264A	12984	13016	33	584A	21820	21852	33	904A	35063	35182	120
265A	13001	13016	16	585A	21865	21882	18	905A	35184	35210	27
266A	13004	13022	19	586A	21890	21905	16	906A	35222	35241	20
267A	13004	13021	18	587A	21917	21932	16	907A	35245	35275	31
268A	13014	13034	21	588A	21956	21976	21	908A	35277	35297	21
269A	13166	13191	26	589A	21975	21993	19	909A	35319	35355	37
270A	13228	13251	24	590A	22007	22035	29	910A	35367	35397	31
271A	13283	13319	37	591A	22014	22034	21	911A	35433	35457	25
272A	13295	13310	16	592A	22036	22051	16	912A	35461	35486	26
273A	13317	13332	16	593A	22036	22068	33	913A	35490	35509	20
274A	13354	13381	28	594A	22070	22132	63	914A	35546	35560	15
275A	13383	13430	48	595A	22174	22203	30	915A	35573	35593	21
276A	13446	13468	23	596A	22205	22219	15	916A	35597	35613	17
277A	13449	13468	20	597A	22229	22254	26	917A	35968	35999	32
278A	13471	13487	17	598A	22276	22299	24	918A	35997	36011	15

10

20

30

40

50

【表 8 A - 9】

領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ	領域A	配列番号1における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
279A	13500	13518	19	599A	22309	22353	45	919A	36037	36051	15
280A	13547	13568	22	600A	22359	22373	15	920A	36097	36118	22
281A	13631	13650	20	601A	22385	22403	19	921A	36117	36132	16
282A	13663	13679	17	602A	22443	22460	18	922A	36278	36295	18
283A	13680	13694	15	603A	22462	22490	29	923A	36350	36364	15
284A	13744	13764	21	604A	22499	22520	22	924A	36366	36392	27
285A	13766	13803	38	605A	22601	22623	23	925A	36433	36458	26
286A	13768	13803	36	606A	22646	22661	16	926A	36460	36483	24
287A	13777	13797	21	607A	22663	22682	20	927A	36530	36547	18
288A	13789	13804	16	608A	22713	22735	23	928A	36549	36566	18
289A	13804	13827	24	609A	22737	22772	36	929A	36600	36625	26
290A	13823	13844	22	610A	22793	22826	34	930A	36627	36665	39
291A	13840	13854	15	611A	22851	22903	53	931A	36759	36774	16
292A	13840	13855	16	612A	22905	22928	24	932A	36765	36782	18
293A	13841	13855	15	613A	22934	22985	52	933A	36815	36850	36
294A	13851	13874	24	614A	23071	23089	19	934A	36873	36891	19
295A	13851	13873	23	615A	23094	23121	28	935A	36894	36934	41
296A	13853	13871	19	616A	23174	23208	35	936A	36969	36994	26
297A	13855	13874	20	617A	23249	23276	28	937A	36996	37016	21
298A	13862	13882	21	618A	23279	23311	33	938A	37023	37040	18
299A	13890	13905	16	619A	23313	23328	16	939A	37093	37112	20
300A	13897	13927	31	620A	23450	23470	21	940A	37118	37142	25
301A	13926	13940	15	621A	23488	23503	16	941A	37144	37163	20
302A	13957	13971	15	622A	23511	23529	19	942A	37242	37324	83
303A	13966	13980	15	623A	23555	23570	16	943A	37352	37368	17
304A	13995	14025	31	624A	23575	23589	15	944A	37370	37389	20
305A	14027	14048	22	625A	23597	23620	24	945A	37391	37419	29
306A	14048	14067	20	626A	23632	23647	16	946A	37421	37438	18
307A	14084	14098	15	627A	23672	23687	16	947A	37444	37491	48
308A	14118	14133	16	628A	23737	23775	39	948A	37511	37538	28
309A	14154	14171	18	629A	23746	23760	15	949A	37567	37614	48
310A	14173	14210	38	630A	23833	23847	15	950A	37636	37680	45
311A	14198	14218	21	631A	23872	23911	40	951A	37723	37765	43
312A	14200	14218	19	632A	23919	23936	18	952A	37773	37801	29
313A	14237	14265	29	633A	24050	24068	19	953A	37803	37822	20

10

20

30

40

50

【表 8 A - 1 0】

領域A	配列番号 1 における位置		長さ	領域A	配列番号 1 における位置		長さ	領域A	配列番号 1 における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
3 1 4 A	1 4 2 4 2	1 4 2 6 5	2 4	6 3 4 A	2 4 0 8 3	2 4 1 1 1	2 9	9 5 4 A	3 7 8 2 4	3 7 8 5 3	3 0
3 1 5 A	1 4 2 4 2	1 4 2 6 4	2 3	6 3 5 A	2 4 1 1 1	2 4 1 2 5	1 5	9 5 5 A	3 7 8 5 5	3 7 8 8 7	3 3
3 1 6 A	1 4 2 4 4	1 4 2 6 2	1 9	6 3 6 A	2 4 1 3 1	2 4 1 6 4	3 4	9 5 6 A	3 7 8 8 9	3 7 9 0 8	2 0
3 1 7 A	1 4 2 4 6	1 4 2 6 5	2 0	6 3 7 A	2 4 1 6 7	2 4 1 8 9	2 3	9 5 7 A	3 7 9 2 0	3 7 9 3 9	2 0
3 1 8 A	1 4 2 5 3	1 4 2 7 1	1 9	6 3 8 A	2 4 2 0 4	2 4 2 2 7	2 4	9 5 8 A	3 7 9 8 8	3 8 0 2 0	3 3
3 1 9 A	1 4 2 7 3	1 4 2 9 3	2 1	6 3 9 A	2 4 2 3 6	2 4 2 8 5	5 0	9 5 9 A	3 8 0 2 2	3 8 0 4 9	2 8
3 2 0 A	1 4 2 9 0	1 4 3 0 4	1 5	6 4 0 A	2 4 4 3 8	2 4 4 5 3	1 6				

10

【表 8 B】

表 8 B：本発明で使用するためのオリゴヌクレオチドを用いて標的化され得る配列番号 1 の領域

領域B	配列番号 1 における位置		長さ	領域B	配列番号 1 における位置		長さ	領域B	配列番号 1 における位置		長さ
	始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり	
1	8 2 9 5	8 3 1 2	1 7	1 1	1 1 6 2 2	1 1 6 4 1	1 9	2 1	1 8 0 8 5	1 8 1 0 1	1 6
2	8 6 8 4	8 7 0 4	2 0	1 2	1 1 7 5 3	1 1 7 7 3	2 0	2 2	2 2 4 2 5	2 2 4 4 1	1 6
3	9 6 6 8	9 6 8 4	1 6	1 3	1 1 7 5 5	1 1 7 7 2	1 7	2 3	3 3 0 3 0	3 3 0 4 8	1 8
4	9 6 6 9	9 6 8 4	1 5	1 4	1 1 7 5 6	1 1 7 7 6	2 0	2 4	3 5 1 0 3	3 5 1 2 3	2 0
5	9 7 2 2	9 7 4 1	1 9	1 5	1 1 7 5 7	1 1 7 7 6	1 9	2 5	3 5 3 7 1	3 5 3 9 0	1 9
6	9 7 2 3	9 7 4 1	1 8	1 6	1 1 7 5 8	1 1 7 7 8	2 0	2 6	3 5 6 3 6	3 5 6 5 5	1 9
7	9 7 2 4	9 7 4 2	1 8	1 7	1 2 8 6 8	1 1 8 8 5	1 7	2 7	3 5 6 3 8	3 5 6 5 4	1 6
8	1 0 9 2 1	1 0 9 3 7	1 6	1 8	1 3 2 3 4	1 3 2 5 2	1 8	2 8	3 6 9 1 5	3 6 9 3 1	1 6
9	1 1 4 8 3	1 1 5 0 3	2 0	1 9	1 3 5 5 1	1 3 5 6 9	1 8				
1 0	1 1 5 1 2	1 1 5 3 1	1 9	2 0	1 4 7 8 6	1 4 8 0 4	1 8				

20

30

【0 2 2 6】

F U B P 1 標的配列

いくつかの実施形態では、標的配列は、ヒト F U B P 1 mRNA エクソン、例えば e 1、e 2、e 3、e 4、e 5、e 6、e 7、e 8、e 9、e 10、e 11、e 12、13、e 14、e 15、e 16、e 17、e 18、e 19 及び e 20 からなる群から選択される F U B P 1 ヒト mRNA エクソンからなる群から選択される配列である（例えば上記の表 4 参照）。

40

【0 2 2 7】

一実施形態では、標的配列は、エクソン 9、10、12、14 及び 20 からなる群から選択されるヒト F U B P 1 mRNA エクソンの 1 つ又は複数からなる群から選択される配列である。

【0 2 2 8】

いくつかの実施形態では、標的配列は、ヒト F U B P 1 mRNA イントロン、例えば、i 1、i 2、i 3、i 4、i 5、i 6、i 7、i 9、i 10、i 11、i 12、13、

50

i 1 4、i 1 5、i 1 6、i 1 7、i 1 8 及び i 1 9 からなる群から選択される F U B P 1 ヒト m R N A イントロンからなる群から選択される配列である（例えば上記の表 4 参照）。

【 0 2 2 9 】

本発明の組み合わせの核酸分子は、標的核酸上の領域、例えば本明細書に記載される標的配列に対して相補的又はハイブリダイズする連続ヌクレオチド配列を含む。

【 0 2 3 0 】

一実施形態では、標的配列は、ヒト F U B P 1 m R N A のエクソン 1 4 である（上記の表 4 参照）。

【 0 2 3 1 】

別の実施形態では、標的配列は、ヒト F U B P 1 m R N A のエクソン 2 0 である（上記の表 4 参照）。

【 0 2 3 2 】

本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的核酸上の領域、例えば本明細書に記載される標的配列に相補的又はハイブリダイズする連続ヌクレオチド配列を含む。

【 0 2 3 3 】

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドにより標的とされ得る、ヒト F U B P 1 プレ m R N A （参照として配列番号 2 4 7 を使用する）の領域により定義される標的配列が、本明細書において以下に提供される。

【 0 2 3 4 】

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、本明細書で記載される標的配列などの、標的核酸のサブ配列といった、標的核酸に相補的な、又は標的核酸とハイブリダイズする連続ヌクレオチド配列を含む。

【 0 2 3 5 】

治療用核酸分子が相補的であるか又はハイブリダイズする標的核酸配列は、一般に、少なくとも 1 0 ヌクレオチドの連続する核酸塩基のストレッチを含む。連続ヌクレオチド配列（したがって、標的配列）は、少なくとも 1 2 個の連続ヌクレオチド、例えば 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 個のヌクレオチド、例えば 1 4 ~ 2 0 個、例えば 1 4 ~ 1 8 個の連続ヌクレオチドを含む。

【 0 2 3 6 】

本発明者らは、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドによって標的化され得る、F U B P 1 標的核酸の特に有効な配列を同定した。

【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 2 6 7 である。

【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 2 6 8 である。

【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 2 6 9 である。

【 0 2 4 0 】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 2 7 0 である。

【 0 2 4 1 】

いくつかの実施形態では、標的配列は配列番号 3 4 7 である。

【 0 2 4 2 】

配列番号 2 6 7 : G T G A A A C C A T A A A A A G C A T A A G

配列番号 2 6 8 : A A C C A T A A A A A G C A T A A G

配列番号 2 6 9 : G T G A A A C C A T A A A A A G C A T A

配列番号 2 7 0 : G T A G A A A T G A A A A T T G G T

配列番号 3 4 7 : G A C T A T G G T T A T G G G G

【 0 2 4 3 】

配列番号 267、268、269、270 及び 347 は DNA 配列である。標的 RNA 配列は、チミジン塩基 (T) の代わりに、ウラシル (U) 塩基を有することが理解されよう。

【0244】

本発明は、ヒト FUBP1 プレ mRNA (配列番号 247 に示される) のヌクレオチド 16184~16205 の領域に相補的、例えば完全に相補的な連続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を提供する。

【0245】

本発明は、ヒト FUBP1 プレ mRNA (配列番号 247 に示される) のヌクレオチド 16188~16205 の領域に相補的、例えば完全に相補的な連続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を提供する。

10

【0246】

本発明は、ヒト FUBP1 プレ mRNA (配列番号 247 に示される) のヌクレオチド 16184~16203 の領域に相補的、例えば完全に相補的な連続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を提供する。

【0247】

また、本発明は、ヒト FUBP1 プレ mRNA (配列番号 247 に示される) のヌクレオチド 30536~30553 の領域に相補的、例えば完全に相補的な連続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を提供する。

【0248】

また、本発明は、ヒト FUBP1 プレ mRNA (配列番号 247 に示される) のヌクレオチド 9141~9156 の領域に相補的、例えば完全に相補的な連続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を提供する。

20

【0249】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16184~16200 の領域に相補的である、例えば完全に相補的である。

【0250】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16186~16203 の領域に相補的である、例えば完全に相補的である。

30

【0251】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16189~16205 の領域に相補的である、例えば完全に相補的である。

【0252】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16184~16200 までの領域である。

【0253】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16186~16203 までの領域である。

40

【0254】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16188~16205 までの領域である。

【0255】

いくつかの実施形態では、標的配列は、配列番号 247 のヌクレオチド 16189~16205 までの領域である。

【0256】

標的

本明細書で使用される場合、「標的」という用語は、「KIAA1088」又は「C2

50

0 ORF 41」又は「テロメア長の制御因子」又は「テロメア長制御因子」又は「第20染色体オープンリーディングフレーム41」としても知られる哺乳動物タンパク質RTEL1（「テロメア伸長ヘリカーゼ1制御因子（Regulator of telomere elongation helicase 1）」）を指し得る。ホモサピエンス（homo sapiens）RTEL1遺伝子は、20番染色体の63,657,810～63,696,253相補体（ホモサピエンス（Homo sapiens）更新アノテーション、リリース109.20200228、GRCh38.p13）に位置する。RTEL1タンパク質は、テロメア長調節、DNA修復及びゲノム安定性の維持に関与するATP依存性DNAヘリカーゼである。ヒトRTEL1のアミノ酸配列は当技術分野で公知であり、UniProtによって評価することができ、ヒトRTEL1についてはUniProtエントリーQ9NZ71を参照されたい（参照により本明細書に組み込まれる）。

10

【0257】

「標的」という用語はまた、「FUBP1」又は「FBP」又は「FUBP」又は「hDH V」としても知られる哺乳動物タンパク質「遠上流要素結合タンパク質1（Far Upstream Element-Binding Protein 1）」を指すためにも使用され得る。ホモサピエンスのFUBP1遺伝子は、第1番染色体、77944055..77979435、相補体（NC_000001.11、遺伝子番号1462）に位置する。FUBP1遺伝子は、c-mycの遠上流要素（far upstream element）を活性化し、未分化細胞におけるc-mycの発現を刺激するssDNA結合タンパク質をコードする。FUBPによるFUSEの調節は、非コード鎖へのFUBPの一本鎖結合によって起こる。FUBP1タンパク質は、ATP依存性DNAヘリカーゼ活性を有する。ヒトFUBP1のアミノ酸配列は当技術分野で公知であり、UniProtによって評価することができ、例えば、ヒトFUBP1についてはUniProtエントリーQ96AE4を参照されたい（参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0258】

治療有効量

「治療有効量」という用語は、対象へ投与されると、（i）特定の疾患、症状若しくは障害を処置する若しくは予防する、（ii）特定の疾患、症状若しくは障害のうちの1つ又は複数の症候を減弱させる、寛解させる、若しくは除去する、又は（iii）本明細書に説明する特定の疾患、症状若しくは障害のうちの1つ又は複数の症候の発症を予防する若しくは遅延させる、本発明の化合物又は医薬組み合わせの量を表す。治療有効量は、化合物、処置される疾患の状態、処置される疾患の重症度、対象の年齢及び相対的な健康状態、投与の経路及び形態、担当の医師又は獣医の判断、並びに他の要因に依って変動し得る。

30

【0259】

処置

本明細書で使用される「処置」という用語は、既存の疾患（例えば、本明細書で言及される疾患又は障害）の処置、又は疾患の予防（prevention）、すなわち予防法（prophylaxis）の両方を指す。したがって、本明細書で言及される処置は、いくつかの実施形態において、予防的であり得ることが認識されよう。予防とは、HBV感染症が慢性HBV感染症に転化するのを防ぐこと、又は慢性HBV感染症による肝硬変及び肝細胞癌腫などの重篤な肝疾患を予防することと理解することができる。

40

【発明を実施するための形態】

【0260】

発明の詳細な説明

感染肝細胞におけるHBV cccDNAは持続的な慢性感染及び再活性化に関与し、全てのウイルスサブゲノム転写物及びプレゲノムRNA（pgRNA）の鋳型であって、新たに合成されたウイルス子孫と細胞内ヌクレオカプシド再循環を介したcccDNAプール補充との両方を確実にする。本発明の文脈において、RTEL1がcccDNA安定

50

性に関連することが初めて示された。この知識により、HBV感染対象におけるcccDNAを不安定化する機会が生まれ、慢性感染HBV患者の完全治癒の機会が開ける。

【0261】

FUBP1の過剰発現及び突然変異は、長年にわたり癌に関連することが知られている。特に、ヒト肝細胞癌腫（HCC）におけるFUBP1の強い過剰発現は、腫瘍成長を支持し、患者の予後不良と相関する。感染肝細胞におけるHBV cccDNAは持続的な慢性感染及び再活性化に関与し、全てのウイルスサブゲノム転写物及びプレゲノムRNA（pgRNA）の鋳型であって、新たに合成されたウイルス子孫と細胞内ヌクレオカプシド再循環を介したcccDNAプール補充との両方を確実にする。本発明の文脈において、FUBP1がcccDNA安定性に関連することが初めて示された。この知識により、HBV感染対象におけるcccDNAを不安定化する機会が生まれ、慢性感染HBV患者の完全治癒の機会が開ける。HCC及びcccDNAの安定性におけるFUBP1の役割は、互いに異なり独立していると予想される。

10

【0262】

本発明は、2つのカテゴリーの化合物 i) RTEL1の阻害剤及び ii) FUBP1の阻害剤又はそれらの薬学的に許容され得る塩の組み合わせに関する。適切には、各化合物は、薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩及び／又はアジュバントで提供される。

【0263】

適切には、本発明による組み合わせは、B型肝炎ウイルス感染症及び／又は癌の処置、特に慢性HBV感染症を有する患者の処置に使用するためのものである。

20

【0264】

一実施形態では、本発明の組み合わせは、化合物 i) RTEL1の阻害剤及び ii) FUBP1の阻害剤、又はそれらの薬学的に許容され得る塩を含む組成物、医薬組成物、又はキットである。適切には、各化合物は、薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩及び／又はアジュバントで提供される。

【0265】

本発明はまた、本発明による組み合わせを投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法に関する。

【0266】

本発明はまた、医薬の調製のための本発明による組み合わせの使用に関する。

30

【0267】

本発明はまた、RTEL1及びFUBP1を発現している標的細胞においてRTEL1及びFUBP1の発現を調節するためのインビボ又はインビトロの方法であって、本発明による組み合わせを投与することを含む方法に関する。

【0268】

以下、組み合わせにおける化合物の各カテゴリーを別々に記載する。しかしながら、各カテゴリーからの少なくとも1つの化合物が組み合わせ中に存在することが理解されるべきである。化合物は、同時に又は別々に投与することができる。各カテゴリーの化合物は、非経口的に（例えば、静脈内、皮下、又は筋肉内）又は経腸的に（例えば、経口的に又は消化管を介して）投与され得る。

40

【0269】

RTEL1 阻害剤

一態様では、本発明の組み合わせにおける第1のカテゴリーの化合物は、RTEL1を標的とする阻害剤である。そのような阻害剤は、例えば、小分子、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド；siRNA分子；又はshRNA分子からなる群から選択することができる。

【0270】

本セクションにおいて、「オリゴヌクレオチド」という用語は、「RTEL1を標的とするオリゴヌクレオチド」と理解されるべきである。

50

【0271】

治療用オリゴヌクレオチドは、RTE L 1 転写物を標的とし、RNA 干渉経路又は RNAase H 切断のいずれかを介してその分解を促進することができるので、潜在的に優れた RTE L 1 阻害剤である。あるいは、アプタマーのようなオリゴヌクレオチドもまた、RTE L 1 タンパク質相互作用の阻害剤として作用し得る。

【0272】

一態様では、本発明の組み合わせにおける第 1 のカテゴリーの化合物は、RTE L 1 を標的とする阻害剤である。このような阻害剤は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA 分子、又は shRNA 分子からなるオリゴヌクレオチドの群から選択され得る。

10

【0273】

本セクションは、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートを記載し；B 型肝炎ウイルス（HBV）感染症（例えば慢性 HBV 感染症）の処置及び／又は予防における、又は癌の処置における使用に適している。

【0274】

本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、インビトロ及びインビボで RTE L 1 の発現を阻害することができる。阻害は、RTE L 1 をコードする又は RTE L 1 の調節に関与する標的核酸に、オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより達成される。標的核酸は、配列番号 1 及び／又は 2 の配列といった哺乳動物 RTE L 1 配列であり得る。

20

【0275】

本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、感染細胞において cccDNA を減少させることができる。

【0276】

いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、標的の発現を阻害又はダウンレギュレートすることにより、それを調節することができる。好ましくは、そのような調節は、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも 20 %、より好ましくは、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、又は少なくとも 90 % の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PXB-PHH 細胞において 10 μ M を使用して、RTE L 1 mRNA の発現レベルをインビトロで少なくとも 60 % 又は 70 % 阻害することができる場合がある。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、10 μ M PXB-PHH 細胞を用いてインビトロで RTE L 1 タンパク質の発現レベルを少なくとも 50 % 阻害することができ、この標的の低減の範囲は、cccDNA 減少と良好な相関を有する核酸分子を選択するという点で有利である。適切には、実施例は、RTE L 1 RNA 又はタンパク質阻害を測定するために使用され得るアッセイを提供する（例えば、実施例 1）。標的阻害は、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列と標的核酸との間のハイブリダイゼーションによって引き起こされる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間のミスマッチを含む。ミスマッチにもかかわらず、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、RTE L 1 発現の所望の阻害を示すのになお充分であり得る。ミスマッチから生じる結合親和性の減少は、オリゴヌクレオチド内のヌクレオチド数の増加、及び／又は、標的への結合親和性を増加させることができる修飾ヌクレオチド、例えばオリゴヌクレオチド配列内に存在する、LNA を含む 2' 糖修飾ヌクレオチドの数の増加により有利に補償され得る。

30

40

【0277】

本発明の一態様は、12 ~ 60 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであって、少なくとも 10 ヌクレオチド長、例えば少なくとも 12 ~ 30 ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、哺乳動物 RTE L 1 標的核酸、特にヒト RTE L 1 核酸に対して少なくとも 95 % 相補的、例えば完全に相補的である、オリゴヌクレオチドに関する。これらのオ

50

リゴヌクレオチドは R T E L 1 の発現を阻害することができる。

【0278】

本発明の一態様は、12～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであって、哺乳動物 R T E L 1 に対して少なくとも90%相補的、例えば完全に相補的である、少なくとも10ヌクレオチド長、例えば10～30ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドに関する。

【0279】

本発明のさらなる態様は、配列番号1の標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば完全に相補的である、12～20、例えば15～22ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドに関する。

10

【0280】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、10～30ヌクレオチド長の連続配列を含み、これは、標的核酸又は標的配列の領域と、少なくとも90%相補的であり、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、又は100%相補的である。

【0281】

本発明で使用するためのオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に完全に相補的（100%相補的）である場合、又はいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間に1つ又は2つのミスマッチを含み得る場合に有利である。

20

【0282】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号1の対応する標的核酸領域に対して100%相補的である。

【0283】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号1及び配列番号2の標的核酸に対して少なくとも95%相補性、例えば完全に（又は100%）相補的である。

【0284】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1に存在する対応する標的配列に対して少なくとも90%相補的であり、例えば100%の相補性を有する15～22ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、ここで、該標的配列は、配列番号3～26（表7）又は表8Aの領域1A～959Aからなる群から選択される。

30

表8A：本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドを用いて標的化され得る配列番号1の領域

【0285】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1に存在する対応する標的配列に対して少なくとも90%相補的であり、例えば100%の相補性を有する16～20、例えば15～22ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、ここで、該標的配列は、配列番号3～26（表7）又は表8Bの領域B1～B28からなる群から選択される。

40

【0286】

本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12～60ヌクレオチド長、例えば13～50、例えば14～35、例えば15～30、例えば16～20連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0287】

いくつかの実施形態では、標的核酸に相補的であるオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、12～30、例えば13～25、例えば15～23、例えば16～22連続

50

ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0288】

いくつかの実施形態では、標的核酸に相補的である *s i R N A* 又は *s h R N A* の連続ヌクレオチド配列は、18～28、例えば19～26、例えば20～24、例えば21～23連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0289】

いくつかの実施形態では、標的核酸に相補的な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、12～22、例えば14～20、例えば16～20、例えば15～21、例えば15～18、例えば16～18、例えば16～17の連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0290】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、表9Aに列挙された配列からなる群より選択される配列を含むか又はそれらからなる。

【0291】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号27～246（表9Aに列挙したモチーフ配列を参照）からなる群より選択される配列と少なくとも90%、好ましくは100%の同一性を有する、10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号27；28；29；30；31；32；33；34；37；40；41；42；43；44；45；46；47；48；51；54；88；114；135；208；237；243；244；245及び246から選択される。

【0292】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号243から選択される。

【0293】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号244から選択される。

【0294】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号245から選択される。

【0295】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号246から選択される。

【0296】

連続オリゴヌクレオチド配列（モチーフ配列）は、例えばヌクレアーゼ耐性及び／又は標的核酸に対する結合親和性を増大させるために修飾され得ることが理解される。

【0297】

修飾ヌクレオシド（高親和性修飾ヌクレオシドなど）がオリゴヌクレオチド配列に組み込まれるパターンは、一般にオリゴヌクレオチド設計と称される。

【0298】

オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド及びRNAヌクレオシド（特に、*s i R N A* 及び *s h R N A* 分子）又はDNAヌクレオシド（特に、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド）を用いて設計され得る。高親和性修飾ヌクレオシドを用いることが有利である。

【0299】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、又は少なくとも16個の修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1～10個の修飾ヌクレオシド、例えば2～9個の修飾ヌクレオシド、例えば3～8個の修飾ヌクレオシド、例えば4～

10

20

30

40

50

7 個の修飾ヌクレオシド、例えば 6 又は 7 個の修飾ヌクレオシドを含む。好適な修飾は、「修飾ヌクレオシド」、「高親和性修飾ヌクレオシド」、「糖修飾」、「2' 糖修飾」、及びロックド核酸 (LNA) の「定義」セクションに記載されている。

【0300】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1 つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば 2' 糖修飾ヌクレオシドを含む。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸 (ANA)、2'-フルオロ-ANA、及び LNA ヌクレオシドからなる群から独立して選択される 1 つ又は複数の 2' 糖修飾ヌクレオシドを含む。修飾ヌクレオシド (複数可) の 1 つ又は複数がロックド核酸 (LNA) である場合、有利である。

10

【0301】

さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。好適なヌクレオシド間修飾は、「修飾ヌクレオシド間結合」の「定義」セクションに記載されている。オリゴヌクレオチドの 5' 末端又は 3' 末端における少なくとも 2~3 個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である場合、有利である。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドについて、連続ヌクレオチド配列内の少なくとも 75%、例えば全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であれば有利である。いくつかの実施形態では、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続配列中の全ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

20

【0302】

本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの LNA ヌクレオシド、例えば 1、2、3、4、5、6、7、又は 8 個の LNA ヌクレオシド、例えば 2~6 個の LNA ヌクレオシド、例えば 3~7 個の LNA ヌクレオシド、4~8 個の LNA ヌクレオシド、又は 3、4、5、6、7、若しくは 8 個の LNA ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオシドの少なくとも 75%、例えば修飾ヌクレオシドの 80%、例えば 85%、例えば 90% が LNA ヌクレオシドである。なおさらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオシドの全ては、LNA ヌクレオシドである。さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ベーター-D-オキシ-LNA と、以下の LNA ヌクレオシド：ベーター-D 又はアルファ-L 立体配置のいずれかのチオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、ScET、及び/又は ENA の 1 つ又は複数との両方、又はそれらの組み合わせを含んでもよい。さらなる実施形態では、全 LNA シトシン単位は、5-メチル-シトシンである。オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列のヌクレアーゼ安定性にとって、ヌクレオチド配列の 5' 末端に少なくとも 1 つの LNA ヌクレオシドと 3' 末端に少なくとも 2 つの LNA ヌクレオシドとを有することが有利である。

30

【0303】

本発明の一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、RNase H を動員することが可能である。

【0304】

本発明において、有利な構造設計は、例えば、「ギャップマー」、「LNA ギャップマー」、及び「MOE ギャップマー」の「定義」セクションに記載されているギャップマー設計である。本発明では、アンチセンスオリゴヌクレオチドが F-G-F' 設計のギャップマーである場合が有利である。いくつかの実施形態では、ギャップマーは、均一フラックを有する LNA ギャップマーである。

40

【0305】

古典的なギャップマー設計、すなわち、均一なフラック (例えば 4-12-2) を有するギャップマーでは、フラック (F 及び F') 内の全てのヌクレオチドは、同じタイプの 2' 糖修飾ヌクレオシド、例えば LNA、cET 又は MOE、及びギャップ (G) を形成する中央の DNA のストレッチで構成される。交互フラック設計のギャップマーでは、オ

50

リゴヌクレオチドのフランクは一連の整数として注釈が付けられ、ベーターD-オキシLNAヌクレオシド(L)の数とそれに続くDNAヌクレオシド(D)の数を表す。例えば、1-2-1-1-3モチーフを有するフランクF'は、LDDL D L L Lを表す(CMP番号246__1;表9A又は9Bを参照)。両方のフランクは5'末端及び3'末端にベーターD-オキシLNAヌクレオシドを有する。ギャップ領域(G)は、フランクの間に位置するいくつかのDNAヌクレオシドで構成されている。

【0306】

本発明のいくつかの実施形態では、LNAギャップマーは、以下のフランク設計から選択される：2-12-3、4-14-2、3-10-3、3-9-3、2-15-2、2-12-4、1-13-2、3-13-2、4-13-2、2-12-2、3-12-2、3-15-2、3-14-2、3-13-3、2-14-4、3-12-3、1-14-3、3-14-3、2-14-3、2-15-3、3-11-3、1-12-3、1-11-4、1-13-2、2-13-2、2-16-2、1-14-2、1-17-3、1-18-2、4-12-2、2-13-4、2-11-1-2-1-1-3、及び2-17-4。

10

20

30

40

50

【表 9 A - 1】

表 9 A : オリゴヌクレオチドモチーフ配列 (配列番号で示される)、これらの設計、及びモチーフ配列に基づいて設計された特定のオリゴヌクレオチド化合物 (CMP 番号で示される) のリスト

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP 番号	配列番号 1 における開始位置
27	catggaaggacagtgg	2-12-3	CAtggaaggacagtGGT	27_1	8295
28	agctttattataactgaat	4-14-2	AGCTttattataactgaAT	28_1	8684
29	cgggacaggtagtaag	3-10-3	CGGgacaggtagTAA	29_1	9668
30	cgggacaggtagtaa	3-9-3	CGGgacaggtagTAA	30_1	9669
31	gcatccaacaagtaattgt	2-15-2	GCatccaacaagtaattGT	31_1	9722
32	gcatccaacaagtaattg	2-12-4	GCatccaacaagtaATTG	32_1	9723
33	ggcatccaacaagtaatt	3-13-2	GGCatccaacaagtaaTT	33_1	9724
34	ggttgggttagaagct	2-12-2	GGTtgggttagaagCT	34_1	10921
35	gctttacatttaggttat	3-15-2	GCTttacatttaggttAT	35_1	11483
36	catgttccttctataact	3-14-2	CATgttccttctataaCT	36_1	11512
37	agctttaaatttggtgaa	3-13-3	AGCtttaaatttggTGAA	37_1	11622
38	ttttacatactctggcaaa	2-14-4	TTttacatactctggCAAA	38_1	11753
39	ttttacatactctggca	3-12-3	TTTttacatactctggTCA	39_1	11755
40	gaattttacatactctggc	3-14-3	GAAttttacatactctGTC	40_1	11756
41	gaattttacatactctggt	2-14-3	GAattttacatactctGGT	41_1	11757
42	gagaattttacatactctgg	2-15-3	GAGaattttacatactTGG	42_1	11758
43	atcttgaacacgtctt	3-11-3	ATCttgaacacgtCTT	43_1	12868
44	acaaaaaacagtaggtcc	2-12-4	ACaaaaaacagtagGTCC	44_1	13234
45	ggaataaaacagtaggtc	2-12-4	GGaataaaacagtaGGTC	45_1	13551
46	agcttcgtcaaagatcac	3-13-2	AGCttcgtcaaagatCAC	46_1	14786
47	ggtgggtggatgttc	1-12-3	GgtgggtggatgTTC	47_1	18085
47	ggtgggtggatgttc	1-11-4	GgtgggtggatgTTTC	47_2	18085
47	ggtgggtggatgttc	1-13-2	GgtgggtggatgtTC	47_3	18085
48	ggtggtgtggagaagc	1-12-3	GgtggtgtggagaAGC	48_1	22425
48	ggtggtgtggagaagc	1-13-2	GgtggtgtggagaGC	48_2	22425
49	gctcatactccacacac	2-13-2	GCtcatactccacacAC	49_1	33030
50	catcggaaccctgtagtc	2-16-2	CAtcggaaccctgtagTCC	50_1	35103
51	gatacagacctcctcaaac	2-15-2	GAtacagacctcctcaaAC	51_1	35371
52	ggtggagggtggtgctgc	1-14-2	GgtggagggtggtgctGC	52_1	35636
53	agggtgagggtggtgct	1-12-3	AggtgagggtggtGCT	53_1	35638
54	tgggtgggagtagca	2-12-2	TGgttgggagtagCA	54_1	36915
55	cgatggcgagaaatta	4-10-2	CGATggcgagaaatTA	55_1	3824

10

20

30

40

50

【表 9 A - 2】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号1における開始位置
56	taattcagcaaaaaagccca	3-15-2	TAAttcagcaaaaaagccCA	56__1	3858
57	aagaatctgacaccca	2-12-3	AAgaatctgacaccCCA	57__1	3924
58	agacagccaagaatctgacac	1-18-2	AgacagccaagaatctgacAC	58__1	3928
59	cagccaagaatctgaca	2-12-3	CAGccaagaatctgACA	59__1	3929
60	acaggaacccgacag	2-10-3	ACaggaacccgaCAG	60__1	4496
61	gttactctctgtttctcac	1-18-2	GttactctctgtttctcAC	61__1	4789
62	ttactctctgtttctca	1-16-2	TtactctctgtttctCA	62__1	4790
62	ttactctctgtttctca	1-14-4	TtactctctgtttcTTCA	62__2	4790
63	gttactctctgtttctc	2-15-2	GTtactctctgtttctTC	63__1	4791
64	cgtgggtggagaagca	1-13-2	CgtgggtggagaagCA	64__1	5717
65	acgtgggtggagaagc	2-12-2	ACgtgggtggagaaGC	65__1	5718
66	cagaaactgtaaggga	1-13-3	CagaaactgtaaggGCA	66__1	5815
67	agggatagcagggaagg	2-13-2	AGggatagcagggaGG	67__1	7246
68	gcttaaacacagacaga	2-11-4	GCttaaacacagaCAGA	68__1	7501
69	tgcctaaacacagacag	3-11-3	TGCttaaacacagaCAG	69__1	7502
70	cagggcagggagaagacag	1-14-3	CagggcagggagaagCAG	70__1	7845
71	catggaaggacagtgg	3-10-3	CATggaaggacagTGG	71__1	8296
71	catggaaggacagtgg	1-12-3	CatggaaggacagTGG	71__2	8296
72	ccccctcaatataagaa	3-12-2	CCCctcaatataagAA	72__1	8705
73	aaccaaccctattcctgg	2-14-2	AAccaaccctattcctGG	73__1	9375
73	aaccaaccctattcctgg	1-15-2	AaccaaccctattcctGG	73__2	9375
74	accaaccctattcctg	1-12-3	AccaaccctattcCTG	74__1	9376
75	aaccaaccctattcctg	3-12-2	AACcaaccctattcTG	75__1	9376
76	aaaaccaaccctattcct	3-12-3	AAAaccaaccctattCCT	76__1	9377
77	aaaccaaccctattcc	4-10-2	AAACcaaccctattCC	77__1	9378
78	ggtagtaagggcacacc	1-14-2	GgtagtaagggcacaCC	78__1	9660
79	gacaggtagtaagggcacac	1-17-2	GacaggtagtaagggcacAC	79__1	9661
80	gtagtaagggcacac	3-9-3	GTAgtagggcacaCAC	80__1	9661
81	gacaggtagtaagggcaca	1-16-2	GacaggtagtaagggcCA	81__1	9662
82	acaggtagtaagggcaca	2-14-2	ACaggtagtaagggcCA	82__1	9662
83	gacaggtagtaagggcaca	2-13-2	GAcaggtagtaagggcCA	83__1	9664
84	cgggacaggtagtaagg	1-15-2	CgggacaggtagtaagGG	84__1	9666
85	catccaacaagtaattgt	3-12-3	CATccaacaagtaatTGT	85__1	9722
85	catccaacaagtaattgt	2-13-3	CATccaacaagtaatTGT	85__2	9722
86	ggcatccaacaagtaattgt	1-16-3	GgcatccaacaagtaatTGT	86__1	9722

10

20

30

40

50

【表 9 A - 3】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号1における開始位置
87	ggcatccaacaagtaattg	3-14-2	GGCatccaacaagtaatTG	87_1	9723
87	ggcatccaacaagtaattg	1-15-3	GgcatccaacaagtaaTTG	87_2	9723
88	ggcatccaacaagtaat	4-11-2	GGCAtccaacaagtaAT	88_1	9725
88	ggcatccaacaagtaat	3-12-2	GGCatccaacaagtaAT	88_2	9725
89	cgtgaaggagagaaacct	2-12-3	CGtgaaggagagaaCCT	89_1	10036
90	acgtgaaggagagaacc	3-12-2	ACGtgaaggagagaaCC	90_1	10037
90	gacgtgaaggagagaacc	2-13-3	GAegtgaaggagagaACC	90_2	10037
91	gacgtgaaggagagaacc	2-14-2	GAegtgaaggagagaaCC	91_1	10037
91	acgtgaaggagagaacc	4-11-2	ACGTgaaggagagaaCC	91_2	10037
92	gacgtgaaggagagaac	2-11-4	GACgtgaaggagaGAAC	92_1	10038
93	cagtcttgctatgcct	2-12-2	CAGtcttgctatgcCT	93_1	10563
94	ctagaatcaaagctcca	2-12-3	CTagaatcaaagctCCA	94_1	10591
95	acatcgcaacttgggc	1-12-2	AcategcaacttggGC	95_1	10705
96	cacggcaaacctcacc	1-12-3	CaeggcaaacctcACC	96_1	10851
97	aaccacggcaaacctcac	3-13-2	AACcaeggcaaacctcAC	97_1	10852
98	caaagcacgagtcacc	1-13-3	CaaagcacgagtcACC	98_1	10873
99	tcaaagcacgagtcac	1-13-3	TcaaagcacgagtcCAC	99_1	10874
100	ctggttgggttagaag	2-10-4	CTggttgggttagAAG	100_1	10923
100	ctggttgggttagaag	2-12-2	CTggttgggttagAG	100_2	10923
101	tataacttttagtttagc	2-12-4	TAtaacttttagttTAGC	101_1	11501
102	ttcctttctataacttt	4-12-2	TTCCtttctataactTT	102_1	11509
103	gttcctttctataacttt	4-13-2	GTTCCtttctataactTT	103_1	11509
104	gttcctttctataacttt	4-12-2	GTTCCtttctataactTT	104_1	11510
105	atgttcctttctataacttt	2-15-3	ATgttcctttctataacTTT	105_1	11510
106	atgttcctttctataacttt	2-14-3	ATgttcctttctataaCTT	106_1	11511
107	atgttcctttctataact	2-14-2	ATgttcctttctataaCT	107_1	11512
108	gctttaatctgccttc	1-11-4	GctttaatctgcCTTC	108_1	12697
109	ccgtggctttaatctgc	1-14-2	CegtggctttaatctGC	109_1	12701
110	ccgtggctttaatctg	2-12-2	CCgtggctttaatcTG	110_1	12702
110	ccgtggctttaatctg	3-11-2	CCGtggctttaatcTG	110_2	12702
111	caaaaaacagtaggtcc	2-11-4	CAaaaaacagtagGTCC	111_1	13234
111	caaaaaacagtaggtcc	3-11-3	CAaaaaacagtagTCC	111_2	13234
112	gaataaaacagtaggtcc	2-12-4	GAataaaacagtagGTCC	112_1	13550
113	ggaataaaacagtaggtcc	4-13-2	GGAAtaaaacagtagtCC	113_1	13550
113	ggaataaaacagtaggtcc	2-15-2	GGaataaaacagtagtCC	113_2	13550

10

20

30

40

50

【表 9 A - 4】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号1における開始位置
113	ggaataaaacagtaggtcc	1-14-4	GgaataaaacagtagGTCC	113_3	13550
114	ggaataaaacagtaggt	3-11-3	GGaataaaacagtagGGT	114_1	13552
114	ggaataaaacagtaggt	2-11-4	GGaataaaacagtagAGGT	114_2	13552
115	ggaataaaacagtagg	2-10-4	GGaataaaacagtagTAGG	115_1	13553
116	cacagagtgtcatggg	1-13-2	CacagagtgtcatgGG	116_1	14032
117	acagcatggaaaggcacg	1-13-4	AcagcatggaaaggCACG	117_1	14523
118	cagcatggaaaggcacg	1-12-4	CagcatggaaaggCACG	118_1	14523
119	tacaggaggaagagaaggac	1-18-2	TacaggaggaagagaaggAC	119_1	14725
120	acaggaggaagagaaggg	1-13-4	AcaggaggaagagaAGGG	120_1	14727
121	tctacaggaggaagagaa	4-12-2	TCTAcaggaggaagagAA	121_1	14730
121	tctacaggaggaagagaa	1-13-4	TctacaggaggaagAGAA	121_2	14730
122	tctacaggaggaagaga	4-11-2	TCTAcaggaggaagaGA	122_1	14731
122	tctacaggaggaagaga	2-12-3	TCtacaggaggaagAGA	122_2	14731
122	tctacaggaggaagaga	2-11-4	TCtacaggaggaagAGA	122_3	14731
123	ctctgcaaaagatcacg	2-11-4	CTctgcaaaagatCACG	123_1	14785
124	gctctgcaaaagatcacg	2-13-3	GCtctgcaaaagatACG	124_1	14785
125	gctctgcaaaagatcac	3-11-3	GCTctgcaaaagatCAC	125_1	14786
125	gctctgcaaaagatcac	2-13-2	GCtctgcaaaagatAC	125_2	14786
126	ccagaaagggttgcg	3-10-2	CCAgaaagggttgCG	126_1	14874
127	tccagaaagggttgcg	3-11-2	TCCagaaagggttgCG	127_1	14874
127	tccagaaagggttgcg	1-12-3	TccagaaagggttGCG	127_2	14874
128	cagaggcatcggtacg	2-13-2	CAGaggcatcggtacAG	128_1	14974
129	cagaggcatcggtaca	3-11-2	CAGaggcatcggtacCA	129_1	14975
130	agcagaggcatcggtac	2-13-2	AGcagaggcatcggtacTC	130_1	14976
131	attctcacacatcttc	2-11-4	ATtctcacacatCTTC	131_1	16133
132	ctatgaacgcacctg	3-9-3	CTAtgaacgcacCTG	132_1	16282
133	ggctatgaacgcacctg	1-14-2	GgctatgaacgcaccTG	133_1	16282
134	gctgggagaagacatag	1-12-4	GctgggagaagacATAG	134_1	16593
135	caaaatgcccttacagtga	4-13-2	CAAAatgcccttacagtGA	135_1	16919
136	caaaatgcccttacagt	2-12-3	CAaaatgcccttacAGT	136_1	16921
137	tgtgcgattttaaggaaaat	3-15-3	TGTgegattttaaggaaAAT	137_1	17525
138	catgtgcgattttaaggaaa	3-15-3	CATgtgcgattttaaggAAA	138_1	17527
139	tgtgcgattttaaggaa	4-12-2	TGTGegattttaaggAA	139_1	17528
140	catgtgcgattttaaggaa	1-15-3	CatgtgcgattttaaaGGA	140_1	17529
141	atgtgcgattttaaggaa	3-13-2	ATGtgcgattttaagGA	141_1	17529

10

20

30

40

50

【表 9 A - 5】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号 1 における開始位置
1 4 2	accctgtcacttaaatatg	1-18-2	AccctgtcacttaaatataTG	1 4 2__1	1 7 7 1 2
1 4 3	gaggagggtggagcgtt	1-14-2	GaggagggtggagcgtTT	1 4 3__1	1 7 9 2 4
1 4 4	ctgaagagtggaagg	2-11-4	CTgaagagtggaaggAAGG	1 4 4__1	1 8 1 3 0
1 4 4	ctgaagagtggaagg	1-13-3	CtgaagagtggaaggAGG	1 4 4__2	1 8 1 3 0
1 4 5	caataataaagtgtagga	3-14-3	CAataataaagtgtagGA	1 4 5__1	1 8 4 5 4
1 4 6	caaccagtaacctgac	3-13-2	CAaccagtaacctgAC	1 4 6__1	1 9 4 2 4
1 4 7	caaccagtaacctga	3-12-2	CAaccagtaacctGA	1 4 7__1	1 9 4 2 5
1 4 8	accaaccagtaacctga	1-16-2	AccaaccagtaacctGA	1 4 8__1	1 9 4 2 5
1 4 9	gagcagggtttatc	3-11-2	GAGcagggtttatTC	1 4 9__1	1 9 8 2 5
1 5 0	ggtcgaggaggtgcac	1-14-2	GgtcgaggaggtgcAC	1 5 0__1	2 0 4 3 7
1 5 0	ggtcgaggaggtgcac	2-13-2	GGtcgaggaggtgcAC	1 5 0__2	2 0 4 3 7
1 5 1	gtcgaggaggtgcac	1-11-4	GtcgaggaggtgTCAC	1 5 1__1	2 0 4 3 7
1 5 2	ggtcgaggaggtgtca	1-13-2	GgtcgaggaggtgtCA	1 5 2__1	2 0 4 3 8
1 5 2	ggtcgaggaggtgtca	1-12-3	GgtcgaggaggtgtTCA	1 5 2__2	2 0 4 3 8
1 5 3	ggtcgaggaggtgtc	2-11-2	GGtcgaggaggtgtTC	1 5 3__1	2 0 4 3 9
1 5 4	ccagggtctaaaaagg	1-13-3	CcagggtctaaaaGGG	1 5 4__1	2 0 6 5 3
1 5 5	attacgtgaggaca	1-10-4	AttaegctgagGACA	1 5 5__1	2 1 4 8 9
1 5 6	cattacgtgaggac	4-9-2	CATTaegctgaggAC	1 5 6__1	2 1 4 9 0
1 5 7	ctgagcattacgc	3-8-3	CTTgagcattaCGC	1 5 7__1	2 1 4 9 7
1 5 8	cgaggagaagaaggcag	3-12-2	CGaggagaagaaggcAG	1 5 8__1	2 2 0 1 9
1 5 8	cgaggagaagaaggcag	2-11-4	CGaggagaagaagGCAG	1 5 8__2	2 2 0 1 9
1 5 9	ccttggtctgaaacgtgat	1-15-3	CcttggtctgaaacgtGAT	1 5 9__1	2 2 0 7 1
1 6 0	ctaagcctccacgc	1-12-2	CtaaegcctccacGC	1 6 0__1	2 2 2 8 1
1 6 1	ggacaggctctacgg	1-11-3	GgacaggctctaCGG	1 6 1__1	2 2 3 1 2
1 6 2	actaatacagcaggagaagg	2-16-2	ACtaatacagcaggagaGG	1 6 2__1	2 2 9 6 4
1 6 3	aactaatacagcaggagaagg	1-16-4	AactaatacagcaggagAAGG	1 6 3__1	2 2 9 6 4
1 6 3	aactaatacagcaggagaagg	1-17-3	AactaatacagcaggagaAGG	1 6 3__2	2 2 9 6 4
1 6 4	taactaatacagcaggagaag	1-16-4	TaactaatacagcaggagaAAG	1 6 4__1	2 2 9 6 5
1 6 5	ttgaagagccaaccac	1-11-4	TtgaagagccaacCCAC	1 6 5__1	2 4 1 3 1
1 6 6	ccattttcactgtcaag	3-12-2	CCattttcactgtcaAG	1 6 6__1	2 5 6 0 5
1 6 7	gccattttcactgtcaa	2-12-3	GCattttcactgtCAA	1 6 7__1	2 5 6 0 6
1 6 8	agaaatgcggagaagc	2-10-4	AGaaatgaggagAAGC	1 6 8__1	2 5 7 9 6
1 6 9	aaatggaaaaatgaccagc	2-14-4	AAatggaaaaatgacCAGC	1 6 9__1	2 6 1 8 8
1 7 0	aggacttacgacaaaaccac	1-15-4	AggacttaegacaaaaCCAC	1 7 0__1	2 6 5 0 5
1 7 1	ggacttacgacaaaacca	2-13-3	GGacttaegacaaaaCCA	1 7 1__1	2 6 5 0 6

10

20

30

40

50

【表 9 A - 6】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号 1 における開始位置
172	gacttacgacaaaacca	3-11-3	GACTtaegacaaaCCA	172__1	26506
173	acaccaggacttacgaca	1-14-3	AcaccaggacttaegACA	173__1	26512
174	tagaaattcaacatggc	1-12-4	TagaaattcaacaTGGC	174__1	27376
174	tagaaattcaacatggc	4-11-2	TAGAaattcaacatgGC	174__2	27376
174	tagaaattcaacatggc	2-12-3	TAGaaattcaacatGGC	174__3	27376
175	ctagaaattcaacatggc	2-13-3	CTagaaattcaacatGGC	175__1	27376
176	gtcatcggtcacc	1-9-4	GtcatcggttCACC	176__1	27602
177	actgaagacgcca	2-8-4	ACTgaagacGCCA	177__1	28539
178	gactcgaagacgcc	3-9-2	GACTegaagaegCC	178__1	28540
179	ggcacaagcagaacgac	2-13-2	GGcacaagcagaacgAC	179__1	29235
180	agtcagaacaaaggaggc	1-15-2	AgtcagaacaaaggagGC	180__1	29668
181	gaagtcagaacaaaggag	4-12-2	GAAGtcagaacaaaggAG	181__1	29670
182	gcagaagtcagaacaaagg	1-14-4	GcagaagtcagaacaAAGG	182__1	29672
183	gtgcagaagtcagaacaaa	3-13-3	GTGcagaagtcagaacAAA	183__1	29674
183	gtgcagaagtcagaacaaa	3-14-2	GTGcagaagtcagaacaAA	183__2	29674
184	gtgcagaagtcagaacaaa	3-13-2	GTGcagaagtcagaacAA	184__1	29675
185	aaggatgaggagcggac	1-14-3	AaggatgaggagcggGAC	185__1	29894
186	gtaaggatgaggagc	2-12-2	GTaaggatgagggaGC	186__1	29898
187	tggtaaggatgaggag	1-12-4	TggtaaggatgagGGAG	187__1	29899
188	cgtacatctgcatctc	2-10-4	CGtacatctgcaTCTC	188__1	29951
189	tgtagataagaggcaacact	1-18-2	TgtagataagaggcaacaCT	189__1	30947
190	ttgtagataagaggcaacac	1-17-3	TtgtagataagaggcaaCAC	190__1	30948
191	ttgtagataagaggcaaca	2-14-4	TTgtagataagaggcAACA	191__1	30949
192	ttgtagataagaggcaaca	2-17-2	TTgtagataagaggcaaCA	192__1	30949
193	tgtagataagaggcaa	2-11-4	TGtagataagagGCAA	193__1	30951
194	ctggaaggaaagttggt	2-12-3	CTggaaggaaagttGGT	194__1	31229
195	atagtaagcactgatggc	3-14-2	ATAgtaagcactgatggTC	195__1	31245
195	atagtaagcactgatggc	1-14-4	AtagtaagcactgatGGTC	195__2	31245
196	tagtaagcactgatgg	2-11-3	TAgtaagcactgaTGG	196__1	31247
197	catagtaagcactgatg	3-12-2	CATagtaagcactgaTG	197__1	31248
197	catagtaagcactgatg	2-11-4	CATagtaagcactGATG	197__2	31248
198	ctgtaactcacctggc	1-13-2	CtgtaactcacctgGC	198__1	31835
198	ctgtaactcacctggc	2-12-2	CTgtaactcacctgGC	198__2	31835
199	cggatcactcgcccg	1-12-2	CggatcactcgccCG	199__1	32000
200	acacaggctactctcgg	1-14-2	AcacaggctactctcGG	200__1	33017

10

20

30

40

50

【表 9 A - 7】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号1における開始位置
201	acacaggctactctcg	3-10-3	ACAcaggctactcTCG	201__1	33018
202	ccacacacaggctactc	1-14-2	CcacacacaggctacTC	202__1	33021
203	atactccacacacaggct	1-15-2	AtactccacacacaggCT	203__1	33025
204	atactccacacacaggc	1-14-2	AtactccacacacagGC	204__1	33026
205	gctcatactccacacacag	1-16-2	GctcatactccacacacAG	205__1	33028
206	tcatactccacacacag	2-11-4	TCatactccacacACAG	206__1	33028
206	tcatactccacacacag	2-13-2	TCatactccacacacAG	206__2	33028
207	gctcatactccacacaca	1-14-3	GctcatactccacacACA	207__1	33029
207	gctcatactccacacaca	1-15-2	GctcatactccacacaCA	207__2	33029
208	tgctcatactccacacac	1-14-3	TgctcatactccacaCAC	208__1	33030
208	tgctcatactccacacac	1-15-2	TgctcatactccacacAC	208__2	33030
208	tgctcatactccacacac	2-14-2	TGctcatactccacacAC	208__3	33030
209	agcaggaagcagggagaaa	2-15-2	AGcaggaagcagggagaAA	209__1	33562
210	tcgaccacacagcgag	2-11-2	TCgaccacacagagAG	210__1	33681
211	cagaagccaaggacatg	1-14-3	CagaagccaaggacATG	211__1	34432
211	cagaagccaaggacatg	2-14-2	CAgaagccaaggacaTG	211__2	34432
212	cagaagccaaggacat	2-12-3	CAgaagccaagggaCAT	212__1	34433
213	ccagaccaacacggaaacg	1-14-4	CcagaccaacaegggaAACG	213__1	34571
214	ccagaccaacacggaaac	2-12-4	CCagaccaacaeggAAAC	214__1	34572
215	gaatgggcaaagggtaga	4-12-2	GAATgggcaaagggtGA	215__1	34742
215	aatgggcaaagggtaga	2-12-3	AAatgggcaaagggtAGA	215__2	34742
216	gaatgggcaaagggtaga	2-14-2	GAatgggcaaagggtGA	216__1	34742
217	gaatgggcaaagggtag	2-12-3	GAatgggcaaagggtAG	217__1	34743
218	gaacctgttagtctg	1-14-2	GaacctgttagtccTG	218__1	35101
219	aacctgttagtct	4-9-2	AACctgttagtctCT	219__1	35102
220	ggaacctgttagtc	2-11-2	GGaacctgttagTC	220__1	35104
221	atcggaacctgttagtc	2-14-2	ATcggaacctgttagTC	221__1	35104
221	atcggaacctgttagtc	1-15-2	AtcggaacctgttagTC	221__2	35104
222	catcggaacctgttagtc	1-16-2	CatcggaacctgttagTC	222__1	35104
223	catcggaacctgttagt	2-14-2	CAtcggaacctgtgaGT	223__1	35105
224	gatacagacctctcaaac	1-17-2	GatacagacctctcaaaCT	224__1	35370
225	gatacagacctctcaaac	2-14-3	GAtacagacctctcaAAC	225__1	35371
226	gatacagacctctcaaaa	2-13-3	GAtacagacctctcAAA	226__1	35372
226	gatacagacctctcaaaa	2-12-4	GAtacagacctctCAAA	226__2	35372
226	gatacagacctctcaaaa	1-13-4	GatacagacctctCAAA	226__3	35372

10

20

30

40

50

【表 9 A - 8】

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP番号	配列番号 1 における開始位置
2 2 7	gatacagacctctcaaa	2-1 1-4	GAtacagacctctCAA	2 2 7__1	3 5 3 7 3
2 2 7	gatacagacctctcaaa	1-1 3-3	GatacagacctctCAA	2 2 7__2	3 5 3 7 3
2 2 8	gccccatttaccagt	1-1 3-2	GccccatttaccagTG	2 2 8__1	3 5 4 7 0
2 2 9	ccaacaagtgtatgct	2-1 2-2	CCaacaagtgtatgCT	2 2 9__1	3 5 9 6 5
2 3 0	ccaacaagtgtatgc	2-1 1-2	CCaacaagtgtatGC	2 3 0__1	3 5 9 6 6
2 3 1	gtaccaagcccagaagg	1-1 4-2	GtaccaagcccagaaGG	2 3 1__1	3 6 2 7 9
2 3 2	gtaccaagcccagaag	1-1 1-4	GtaccaagcccaGAAG	2 3 2__1	3 6 2 8 0
2 3 3	ttctgtatgaagagatg	4-1 1-2	TTCCtgatgaagagaTG	2 3 3__1	3 6 5 4 9
2 3 4	tcctgtatgaagagatg	2-1 0-4	TCctgtatgaagaGATG	2 3 4__1	3 6 5 4 9
2 3 4	tcctgtatgaagagatg	3-1 1-2	TCCtgatgaagagaTG	2 3 4__2	3 6 5 4 9
2 3 5	tgggagtagcatggc	2-1 1-2	TGggagtagcatgGC	2 3 5__1	3 6 9 1 1
2 3 5	tgtgggagtagcatggc	1-1 4-2	TgtgggagtagcatgGC	2 3 5__2	3 6 9 1 1
2 3 6	gtgggagtagcatggc	1-1 3-2	GtgggagtagcatgGC	2 3 6__1	3 6 9 1 1
2 3 7	tgggagtagcatggc	1-1 1-3	TgggagtagcatGGC	2 3 7__1	3 6 9 1 1
2 3 8	aaacatgctgaacctg	2-1 1-4	AAacatgctgaacCCTG	2 3 8__1	3 7 2 5 4
2 3 9	acaaacatgctgaacct	2-1 3-3	ACaaacatgctgaacCCT	2 3 9__1	3 7 2 5 5
2 3 9	acaaacatgctgaacct	1-1 4-3	AcaaacatgctgaacCCT	2 3 9__2	3 7 2 5 5
2 3 9	acaaacatgctgaacct	3-1 3-2	ACAaacatgctgaaccCT	2 3 9__3	3 7 2 5 5
2 4 0	cacaaacatgctgaacc	2-1 4-2	CACaaacatgctgaacCC	2 4 0__1	3 7 2 5 6
2 4 1	cacaaacatgctgaacc	2-1 2-3	CACaaacatgctgaACC	2 4 1__1	3 7 2 5 7
2 4 2	tggacgcacaaacatgc	1-1 2-4	TggaegcacaaacATGC	2 4 2__1	3 7 2 6 3
2 4 3	aattttacatactctggt	2 4 3__1	AATTttacatactctgGT	4-1 2-2	1 1 7 5 7
2 4 4	aattttacatactctggtc	2 4 4__1	AATTttacatactctGGTC	2-1 3-4	1 1 7 5 6
2 4 5	ttacatactctggtcaaa	2 4 5__1	TTacatactctggtCAAA	2-1 2-4	1 1 7 5 3
2 4 6	ctttattataactgaatctc	2 4 6__1	CTttattataactTgaAtCTC	2-1 1-1- 2-1-1-3	8 6 8 1
2 4 6	ctttattataactgaatctc	2 4 6__2	CTttattataactgaaTCTC	2-1 7-4	8 6 8 1

モチーフ配列は、オリゴヌクレオチドに存在する核酸塩基の連続配列を表す。

【0 3 0 7】

設計とはギャップマー設計 F-G-F' を指す。ここで、各数は、連続修飾ヌクレオシドの数、例えば 2' 修飾ヌクレオシド（1 番目の数 = 5' フランク）、続いて DNA ヌクレオシドの数（2 番目の数 = ギャップ領域）、続いて修飾ヌクレオシドの数、例えば 2' 修飾ヌクレオシド（3 番目の数 = 3' フランク）、任意に、標的核酸に相補的である連続配列の一部である必要はない DNA 及び LNA のさらなる反復領域が前又は後にある修飾ヌクレオシドの数を表す。

【0 3 0 8】

オリゴヌクレオチド化合物は、モチーフ配列の特定の設計を表す。大文字はベーター D-オキシ LNA ヌクレオシドを表し、小文字は DNA ヌクレオシドを表し、全ての LNA

Cは5-メチルシトシンであり、5-メチルDNAシトシンは「e」で表し、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0309】

全ての場合において、F-G-F'設計は、「オリゴヌクレオチド中の領域D'又はD''」の「定義」セクションに記載されるように、領域D'及び／又はD''をさらに含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ギャップマー領域の5'末端又は3'末端に、1、2、又は3個のホスホジエステル結合ヌクレオシド単位、例えばDNA単位を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2つの5'ホスホジエステル結合DNAヌクレオシドと、続いて「定義」セクションで定義したF-G-F'ギャップマー領域と、からなる。5'末端又は3'末端にホスホジエステル結合されたDNA単位を含むオリゴヌクレオチドは、コンジュゲーションに好適であり、本明細書に記載されるようなコンジュゲート部分をさらに含み得る。肝臓への送達では、ASGPR標的化部分は、コンジュゲート部分として特に有利である。

【0310】

本発明のいくつかの実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP番号27__1; 28__1; 29__1; 30__1; 31__1; 32__1; 33__1; 34__1; 35__1; 36__1; 37__1; 38__1; 39__1; 40__1; 41__1; 42__1; 43__1; 44__1; 45__1; 46__1; 47__1; 47__2; 47__3; 48__1; 48__2; 49__1; 50__1; 51__1; 52__1; 53__1; 54__1; 135__1; 114__1; 88__1; 208__1; 237__1; 243__1; 244__1; 245__1、246__1及び246__2を有するオリゴヌクレオチド化合物からなる群から選択される(表9A及び9B参照)。

【0311】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド化合物243__1; 242__1; 245__1、246__1及び246__2の群から選択される(表9A及び9B参照)。

【0312】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは化合物番号243__1である(表9A及び9B参照)。

【0313】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは化合物番号244__1である(表9A及び9B参照)。

【0314】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは化合物番号245__1である(表9A及び9B参照)。

【0315】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは化合物番号246__1である(表9A及び9B参照)。

【0316】

本発明の好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは化合物番号246__2である(表9A及び9B参照)。

【0317】

本発明のいくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号13の標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば完全に相補的である、12~22ヌクレオチド、例えば15~20ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0318】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号16の標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば完全に相補的である、15~18ヌクレオチド、例えば17又は18ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0319】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 15 の標的核酸に対して少なくとも 90 % の相補性を有する、例えば完全に相補的である、15 ~ 19 ヌクレオチド、例えば 18 又は 19 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0320】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 14 の標的核酸に対して少なくとも 90 % の相補性を有する、例えば完全に相補的である、15 ~ 18 ヌクレオチド、例えば 17 又は 18 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0321】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 の標的核酸に対して少なくとも 90 % の相補性を有する、例えば完全に相補的である、12 ~ 22 ヌクレオチド、例えば 17 ~ 22 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0322】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 1 の以下の領域：配列番号 1 の 8681 ~ 8701；配列番号 1 の 8681 ~ 8701、11753 ~ 11774；例えば、配列番号 1 のヌクレオチド 11757 ~ 11774、11756 ~ 11774、又は 11753 ~ 11770 から選択される標的核酸に対して少なくとも 90 % の相補性を有する、例えば完全に相補的である、15 ~ 22 ヌクレオチド、例えば 15 ~ 18 ヌクレオチド、例えば 17 又は 18 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0323】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、配列番号 243、244、245 及び 246 からなる群から選択される核酸塩基の配列、又はそれらの少なくとも 14 個の連続ヌクレオチドを含む。

【0324】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、10 ~ 30 ヌクレオチド長、例えば 12 ~ 25、例えば 11 ~ 22、例えば 12 ~ 20、例えば 14 ~ 18 又は 14 ~ 16 連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0325】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、22 以下のヌクレオチド、例えば 20 以下のヌクレオチド、例えば 18 以下のヌクレオチド、例えば 14、15、16 又は 17 ヌクレオチドを含むか、又はそれらからなる。本明細書で提供されるいずれの範囲も、範囲の終点を含むことを理解するべきである。したがって、オリゴヌクレオチドが 10 ~ 30 ヌクレオチドを含むと記される場合、10 ヌクレオチド及び 30 ヌクレオチドの両方が含まれる。

【0326】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、又は 22 連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0327】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、配列番号 243、244、245、及び 246 から選択される配列を含むか、又はそれらからなる。

【0328】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、12 ~ 24 ヌクレオチド長、例えば 12 ~ 18 ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 13 に存在する少なくとも 12 個、例えば少なくとも 13 個、例えば少なくとも 14 個、例えば少なくとも 15 個又は少なくとも 16 個の連続ヌクレオチドを含む連続ヌクレオチド配列を含む。

【0329】

本発明において有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号16に存在する少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む連続ヌクレオチド配列を含む。

【0330】

本発明において有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号15に存在する少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む連続ヌクレオチド配列を含む。

10

【0331】

本発明において有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号14に存在する少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む連続ヌクレオチド配列を含む。

【0332】

本発明において有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号5に存在する少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む連続ヌクレオチド配列を含む。

20

【0333】

有利な実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシド、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA及びLNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む。修飾ヌクレオシド(複数可)の1つ又は複数

30

がロックド核酸(LNA)である場合、有利である。

【0334】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオシドを含む。

【0335】

オリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、全てのLNAヌクレオシドは、ベータ-D-オキシLNAヌクレオシドである。

【0336】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。

40

【0337】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、2'-O-メトキシエチル(2'MOE)ヌクレオシドを含む。

【0338】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、2'-O-メトキシエチル(2'MOE)ヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。

【0339】

有利には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列の最も3'側のヌクレオシドは、2'糖修飾ヌクレオシドである。

【0340】

50

有利には、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートなどの少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む。

【0341】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0342】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、ホスホロジチオエートヌクレオシド間結合である。

【0343】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

【0344】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列内の全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0345】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列内のヌクレオシド間結合の少なくとも75%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0346】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列内のヌクレオシド間結合の全てが、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0347】

本発明の有利な実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNAse H、例えばRNAse H1を動員することができる。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、ギャップマーである。

【0348】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列は、式5'-F-G-F'-3'のギャップマーからなるか、又はそれを含む。

【0349】

いくつかの実施形態では、領域Gは、6~16個のDNAヌクレオシド、例えば11~16個のDNAヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、領域Fは2~4個のDNAヌクレオシドを含み、及び/又は、領域F'は2~6個のDNAヌクレオシドを含む。

【0350】

いくつかの実施形態では、領域F及びF'はそれぞれ、少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含む。

【0351】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、均一フラックを有するLNAギャップマーである。例えば、均一なフラックを有するLNAギャップマーは、以下の設計から選択される設計を有し得る：1-12-3、4-12-2、2-17-4、2-13-4及び2-12-4。表9Bは、各モチーフ配列の好ましい設計を列挙している。

【0352】

本発明のいくつかの実施形態では、LNAギャップマーは、交互フラックLNAギャップマーである。いくつかの実施形態では、交互フラックLNAギャップマーは、少なくとも1つの交互フラック（フラックF'等）を含む。いくつかの実施形態では、交互フラックLNAギャップマーは、1つの交互フラック（フラックF'等）及び1つの均一フラック（フラックF等）を含む。例えば、1つの交互のF'フラックを有するLNAギャップマーは、以下の設計を有し得る：2-11-1-2-1-3。

本発明は、以下のオリゴヌクレオチド化合物（表9B及び10）を提供する：

10

20

30

40

50

【表 9 B】

表 9 B：本発明で使用するための適切なオリゴヌクレオチドモチーフ配列（配列番号で示される）、これらの設計、及びモチーフ配列に基づいて設計された本発明で使用するための特定のオリゴヌクレオチド化合物（CMP 番号で示される）のリスト

配列番号	モチーフ配列	配列番号 1 における位置		変異	CMP 番号	オリゴヌクレオチド化合物
		開始	終了			
2 4 3	AATTTTACATACTCTGGT	1 1 7 5 7	1 1 7 7 4	4-1 2- 2	2 4 3__1	AATTTacatactctgGT
2 4 4	AATTTTACATACTCTGGTC	1 1 7 5 6	1 1 7 7 4	2-1 3- 4	2 4 4__1	AATttacatactctGGTC
2 4 5	TTACATACTCTGGTCAAA	1 1 7 5 3	1 1 7 7 0	2-1 2- 4	2 4 5__1	TTacatactctggtCAAA
2 4 6	CTTTATTATAACTTGAATCTC	8 6 8 1	8 7 0 1	2-1 1- 1-2-1 -1-3	2 4 6__1	CTttattataactTgaAtCTC
2 4 6	CTTTATTATAACTTGAATCTC	8 6 8 1	8 7 0 1	2-1 7- 4	2 4 6__2	CTttattataacttgaaTCTC

【表 1 0】

表 1 0．化合物表（本発明で使用するための例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチド）
－H E L M注釈フォーマット

配列番号	化合物番号	H E L M注釈 5' - 3' に書かれている	以下の図に示すコンジュゲートによって構成される。
2 4 3	2 4 3__1	[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)	1
2 4 4	2 4 4__1	[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	2
2 4 5	2 4 5__1	[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)	4
2 4 6	2 4 6__1	[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	3
2 4 6	2 4 6__2	[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])	

H e l m 注釈キー：

- [L R] (G) は、ベータ-D-オキシ-L N A グアニンヌクレオシドであり、
- [L R] (T) は、ベータ-D-オキシ-L N A チミンヌクレオシドであり、
- [L R] (A) は、ベータ-D-オキシ-L N A アデニンヌクレオシドであり、

〔L R〕（〔5 m e C〕）は、ベータ-D-オキシ-L N A 5-メチルシトシンヌクレオシドであり、

〔d R〕（G）は、DNA グアニンヌクレオシドであり、

〔d R〕（T）は、DNA チミンヌクレオシドであり、

〔d R〕（A）は、DNA アデニンヌクレオシドであり、

〔d R〕（C）は、DNA シトシンヌクレオシドであり、

〔s P〕は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、

P は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

〔0353〕

表9A及び9B中の見出し「オリゴヌクレオチド化合物」とは、モチーフ配列の特定の設計を表す。大文字はベータ-D-オキシ-L N Aヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのL N A Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。「設計」という見出しは、ギャップマー設計、F-G-F'を指す。古典的なギャップマー設計、すなわち、均一なフラunk（例えば4-12-2）を有するギャップマーでは、フラunk（F及びF'）内の全てのヌクレオチドは、同じタイプの2'糖修飾ヌクレオシド、例えばL N A、c E T又はM O E、及びギャップ（G）を形成する中央のDNAのストレッチで構成される。交互フラunk設計のギャップマーでは、オリゴヌクレオチドのフラunkは一連の整数として注釈が付けられ、ベータ-D-オキシ-L N Aヌクレオシド（L）の数とそれに続くDNAヌクレオシド（D）の数を表す。例えば、1-2-1-1-3モチーフを有するフラunk F'は、L D D L D L L Lを表す（CMP番号325__1を参照）。両方のフラunkは5'末端及び3'末端にベータ-D-オキシ-L N Aヌクレオシドを有する。ギャップ領域（G）は、フラunkの間に位置するいくつかのDNAヌクレオシドで構成されている。

〔0354〕

本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、CMP番号243__1、244__1、245__1、246__1及び246__2からなるオリゴヌクレオチド化合物の群から選択される（表9Bを参照）。

〔0355〕

全ての場合において、F-G-F'設計は、「オリゴヌクレオチド中の領域D'又はD''」の「定義」セクションに記載されるように、領域D'及び／又はD''をさらに含み得る。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ギャップマー領域の5'末端又は3'末端、例えば5'末端に、1、2、又は3個のホスホジエステル結合ヌクレオシド単位、例えばDNA単位を有する。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2つの5'ホスホジエステル結合DNAヌクレオシドと、続いて上記に定義したF-G-F'ギャップマー領域と、からなる。5'末端又は3'末端にホスホジエステル結合されたDNA単位を含むオリゴヌクレオチドは、コンジュゲーションに好適であり、本明細書に記載されるようなコンジュゲート部分をさらに含み得る。肝臓への送達では、ASGPR標的化部分は、コンジュゲート部分として特に有利である。さらなる詳細についてはコンジュゲート部分を参照されたい。

〔0356〕

FUBP1阻害剤

一態様では、本発明の組み合わせにおける第2のカテゴリの化合物は、FUBP1を標的とする阻害剤である。そのような阻害剤は、例えば、小分子、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド；siRNA分子；又はshRNA分子からなる群から選択することができる。

〔0357〕

理論に拘束されるものではないが、FUBP1は、細胞核におけるcccDNAの安定化に関与し、DNA（特にcccDNA）へのFUBP1の結合を妨げることによって、cccDNAは不安定化され、分解しやすくなると考えられる。したがって、本発明の実施形態は、FUBP1タンパク質のDNA結合ドメインと相互作用し、cccDNAへ

の結合を防止又は減少させる F U B P 1 阻害剤を含む。

【 0 3 5 8 】

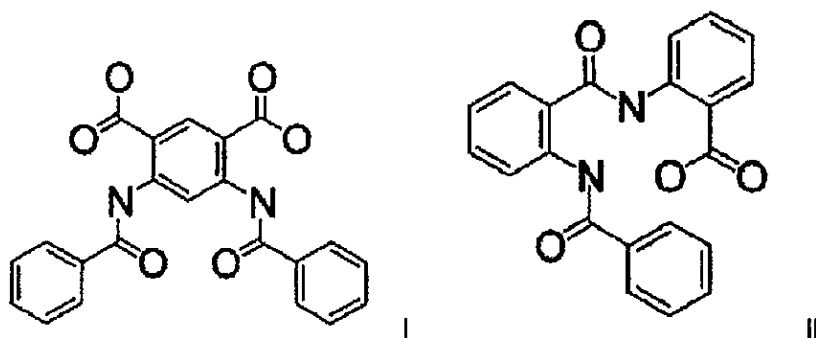
F U B P 1 を阻害する小分子

F U B P 1 を阻害する小分子は、癌における F U B P 1 の役割に関連して同定されており、この小分子は、F U B P 1 の DNA 結合活性、特に一本鎖 DNA 上の F U S E 要素への結合を阻害する。本発明では、F U B P 1 阻害剤は、H B V の処置に有用であると想定される。特に、例えばコンジュゲート化又は製剤化によるそのような小分子化合物の肝臓への標的化は、H B V の処置に有益であり得る。

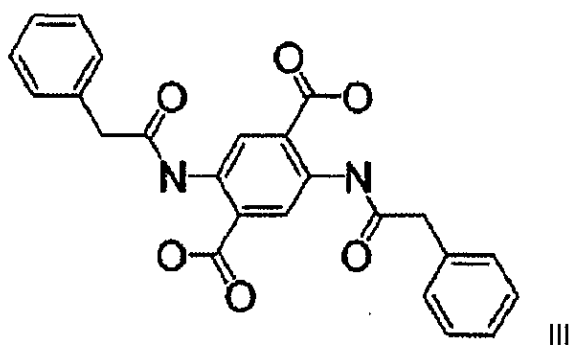
【 0 3 5 9 】

H u t h e t a l 2 0 0 4 J M e d . C h e m V o l 4 7 p . 4 8 5 1 - 4 8 5 7 は、F U B P 1 の 4 つのタンデム K 相同性 (K H) 反復に結合することができる一連のベンゾイルアントラニル酸化合物を開示している。H u t h e t a l 2 0 0 4 に開示されている全ての化合物は、参照により本明細書に組み込まれる。特に、以下に示す式 I、I I 又は I I I の化合物は、F U B P 1 D N A 結合活性を阻害するのに有効であることが分かった。

【 化 4 】



及び



【 0 3 6 0 】

本発明の一実施形態は、B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症の処置及び／又は予防に使用するための式 I、I I 又は I I I の化合物を含む。

【 0 3 6 1 】

H a u c k e t a l 2 0 1 6 B i o o r g a n i c & M e d i c i n a l C h e m i s t r y V o l 2 4 p . 5 7 1 7 - 5 7 2 9 には、高い F U B P 1 阻害能を有する追加の一連の化合物が記載されている (参照により本明細書に組み込まれる表 2 を参照されたい) 。特に、式 I V の以下の化合物は、F U B P 1 活性の阻害に有効であった。

10

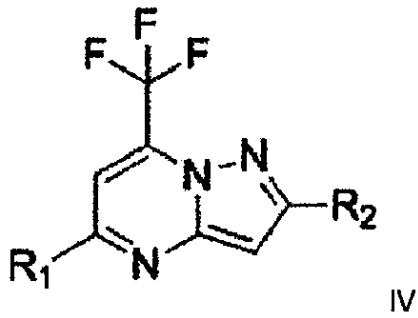
20

30

40

50

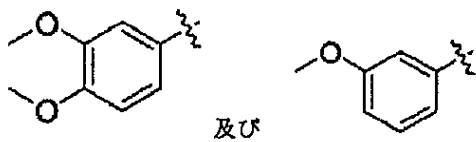
【化 5】



10

式中、R¹は、

【化 6】

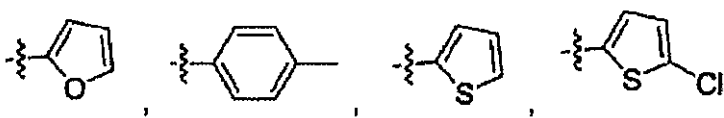


から選択され、

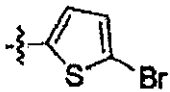
R²は

20

【化 7】



又は



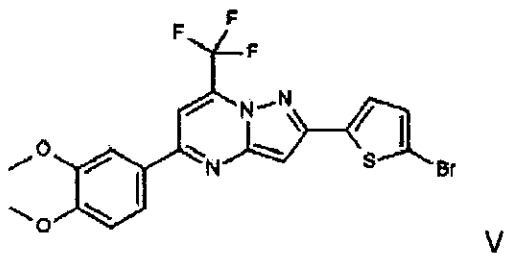
30

から選択される。

【0362】

具体的には、式 V、VI 及び VII の化合物は、15 μM 未満の IC₅₀ 値を有することが示された。

【化 8】

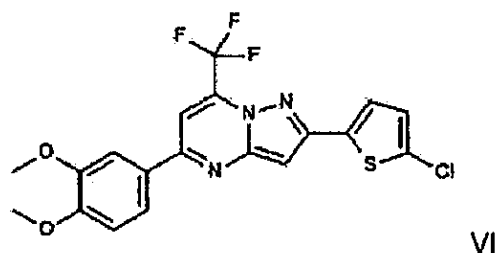


40

2-（5-ブロモチオフェン-2-イル）-5-（3,4-ジメトキシフェニル）-7-（トリフルオロメチル）ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン

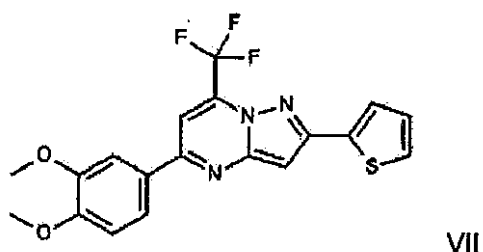
50

【化 9】



2 - (5 - クロロチオフエン - 2 - イル) - 5 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン 10

【化 10】



5 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - (チオフエン - 2 - イル) - 7 - (トリフルオロメチル) ピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン 20

【0363】

本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置及び／又は予防に使用するための式IVの化合物を含む。

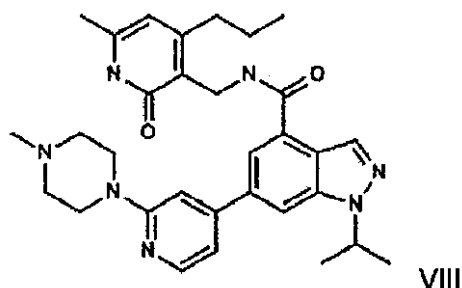
【0364】

本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置及び／又は予防に使用するための式V、VI又はVIIの化合物を含む。

【0365】

S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）競合阻害剤、GSK343（式VIII）は、現在、骨肉腫の前臨床開発中である。GSK343は、骨肉腫細胞におけるFUBP1発現を阻害することが示されている（Xiong et al 2016 Int J Onc vol 49 p 623）。 30

【化 11】



【0366】

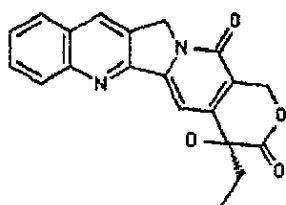
本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置及び／又は予防に使用するための式VIIIの化合物を含む。

【0367】

トポイソメラーゼI（TOP1）阻害剤であるFDA承認の癌薬カンプトテシン（CPT、式IX）及びその誘導体SN-38（7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、式X）は、最近、FUBP1／FUSE相互作用を防止することによって、FUBP1 50

活性も阻害することが示された (Hosseini et al 2017 Biochemical Pharmacology Vol 146 p. 53-62)。

【化12】



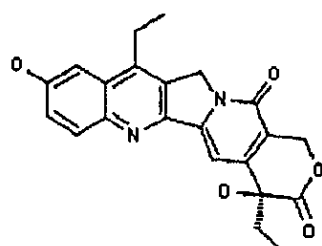
IX

10

【0368】

カンプトテシン ((+)-4(S)-エチル-4-ヒドロキシ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14ジオン)。

【化13】



X

20

【0369】

SN-38 (4(S), 11-ジエチル-4,9-ジヒドロキシ-3,4,12,14-テトラヒドロ-1H-ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14-ジオン7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン)。

【0370】

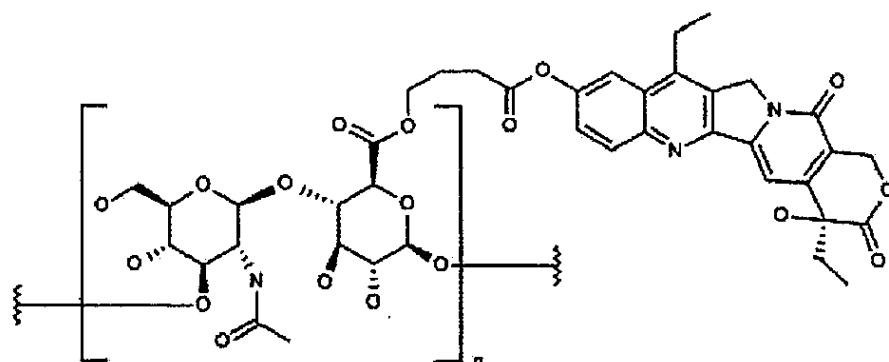
本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染症の処置及び／又は予防に使用するための式IX又はXの化合物を含む。

30

【0371】

Tringali et al 2012 Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol 64, p. 360-365は、ヒアルロン酸にコンジュゲートした薬物動態プロファイルSN-38(HA-SN-38、式XI)を記載しており、肝臓への増加した分布を示す。

【化14】



XI

40

【0372】

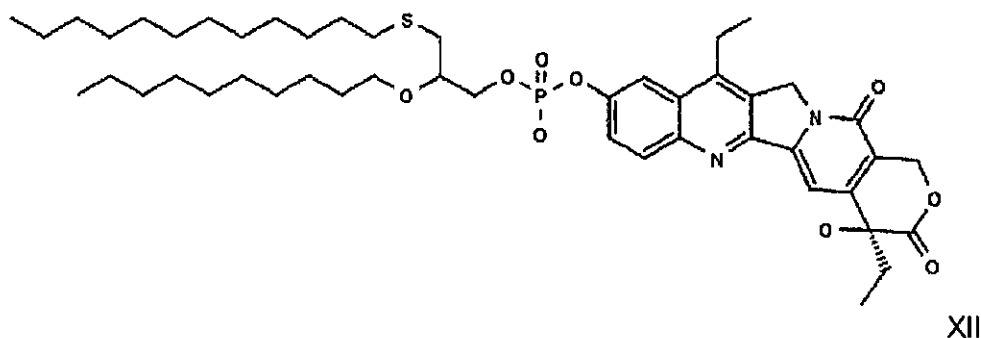
本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス(HBV)感染症の処置及び／又は予防に使用するための式XIの化合物を含む。

50

【0373】

SN-38の様々な脂質コンジュゲートも文献に存在する。例えば、WO2006/082053は、式XIIの分子を記載している。

【化15】

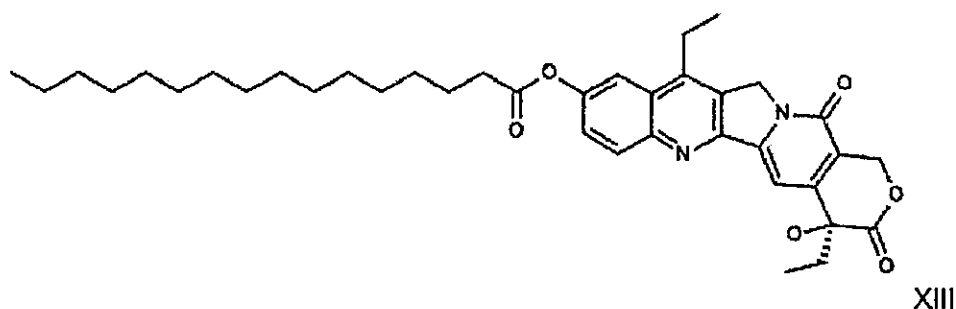


10

【0374】

CN105777770には、以下の式XIIIに示されるパルミチン酸コンジュゲートSN-38が記載されている。

【化16】



20

【0375】

本発明の一実施形態は、B型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置及び／又は予防に使用するための式XII又はXIIIの化合物を含む。

30

【0376】

本発明のさらなる態様では、例えばB型肝炎ウイルス（HBV）感染症の処置及び／又は予防に使用するためのFUBP1阻害剤を、アジア糖タンパク質受容体（ASGPr）に結合することができるコンジュゲート部分、例えば二価又は三価のGalNAcクラスターに共有結合することによって、肝臓に直接標的化することができる。

【0377】

FUBP1を標的とするsiRNA

40

50

【表 1 1】

表 1 1：個々の F U B P 1 s i R N A 分子によって標的化されるヒト F U B P 1 配列

配列番号	F U B P 1 標的配列	配列番号 1 に おける位置	エクソン	個々の s i R N A	D h a r m a c o n カタログ番号
2 1	GACAAACCUCUUAGGAUUA	1 4 2 0 0－ 1 4 2 1 8	9	F U 2	J－0 1 1 5 4 8－0 6
2 2	GAGAAGUUCGGAAUGAGUA	1 4 4 1 3－ 1 4 4 3 1	1 0	F U 4	J－0 1 1 5 4 8－0 8
2 3	GAAAGGAUAGCACAAAUAA	1 4 9 6 6－ 1 4 9 8 4	1 2	F U 1	J－0 1 1 5 4 8－0 5
2 4	AAUAAGAAGUGGACAAUAC	3 0 3 4 4－ 3 0 3 6 2	2 0	F U 3	J－0 1 1 5 4 8－0 7

10

s i R N A のプール (O N－T A R G E T p l u s S M A R T p o o l s i R N A カタログ番号 L－0 1 1 5 4 8－0 0－0 0 0 5, D h a r m a c o n) は、表 1 1 に
 列挙される 4 つの個々の s i R N A 分子を含み、入手可能である。

【0 3 7 8】

F U B P 1 を標的とするオリゴヌクレオチド

20

本セクションにおいて、「オリゴヌクレオチド」という用語は、「F U B P 1 を標的と
 するオリゴヌクレオチド」と理解されるべきである。

【0 3 7 9】

核酸分子 (又はオリゴヌクレオチド) は、F U B P 1 転写物を標的とし、R N A 干渉経
 路又は R N a s e H 切断のいずれかを介してその分解を促進することができるので、潜
 在的に優れた F U B P 1 阻害剤である。あるいは、アプタマーなどの核酸分子は、上記の
 小分子と一致して、F U B P 1 の D N A 結合部位の阻害剤としても作用することができる
 。

【0 3 8 0】

本発明の一態様では、組み合わせは、B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症の処置及び／
 又は予防に使用するための核酸分子を含む。このような核酸分子は、一本鎖アンチセンス
 オリゴヌクレオチド；s i R N A 分子；又は s h R N A 分子からなる群から選択され得る
 。

30

【0 3 8 1】

本発明において有用な核酸分子は、インビトロ及びインビボで F U B P 1 の発現を阻害
 することができる。阻害は、F U B P 1 をコードする標的核酸にオリゴヌクレオチドをハ
 イブリダイズさせることによって達成される。

【0 3 8 2】

標的核酸は、配列番号 2 4 7～2 6 6 からなる群から選択される配列といった、哺乳動
 物 F U B P 1 配列であることができる。哺乳動物 F U B P 1 配列が配列番号 2 4 7、2 4
 8、2 4 9、2 5 0、2 5 1、2 5 2、2 5 3、及び 2 5 4 からなる群から選択される場
 合が有利である。

40

【0 3 8 3】

いくつかの実施形態では、本発明で有用な核酸分子は、F U B P 1 の発現を阻害又は下
 方調節することにより、それを調節することができる。好ましくは、このような調節は、
 標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも 4 0 % の発現の阻害、より好ましくは、標
 的の正常な発現レベルと比較して少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、
 9 5 % 又は 9 8 % の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明で有用な核酸分子
 は、H e p G 2－N T C P 細胞又は H B V 感染初代ヒト肝細胞を使用して、インビトロで
 少なくとも 6 5 %～9 8 %、例えば 7 0 %～9 5 %、F U B P 1 m R N A の発現レベル

50

を阻害することができ、この範囲の標的減少は、cccDNA減少との良好な相関を有する核酸分子を選択する点で有利である。いくつかの実施形態では、本発明に有用なオリゴヌクレオチドは、HepG2-NTCP細胞又はHBV感染初代ヒト肝細胞を使用して、インビトロで少なくとも50%のFUBP1タンパク質の発現レベルを阻害することが可能であり得る。本明細書の材料及び方法のセクション及び実施例は、HepG2-NTCP細胞又はHBV感染初代ヒト肝細胞における標的RNA阻害並びにcccDNAを測定するために使用され得るアッセイを提供する。標的調節は、siRNAのガイド鎖又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのギャップマー領域などのオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列と標的核酸との間のハイブリダイゼーションによって引き起こされる。いくつかの実施形態では、本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列と標的核酸の一方又は両方との間のミスマッチを含む。ミスマッチにもかかわらず、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、FUBP1発現の所望の調節を示すのになお充分であり得る。ミスマッチから生じる結合親和性の減少は、オリゴヌクレオチドの長さの増加、及び／又は、オリゴヌクレオチド配列内の標的への結合親和性を増加させることができる修飾ヌクレオシドの数の増加により有利に補償され得る。有利には、本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、結合親和性を増加させることができる修飾ヌクレオシド、例えばLNAを含む2'糖修飾ヌクレオシドを含有する。

10

20

30

40

50

【0384】

本発明の一態様は、FUBP1の発現を阻害することができる、12～30ヌクレオチド長の核酸分子を含む12～60ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む組み合わせに関する。

【0385】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、標的核酸又は標的配列の領域に対して、少なくとも90%相補的、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、又は100%相補的な連続配列を含む。

【0386】

一実施形態では、本発明の組み合わせの核酸分子又はその連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域と完全に相補的（100%相補的）であるか、又はいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間に1つ又は2つのミスマッチを含み得る。

【0387】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号247、配列番号248、配列番号249及び／又は配列番号250に存在する標的核酸領域に対して少なくとも95%相補的、例えば完全に（又は100%）相補的な、12～30ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。

【0388】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、配列番号252、配列番号253及び／又は配列番号254の標的核酸に対して少なくとも93%相補性、例えば完全に（又は100%）相補的である。

【0389】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号247及び配列番号251の標的核酸に対して少なくとも95%相補性、例えば完全に（又は100%）相補的である。

【0390】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号247、配列番号251及び配列番号255の標的核酸に対して少なくとも95%相補性、例えば完全に（又は100%）相補的である。

【0391】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 4 7 の 1 4 2 0 0 ~ 1 4 2 1 8 位に 1 0 0 % 相補的である。

【0 3 9 2】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 4 7 の 1 4 4 1 3 ~ 1 4 4 3 1 位に 1 0 0 % 相補的である。

【0 3 9 3】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 4 7 の 1 4 9 6 6 ~ 1 4 9 8 4 位に 1 0 0 % 相補的である。

【0 3 9 4】

いくつかの実施形態では、核酸分子又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 4 7 の 3 0 3 4 4 ~ 3 0 3 6 2 位に 1 0 0 % 相補的である。

【0 3 9 5】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、1 2 ~ 6 0 ヌクレオチド長、例えば 1 3 ~ 5 0 、例えば 1 4 ~ 3 5 、例えば 1 5 ~ 3 0 、例えば 1 6 ~ 2 2 ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0 3 9 6】

いくつかの実施形態では、標的核酸に対して相補的である酸分子の連続ヌクレオチド配列は、1 2 ~ 3 0 、例えば 1 4 ~ 2 5 、例えば 1 6 ~ 2 3 、例えば 1 8 ~ 2 2 連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0 3 9 7】

いくつかの実施形態では、標的核酸に相補的である s i R N A 又は s h R N A の連続ヌクレオチド配列は、1 8 ~ 2 8 、例えば 1 9 ~ 2 6 、例えば 2 0 ~ 2 4 、例えば 2 1 ~ 2 3 連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0 3 9 8】

いくつかの実施形態では、標的核酸に対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、1 2 ~ 2 2 、例えば 1 4 ~ 2 0 、例えば 1 6 ~ 2 0 、例えば 1 5 ~ 1 8 、例えば 1 6 ~ 1 8 、例えば 1 6 ~ 1 7 の連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0 3 9 9】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 7 5 ~ 3 3 0 (表 1 2 A に列挙したモチーフ配列を参照) からなる群より選択される配列と少なくとも 9 0 % 、好ましくは 1 0 0 % の同一性を有する、1 0 ~ 3 0 ヌクレオチド長を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号 3 2 5 ; 3 2 6 ; 3 2 7 ; 3 2 8 ; 3 2 9 及び 3 3 0 から選択される。

10

20

30

40

50

【表 1 2 A - 1】

表 1 2 A : オリゴヌクレオチドモチーフ配列 (配列番号で示される)、これらの設計、及びモチーフ配列に基づいて設計された特定のオリゴヌクレオチド化合物 (CMP 番号で示される) のリスト

配列番号	モチーフ配列	設計	オリゴヌクレオチド化合物	CMP 番号	配列番号 247 における 開始位置
275	ataaccatagtcattga	3-12-3	ATAaccatagtcattTGA	275__1	9138
276	cccataaccatagtcac	3-12-2	CCCataaccatagtcAT	276__1	9142
277	gagccatctacacataaa	2-12-4	GAgccatctacacaTAAA	277__1	10016
278	caagagccatctacacat	3-13-2	CAAgagccatctacacAT	278__1	10019
279	tgtcatttaagaatcca	4-12-2	TGTCatttaagaatcCA	279__1	10144
280	ttgtgtccatttaagaat	4-12-2	TTGTgtccatttaagaAT	280__1	10147
281	taccttgctgctgat	3-11-2	TACcttgctgctgAT	281__1	11472
282	gactataccttgctgct	2-13-2	GActataaccttgctGC	282__1	11476
283	accttgatctctctgcat	1-16-3	ActtgatctctctgCAT	283__1	12020
284	accttgatctctctgct	2-14-2	ACttgatctctctgTC	284__1	12022
285	gattcagggtgtccagtta	1-16-2	GattcagggtgtccagtTA	285__1	12393
286	ttcaaacttactggaca	3-11-3	TTCaacttactggACA	286__1	12412
287	tacatctatccctcat	2-12-3	TAcatctatccctCAT	287__1	14452
288	ttacatctatcccttc	2-10-4	TTacatctatccCTTC	288__1	14454
289	cttctattacaatgccaac	1-17-2	CttctattacaatgccaAC	289__1	14776
290	atttctctattacaatg	2-14-3	ATttctctattacaATG	290__1	14781
291	ccatttctctattacaa	3-14-2	CCAttctctctattacAA	291__1	14783
292	gtttaaatacattgcc	2-11-4	GTttaaatacattTGCC	292__1	15537
293	gagtttaaatacattgcc	2-14-3	GAgtttaaatacattGCC	293__1	15537
294	gcttttatgggttcacc	1-15-2	GcttttatgggttcACC	294__1	16183
295	atgcttttatgggttcacc	1-17-2	AtgcttttatgggttcACC	295__1	16183
296	ataatcaacctgtccagct	1-16-2	AtaatcaacctgtccagCT	296__1	23804
297	ataatcaacctgtccagc	1-15-2	AtaatcaacctgtccaGC	297__1	23805
298	ataatcaacctgtccag	1-12-4	AtaatcaacctgtCCAG	298__1	23806
299	tataatcaacctgtccag	2-13-3	TAtaatcaacctgtCAG	299__1	23806
300	gtataatcaacctgtccag	1-15-3	GtataatcaacctgtCAG	300__1	23806
301	ataatcaacctgtcca	1-11-4	AtaatcaacctgtCCA	301__1	23807
302	tataatcaacctgtcca	1-12-4	TataatcaacctgtCCA	302__1	23807
303	gtataatcaacctgtcca	1-14-3	GtataatcaacctgtCCA	303__1	23807

10

20

30

40

50

【表 1 2 A - 2】

3 0 4	gtataatcaacctgtcc	3 - 1 2 - 2	GTAtaatcaacctgtCC	3 0 4__1	2 3 8 0 8
3 0 5	tataatcaacctgtcc	2 - 1 0 - 4	TAtaatcaacctGTCC	3 0 5__1	2 3 8 0 8
3 0 6	cccatcttctgttagta	2 - 1 3 - 2	CCcatcttctgttagTA	3 0 6__1	2 3 8 4 1
3 0 7	acccatcttctgttagta	1 - 1 5 - 2	AcccatcttctgttagTA	3 0 7__1	2 3 8 4 1
3 0 8	tacccatcttctgttagta	1 - 1 6 - 2	TacccatcttctgttagTA	3 0 8__1	2 3 8 4 1
3 0 9	atcccatcttctgttagta	1 - 1 7 - 2	AtcccatcttctgttagTA	3 0 9__1	2 3 8 4 1
3 1 0	atcccatcttctgttag	1 - 1 4 - 3	AtcccatcttctgtTAG	3 1 0__1	2 3 8 4 3
3 1 1	catacccatcttctgttag	2 - 1 5 - 2	CAtacccatcttctgtAG	3 1 1__1	2 3 8 4 3
3 1 2	catacccatcttctgtga	2 - 1 4 - 2	CAtacccatcttctgtTA	3 1 2__1	2 3 8 4 4
3 1 3	tggagctaattcaggagt	2 - 1 4 - 2	TGgagctaattcaggagGT	3 1 3__1	3 0 2 6 4
3 1 4	aaatggagctaattcaggag	3 - 1 4 - 3	AAAtggagctaattcaggGAG	3 1 4__1	3 0 2 6 5
3 1 5	tgtccactctctattatt	1 - 1 4 - 4	TgtccactctctatTATT	3 1 5__1	3 0 3 4 1
3 1 6	ccccacacaatgaagcaa	2 - 1 4 - 2	CCccacacaatgaagcAA	3 1 6__1	3 0 3 6 8
3 1 7	ttcatcaagtcgtcgtcat	1 - 1 6 - 2	TtcatcaagtcgtcgtcAT	3 1 7__1	3 0 4 1 2
3 1 8	gatcttcatcaagtcgtc	1 - 1 5 - 2	GatcttcatcaagtcgtTC	3 1 8__1	3 0 4 1 7
3 1 9	atattaacctcctatcagt	1 - 1 5 - 3	AtattaacctcctatcAGT	3 1 9__1	3 0 5 1 1
3 2 0	aatattaacctcctatcag	3 - 1 3 - 3	AATattaacctcctatCAG	3 2 0__1	3 0 5 1 2
3 2 1	atttatatcacaaagcatc	2 - 1 3 - 4	ATttatatcacaaagCATC	3 2 1__1	3 0 6 1 6
3 2 2	aagtaacatttatcacaca	4 - 1 2 - 2	AAGTaaacatttatcaCA	3 2 2__1	3 0 6 2 3
3 2 3	catttatgtaaagcacaaa	2 - 1 4 - 4	CAtttatgtaaagcaCAAA	3 2 3__1	3 0 6 7 5
3 2 4	atcatttatgtaaagca	2 - 1 2 - 4	ATcatttatgtaaAGCA	3 2 4__1	3 0 6 7 9
3 2 5	cttatgcttttatgggt	3 - 2 - 1 - 9 - 2	CTTatGcttttatgGT	3 2 5__1	1 6 1 8 9
3 2 5	cttatgcttttatgggt	3 - 1 - 1 - 1 0 - 2	CTTaTgcttttatgGT	3 2 5__2	1 6 1 8 9
3 2 6	cttatgcttttatgggt	2 - 1 - 2 - 1 0 - 3	CTtATgcttttatgGTT	3 2 6__1	1 6 1 8 8
3 2 6	cttatgcttttatgggt	2 - 1 - 1 - 1 1 - 3	CTtAtgcttttatgGTT	3 2 6__2	1 6 1 8 8
3 2 6	cttatgcttttatgggt	2 - 1 - 1 - 1 0 - 1 - 1 - 2	CTtAtgcttttatGgTT	3 2 6__3	1 6 1 8 8
3 2 6	cttatgcttttatgggt	2 - 1 - 1 - 1 0 - 4	CTtAtgcttttatGGTT	3 2 6__4	1 6 1 8 8
3 2 7	gcttttatgggttcac	1 - 3 - 1 - 7 - 1 - 1 - 3	GcttTtatgggtTtCAC	3 2 7__1	1 6 1 8 4
3 2 8	tatgcttttatgggttc	3 - 2 - 1 - 9 - 3	TATgcTtttatgggtTTC	3 2 8__1	1 6 1 8 6
3 2 9	accaattttcatttctac	1 - 1 - 3 - 9	AcCAAttttcatttCtAC	3 2 9__1	3 0 5 3 6

10

20

30

40

【表 1 2 A - 3】

		- 1 - 1 - 2			
3 3 0	ccccataaccatagtc	1 - 1 2 - 3	CccccataaccataGTC	3 3 0__1	9 1 4 1

【0 4 0 0】

連続核酸塩基配列（モチーフ配列）は、例えばヌクレアーゼ耐性及び／又は標的核酸に対する結合親和性を増大させるために修飾され得ることが理解される。

【0 4 0 1】

50

修飾ヌクレオシド（高親和性修飾ヌクレオシドなど）がオリゴヌクレオチド配列に組み込まれるパターンは、一般にオリゴヌクレオチド設計と称される。本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド及びRNAヌクレオシド（特に、siRNA及びshRNA分子）又はDNAヌクレオシド（特に、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド）を用いて設計される。高親和性修飾ヌクレオシドを用いることが有利である。

【0402】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個の修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1～8個の修飾ヌクレオシド、例えば2～7個の修飾ヌクレオシド、例えば3～6個の修飾ヌクレオシド、例えば4～6個の修飾ヌクレオシド、例えば4又は5個の修飾ヌクレオシドを含む。好適な修飾は、「修飾ヌクレオシド」、「高親和性修飾ヌクレオシド」、「糖修飾」、「2'糖修飾」、及びロックド核酸（LNA）の「定義」セクションに記載されている。

10

【0403】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドを含む。好ましくは、本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸（ANA）、2'-フルオロ-ANA及びLNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む。修飾ヌクレオシド（複数可）の1つ又は複数がロックド核酸（LNA）である場合、有利である。しばしば使用されるLNAヌクレオシドは、オキシ-LNA又はcETである。

20

【0404】

さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。好適なヌクレオシド間修飾は、「修飾ヌクレオシド間結合」の「定義」セクションに記載されている。オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端における少なくとも2～3個のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である場合、有利である。一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドについて、連続ヌクレオチド配列内の少なくとも75%、例えば全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であれば有利である。

30

【0405】

本発明のさらなる態様では、本発明において有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA又はshRNAなどの核酸分子を、アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPr）に結合することができるコンジュゲート部分、例えば二価又は三価のGalNAcクラスターに共有結合することによって、肝臓に直接標的化することができる。

【0406】

本発明において有用な増強されたアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートも提供され、それらは、FUBP1転写物を標的とすることができ、RNase H切断を介してその分解を促進することができるので、潜在的に優れたFUBP1阻害剤である。

40

【0407】

本発明のいくつかの実施形態では、増強されたアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートは、標的の発現を阻害又はダウンレギュレートすることにより調節することができる。好ましくは、そのような調節は、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも20%、より好ましくは、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%の阻害をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートは、PXB-PH H細胞において25 µMを使用して、FUBP1 mRNAの発現レベルをインビトロで

50

少なくとも50%又は60%阻害することができる場合がある。本発明のいくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートは、PXB-PHH細胞において25 μ Mを使用して、インビトロで少なくとも50%のFUBP1タンパク質の発現レベルを阻害することができ、この範囲の標的減少は、cccDNA減少との良好な相関を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択する点で有利である。適切には、実施例は、FUBP1 RNA阻害を測定するために使用され得るアッセイを提供する（例えば、実施例1又は2）。標的阻害は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列と標的核酸との間のハイブリダイゼーションによって引き起こされる。いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間のミスマッチを含む。ミスマッチにもかかわらず、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、FUBP1発現の所望の阻害を示すのになお充分であり得る。ミスマッチから生じる結合親和性の減少は、オリゴヌクレオチド内のヌクレオチド数の増加、及び／又は、標的への結合親和性を増加させることができる修飾ヌクレオチドの数、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド配列内に存在する、LNAを含む2'糖修飾ヌクレオチドの数の増加により有利に補償され得る。

10

20

30

40

50

【0408】

本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には12～30、例えば12～22、例えば16～20ヌクレオチド長であり、配列番号247のヌクレオチド9141～9156、16184～16205、16184～16200、16186～16203、16188～16205、及び16189～16205及び30536～30553由来の領域から選択されるヒトFUBP1プレmRNA（配列番号247に示される）の領域に相補的である、例えば完全に相補的である、少なくとも12ヌクレオチド、例えば13、14、15、16、17又は18ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0409】

本発明のいくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号256の標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば完全に相補的である、12～22ヌクレオチド、例えば15～20ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0410】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号257の標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば完全に相補的である、15～18ヌクレオチド、例えば17又は18ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

【0411】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号247の以下の領域：配列番号247の9141～9156、16184～16205、16184～16200、16186～16203、16188～16205、16189～16205及び30536～30553から選択される標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、例えば完全に相補的である、15～22ヌクレオチド、例えば18～22ヌクレオチド又は例えば15～18ヌクレオチド、例えば17又は18ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、12～30ヌクレオチド長の連続配列を含み、これは、標的核酸又は標的配列の領域と、少なくとも90%相補的であり、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、又は100%相補的である。

【0412】

本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に完全に相補的（100%相補的）である場合、又はいくつかの実施

形態では、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間に1つ又は2つのミスマッチを含み得る場合に有利である。

【0413】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号247の対応する標的核酸領域に対して100%相補的である。

【0414】

いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、配列番号247及び配列番号250の標的核酸に対して少なくとも95%相補性、例えば完全に（又は100%）相補的である。

【0415】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号247に存在する対応する標的配列に対して少なくとも90%相補的であり、例えば100%の相補性を有する15～22ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、標的配列は、配列番号247のヌクレオチド9141～9156、16184～16205、16184～16200、16186～16203、16188～16205、16189～16205及び30536～30553から選択される。

【0416】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号256の標的部位配列に対して少なくとも90%相補的であり、有利には100%相補的である。

【0417】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号257の標的部位配列に対して少なくとも90%相補的であり、有利には100%相補的である。

【0418】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号261の標的部位配列に対して少なくとも90%相補的であり、有利には100%相補的である。

【0419】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号270の標的部位配列に対して少なくとも90%相補的であり、有利には100%相補的である。

【0420】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、配列番号325、326、327、328、329及び330からなる群から選択される核酸塩基の配列、又はそれらの少なくとも14個の連続ヌクレオチド、例えばそれらの17個又は18個の連続ヌクレオチドを含む。

【0421】

いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、10～30ヌクレオチド長、例えば12～25、例えば11～22、例えば12～20、例えば14～18又は16～18連続ヌクレオチド長を含むか、又はそれらからなる。

【0422】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、22以下のヌクレオチド、例えば20以下、又は18以下のヌクレオチドを含むか又はそれらからなる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、14、15、16又は17個のヌクレオチドを含み得る。本明細書で提供されるいずれの範囲も、範囲の終点を含むことを理解するべきである。したがって、オリゴヌクレオチドが10～30ヌクレオチドを含むと記される場合、10ヌクレオチド及び30ヌクレオチドの両方が含まれる。

10

20

30

40

50

【0423】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号325に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

【0424】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号326に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

10

【0425】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号327に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

【0426】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号328に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

20

【0427】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号329に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

30

【0428】

本発明は、長さが12～24ヌクレオチド長、例えば12～18ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチド等の、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号330に存在する、少なくとも12個、例えば少なくとも13個、例えば少なくとも14個、例えば少なくとも15個、又は少なくとも16個の連続ヌクレオチドを含む、連続ヌクレオチド配列を含む。

【0429】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、又は22連続ヌクレオチド長、例えば16、17、又は18個の連続ヌクレオチドを含むか、又はそれらからなる。

40

【0430】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列は、配列番号325、326、327、328、329及び330から選択される配列を含むか、又はそれらからなる。

【0431】

有利な実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシド、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA及びLNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される1つ

50

又は複数の 2' 糖修飾ヌクレオシドを含む。修飾ヌクレオシド（複数可）の 1 つ又は複数
がロックド核酸（LNA）である場合、有利である。

【0432】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオシドを含む。

【0433】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、LNAヌクレオシド及びDNAヌ
クレオシドを含む。

【0434】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、2'-O-メトキシエチル（2' M
OE）ヌクレオシドを含む。

【0435】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列は、2'-O-メトキシエチル（2' M
OE）ヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。

【0436】

有利には、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列の最も 3
' 側のヌクレオシドは、2' 糖修飾ヌクレオシドである。

【0437】

有利には、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートなど
の少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む。

【0438】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも 1 つのヌクレオシド間
結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0439】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも 1 つのヌクレオシド間
結合は、ホスホロジチオエートヌクレオシド間結合である。

【0440】

いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列中の少なくとも 1 つのヌクレオシド間
結合は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

【0441】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列内の全てのヌクレオシド間結合は
ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0442】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチ
ド配列内のヌクレオシド間結合の少なくとも 75 % が、ホスホロチオエートヌクレオシド
間結合である。

【0443】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチ
ド配列内のヌクレオシド間結合の全てが、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である
。

【0444】

本発明の有利な実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド
は、RNase H、例えば RNase H1 を動員することができる。本発明のいくつ
かの実施形態では、本発明の組み合わせのアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続
ヌクレオチド配列は、ギャップマーである。

【0445】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチ
ド配列は、式 5'-F-G-F'-3' のギャップマーからなるか、又はそれを含む。

【0446】

いくつかの実施形態では、領域 G は、6 ~ 16 個の DNAヌクレオシド、例えば 7 ~ 1
2 個の DNAヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、領域 F は 4 ~ 6 個のヌク

10

20

30

40

50

レオシドを含み、及び／又は、領域 F' は 2 ～ 6 個のヌクレオシドを含む。

【0447】

いくつかの実施形態では、領域 F 及び F' はそれぞれ、少なくとも 1 つの LNA ヌクレオシドを含む。

【0448】

本発明のオリゴヌクレオチドのいくつかの実施形態では、全ての LNA ヌクレオシドは、ベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドである。

【0449】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、均一フランクを有する LNA ギャップマーである。

【0450】

本発明のいくつかの実施形態では、LNA ギャップマーは、交互フランク LNA ギャップマーである。いくつかの実施形態では、交互フランク LNA ギャップマーは、少なくとも 1 つの交互フランク（フランク F など）を含む。いくつかの実施形態では、交互フランク LNA ギャップマーは、1 つの交互フランク（フランク F など）及び 1 つの均一フランク（フランク F' など）を含む。いくつかの実施形態では、交互フランク LNA ギャップマーは、2 つの交互フランクを含む。例えば、LNA ギャップマーは、以下の設計から選択された設計を有することができる。1-12-3、3-2-1-9-2、3-1-1-10-2、2-1-2-10-3、2-1-1-11-3、2-1-1-10-1-1-2、2-1-1-10-4、1-3-1-7-1-1-3、3-2-1-9-3、及び 1-1-3-9-1-1-2。表 12B は、各モチーフ配列の好ましい設計を列挙している。

【0451】

本発明は、以下のオリゴヌクレオチド化合物（表 12B）を提供する：

10

20

30

40

50

【表 1 2 B】

表 1 2 B：本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドモチーフ配列（配列番号で示される）、これらの設計、及びモチーフ配列に基づいて設計された本発明の組み合わせの特定のオリゴヌクレオチド化合物（CMP 番号で示される）のリスト

配列番号	モチーフ配列	配列番号 2 4 7 における位置		設計	CMP 番号	オリゴヌクレオチド化合物
		開始	終了			
3 2 5	CTTATGCTTTTATGGT	1 6 1 8 9	1 6 2 0 5	3-2-1-9-2	3 2 5__1	CTTatGcttttatgGT
3 2 5	CTTATGCTTTTATGGT	1 6 1 8 9	1 6 2 0 5	3-1-1-1-0-2	3 2 5__2	CTTaTgcttttatgGT
3 2 6	CTTATGCTTTTATGGTT	1 6 1 8 8	1 6 2 0 5	2-1-2-1-0-3	3 2 6__1	CTtATgcttttatgGTT
3 2 6	CTTATGCTTTTATGGTT	1 6 1 8 8	1 6 2 0 5	2-1-1-1-1-3	3 2 6__2	CTtAtgcttttatgGTT
3 2 6	CTTATGCTTTTATGGTT	1 6 1 8 8	1 6 2 0 5	2-1-1-1-0-1-1-2	3 2 6__3	CTtAtgcttttatGgTT
3 2 6	CTTATGCTTTTATGGTT	1 6 1 8 8	1 6 2 0 5	2-1-1-1-0-4	3 2 6__4	CTtAtgcttttatGGTT
3 2 7	GCTTTTATGGTTTCAC	1 6 1 8 4	1 6 2 0 0	1-3-1-7-1-1-3	3 2 7__1	GcttTtatggtTtCAC
3 2 8	TATGCTTTTATGGTTTC	1 6 1 8 6	1 6 2 0 3	3-2-1-9-3	3 2 8__1	TATgcTtttatggtTTC
3 2 9	ACCAATTTTCATTCTAC	3 0 5 3 6	3 0 5 5 3	1-1-3-9-1-1-2	3 2 9__1	AcCAAAtttcatttCtAC
3 3 0	CCCCATAACCATAGTC	9 1 4 1	9 1 5 6	1-1-2-3	3 3 0__1	CcccataaccataGTC

【0 4 5 2】

表 1 2 A 及び 1 2 B 中の見出し「オリゴヌクレオチド化合物」とは、モチーフ配列の特定の設計を表す。大文字はベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、全ての LNA C は 5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。「設計」という見出しは、ギャップマー設計、F-G-F' を指す。交互フランク設計のギャップマーでは、オリゴヌクレオチドのフランクは一連の整数として注釈が付けられ、ベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシド (L) の数とそれに続く DNA ヌクレオシド (D) の数を表す。例えば、2-2-1 モチーフを有するフランクは、L L D D L を表す。両方のフランクは 5' 末端及び 3' 末端にベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドを有する。ギャップ領域 (G) は、フランクの間に位置するいくつかの DNA ヌクレオシドで構成されている。

【0 4 5 3】

本発明のいくつかの実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP 番号 3 2 5__1、3 2 5__2、3 2 6__1、3 2 6__2、3 2 6__3、3 2 6__4、3 2 7__1、3 2 8__1、3 2 9__1 及び 3 3 0__1 を有するオリゴヌクレオチド化合物からなる群から選択される（表 1 2 B 参照）。

【0 4 5 4】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、CMP 番号 3 2 5__1 を有する

化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 5 5 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 5 __ 2 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 5 6 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 6 __ 1 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 5 7 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 6 __ 2 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 5 8 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 6 __ 3 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 5 9 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 6 __ 4 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 6 0 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 7 __ 1 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 6 1 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 8 __ 1 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 6 2 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 2 9 __ 1 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 6 3 】

特別な実施形態では、本発明の組み合わせの化合物は、C M P 番号 3 3 0 __ 1 を有する化合物である（表 1 2 B 参照）。

【 0 4 6 4 】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、表 1 3 に列挙される群から選択されてもよく、又はそれらの薬学的に許容され得る塩であってもよい。

10

20

30

40

50

【表 13】

表 13. 化合物表 (本発明の例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチド) - H E L M 注釈
フォーマット

配列番号	化合物番号	H E L M 注釈 5' - 3' に書かれている	以下の図に示す コンジュゲート によって構成さ れる。
3 2 5	3 2 5__1	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[L R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	1
3 2 5	3 2 5__2	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	2
3 2 6	3 2 6__1	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	3
3 2 6	3 2 6__2	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	4
3 2 6	3 2 6__3	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	5
3 2 6	3 2 6__4	{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[d R](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	6
3 2 7	3 2 7__1	{[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5m eC])}	7
3 2 8	3 2 8__1	{[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[L R]([5meC])}	8
3 2 9	3 2 9__1	{[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[d R](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[L R](A)[sP].[LR]([5meC])}	8. 1
3 3 0	3 3 0__1	{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[d R](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP] .[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	

H e l m 注釈キー：

- [L R] (G) は、ベータ-D-オキシ-LNA グアニンヌクレオシドであり、
 [L R] (T) は、ベータ-D-オキシ-LNA チミンヌクレオシドであり、
 [L R] (A) は、ベータ-D-オキシ-LNA アデニンヌクレオシドであり、
 [L R] ([5 m e C]) は、ベータ-D-オキシ-LNA 5-メチルシトシンヌクレ
 オシドであり、
 [d R] (G) は、DNA グアニンヌクレオシドであり、
 [d R] (T) は、DNA チミンヌクレオシドであり、
 [d R] (A) は、DNA アデニンヌクレオシドであり、

[d R] ([C] は、DNA シトシンヌクレオシドであり、
[s P] は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、
P は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

【0465】

したがって、本発明は、化合物番号 325__1、325__2、326__1、326__2、326__3、326__4、327__1、328__1、329__1 及び 330__1 からなる群から選択されるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

【0466】

全ての場合において、F-G-F' 設計は、「オリゴヌクレオチド中の領域 D' 又は D''」の「定義」セクションに記載されるように、領域 D' 及び／又は D'' をさらに含み得る。10
いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、ギャップマー領域の 5' 末端又は 3' 末端、例えば 5' 末端に、1、2、又は 3 個のホスホジエステル結合ヌクレオシド単位、例えば DNA 単位を有する。いくつかの実施形態では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドは、2つの 5' ホスホジエステル結合 DNA ヌクレオシドと、続いて上記に定義した F-G-F' ギャップマー領域と、からなる。5' 末端又は 3' 末端にホスホジエステル結合された DNA 単位を含むオリゴヌクレオチドは、コンジュゲーションに好適であり、本明細書に記載されるようなコンジュゲート部分をさらに含み得る。肝臓への送達では、ASGPR 標的化部分は、コンジュゲート部分として特に有利である。さらなる詳細についてはコンジュゲート部分を参照されたい

【0467】

20

組み合わせ

一態様では、本発明の組み合わせにおける化合物の第 3 のカテゴリーは、リンカーによって FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドに結合された RTEL1 を標的化するオリゴヌクレオチドである。

【0468】

一実施形態では、リンカーは、AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC 又は GG からなる群から選択される配列を有する DNA ジヌクレオチドからなり、2つの DNA ヌクレオシド間にホスホジエステル結合が存在する。好ましくは、リンカーは CA DNA ジヌクレオチドである。

【0469】

30

一実施形態では、ジヌクレオチドの 5' 末端における結合 (RTEL1 又は FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 1 つにジヌクレオチドを結合する) は、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合である；ジヌクレオチドの 3' 末端における結合 (RTEL1 又は FUBP1 を標的化する別のオリゴヌクレオチドにジヌクレオチドを結合する) は、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合である。

【0470】

一実施形態では、RTEL1 を標的化するオリゴヌクレオチドは、その 3' 末端で、CA DNA ジヌクレオチドを介して、FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合され、RTEL1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 3' 末端とジヌクレオチドの 5' 末端との間の結合はホスホジエステル結合であり；ジヌクレオチドの 3' 末端と FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 5' 末端との間の結合はホスホジエステル結合である。40

【0471】

一実施形態では、FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドは、その 3' 末端で、CA DNA ジヌクレオチドを介して、RTEL1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合され、FUBP1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 3' 末端とジヌクレオチドの 5' 末端との間の結合はホスホジエステル結合であり；ジヌクレオチドの 3' 末端と RTEL1 を標的化するオリゴヌクレオチドの 5' 末端との間の結合はホスホジエステル結合である。

【0472】

50

一実施形態では、RTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドは、その3'末端で、CA DNAジヌクレオチドを介して、FUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端に結合され、RTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドの3'末端とジヌクレオチドの5'末端との間の結合はホスホロチオエート結合であり；ジヌクレオチドの3'末端とFUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端との間の結合はホスホジエステル結合である。

【0473】

一実施形態では、FUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドは、その3'末端で、CA DNAジヌクレオチドを介して、RTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端に結合され、FUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドの3'末端とジヌクレオチドの5'末端との間の結合はホスホロチオエート結合であり；ジヌクレオチドの3'末端とRTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端との間の結合はホスホジエステル結合である。

10

【0474】

一実施形態では、リンカーによってFUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドに結合されたRTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドからなる組み合わせの最も5'末端のオリゴヌクレオチドは、リンカーによってコンジュゲート部分にさらに結合される。

【0475】

一実施形態では、コンジュゲート部分は、AA、AT、AC、AG、TA、TT、TC、TG、CA、CT、CC、CG、GA、GT、GC又はGGからなる群から選択される配列を有するDNAジヌクレオチドからなるリンカーによって最も5'末端のオリゴヌクレオチドに結合され、2つのDNAヌクレオチド間にホスホジエステル結合が存在する。好ましくは、リンカーはCA DNAジヌクレオチドである。

20

【0476】

一実施形態では、ジヌクレオチドの5'末端における結合（ジヌクレオチドをコンジュゲート部分に結合する）は、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合である；ジヌクレオチドの3'末端における結合（ジヌクレオチドを最も5'のオリゴヌクレオチドの5'末端に結合する）は、ホスホジエステル結合又はホスホロチオエート結合である。

【0477】

一実施形態では、最も5'のオリゴヌクレオチドは、その5'末端でCA DNAジヌクレオチドを介してコンジュゲート部分に結合されたRTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドであり、RTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端とジヌクレオチドの3'末端との間の結合はホスホジエステル結合であり；ジヌクレオチドの5'末端とコンジュゲート部分との間の結合はホスホジエステル結合である。

30

【0478】

一実施形態では、最も5'のオリゴヌクレオチドは、その5'末端でCA DNAジヌクレオチドを介してコンジュゲート部分に結合されたFUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドであり、FUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドの5'末端とジヌクレオチドの3'末端との間の結合はホスホジエステル結合であり；ジヌクレオチドの5'末端とコンジュゲート部分との間の結合はホスホジエステル結合である。

40

【0479】

一実施形態では、RTE L 1を標的化するオリゴヌクレオチドは、CMP番号245__1（配列番号245）又はCMP番号246__2（配列番号246）である。

【0480】

一実施形態では、FUBP 1を標的化するオリゴヌクレオチドは、CMP番号326__3（配列番号326）又はCMP番号330__1（配列番号330）である。

【表 1 3 - 1】

表 1 2 C：オリゴヌクレオチドの組み合わせの配列（配列番号によって示される）、これらの設計、並びに特定の組み合わせ化合物（CMP 番号によって示される）のリスト。

配列番号	モチーフ配列	連結	組み合わせ化合物	CMP 番号
3 4 8	ccccataaccatagtcactttattataact-gaatctc	1 - 1 2 - 3 - 2 -- 2 - 1 5 - 4	CcccataaccataGTCcaCTttattataact-gaaTCTC	3 4 8__1
3 4 9	ctttattataacttgaatctccacccataac-catagtc	2 - 1 5 - 4 - 2 - 1 - 1 2 - 3	CTttattataacttgaaTCTCcaCcccataacca-taGTC	3 4 9__1
3 5 0	cttatgctttttatggttcattacat-actctggtcaaa	2 - 1 - 1 - 1 0 -- 1 - 1 - 2 - 2 - 1 2 - 4	CTtAtgctttttatGgTTcaTTacat-actctggtCAAA	3 5 0__1
3 5 1	ttacatactctggtcaaacac-ttatgctttttatggtt	2 - 1 2 - 4 - 2 - 2 - 1 - 1 - 1 0 - 1 - 1 - 2	TTacatactctggtCAAAcaC-TtAtgctttttatGgTT	3 5 1__1

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

表 1 2 D : 化合物の組み合わせの表 (本発明の例示的な組み合わせ) - H E L M 注釈フォーマット

配列番号	オリゴ化合物 ID	H E L M 注釈 (5' - 3' に書かれている)
3 4 8	3 4 8 _ 1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
3 4 8	3 4 8 _ 2	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
3 4 9	3 4 9 _ 1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
3 4 9	3 4 9 _ 2	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
3 5 0	3 5 0 _ 1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
3 5 1	3 5 1 _ 1	RNA1{[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0

【 0 4 8 1】

コンジュゲート

H B V 感染は主に肝臓の肝細胞に影響を及ぼすので、本発明で有用な R T E L 1 及び／又は F U B P 1 阻害剤 (複数可) をコンジュゲート部分に結合させ、未結合阻害剤と比較して阻害剤の肝臓への送達を増加させることが、有利である。一実施形態では、肝臓標的化部分は、コレステロール若しくは他の脂質を含む部分、又はアシアロ糖タンパク質受容体 (A S G P R) に結合し得るコンジュゲート部分から選択される。

【 0 4 8 2】

本発明のいくつかの実施形態では、コンジュゲートは、コンジュゲート部分に共有結合

したアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【0483】

アジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR）コンジュゲート部分は、ガラクトースと同等以上の親和性でアジアロ糖タンパク質受容体（ASGPR 標的化部分）に結合することができる、1つ又は複数の炭水化物部分を含む。アジアロ糖タンパク質受容体に対する多数のガラクトース誘導体の親和性が研究されており（例えば、Jobst, S. T. and Drickamer, K. J B. C. 1996, 271, 6686を参照）、又は当技術分野で典型的な方法を用いて容易に決定される。

【0484】

一実施形態では、コンジュゲート部分は、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミルガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-プロピオニルガラクトサミン、N-n-ブタノイルガラクトサミン、及びN-イソブタノイルガラクトサミンからなる群より選択される、少なくとも1つのアジアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含む。有利には、アジアロ糖タンパク質受容体標的化部分は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）である。

【0485】

ASGPRコンジュゲート部分を生成するために、ASGPR 標的化部分（好ましくは、GalNAc）をコンジュゲート足場に付着させることができる。一般に、ASGPR 標的化部分は、足場の同じ末端にあり得る。一実施形態では、コンジュゲート部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合され得るブランチ分子に各GalNAc部分を結合するスパーサーに結合された、2～4個の末端GalNAc部分からなる。

【0486】

さらなる実施形態では、コンジュゲート部分は、アジアロ糖タンパク質受容体標的化部分に関して、一価、二価、三価、又は四価である。有利には、アジアロ糖タンパク質受容体標的化部分は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）部分を含む。

【0487】

GalNAcコンジュゲート部分としては、例えば、国際公開第2014/179620号及び同第2016/055601号及び国際出願第PCT/EP2017/059080号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているもの、並びに、Tyroglu-Glu（アミノヘキシルGalNAc）3（YEE（ahGalNAc）3等のGalNAc部分が結合した小さなペプチド；肝細胞上のアジアロ糖タンパク質受容体に結合するグリコトリペプチド、例えば、Duff, et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297；リジン系ガラクトースクラスター（例えば、L3G4；Biessen, et al., Cardiovasc. Med., 1999, 214）；及びコラン系ガラクトースクラスター（例えば、アジアロ糖タンパク質受容体に対する炭水化物認識モチーフ）を挙げることができる。

【0488】

ASGPRコンジュゲート部分、特に三価GalNAcコンジュゲート部分は、当該技術分野で公知の方法を用いてオリゴヌクレオチドの3'末端又は5'末端に結合することができる。一実施形態では、ASGPRコンジュゲート部分は、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合する。

【0489】

一実施形態では、コンジュゲート部分は、図5に示すような三価のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）である。一実施形態では、コンジュゲート部分は、図5A-1若しくは図5A-2の三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、又はその両方の混合物である。一実施形態では、コンジュゲート部分は、図5B-1若しくは図5B-2の三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、又はその両方の混合物である。一実施形態では、コンジュゲート部分は、図5C-1若しくは図5C-2の三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、又はその両方の混合物である。一実施形態では、コンジュゲート部分は、図5D-1若しくは図5D-2の三価N-アセチルガラクトサミ

ン (G a l N A c)、又はその両方の混合物である。

【0490】

R T E L 1 標的化コンジュゲート

いくつかの実施形態では、R T E L 1 を標的とするコンジュゲートは、

5' - G N 2 - C 6₀ [X] A_s A_s T_s T_s t_s t_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s G_s T_s、

5' - G N 2 - C 6₀ [X] A_s A_s t_s t_s t_s t_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s G_s G_s T_s^m C_s、

5' - G N 2 - C 6₀ [X] T_s T_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s g_s t_s^m C_s A_s A_s A_s、

5' - G N 2 - C 6₀ [X] ^m C_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s T_s g_s a_s A_s t_s^m C_s T_s^m C_s；及び

5' - G N 2 - C 6₀ [X] ^m C_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s t_s g_s a_s a_s T_s^m C_s T_s^m C_s。

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6は、三価N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c)、例えば図5D-1又は図5D-2の三価N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 等の図5に示すもの、又は両方の混合物であり、及び[X]は前述のとおり、c o a oを表す、

からなる群から選択される。

【0491】

いくつかの実施形態では、R T E L 1 を標的化するコンジュゲートは、表14に列挙したコンジュゲート又はそれらの薬学的に許容され得る塩の群から選択される。

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4．化合物表（本発明の例示的なコンジュゲート）－H E L M注釈フォーマット（H E L M注釈上の注釈については、表 1 0 の説明を参照）。

オリゴ化合物 番号（上記表 1 0 による）	H E L M注釈 5' - 3' に書かれている	例示的な化合物－ 以下の図を参照
2 4 3 _ 1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	1
2 4 4 _ 1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	2
2 4 5 _ 1	[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)	4
2 4 6 _ 1	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	3
2 4 6 _ 2	{[5gn2c6]P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	

H e l m注釈キー：

〔L R〕（G）は、ベータ－D－オキシ－L N A グアニンヌクレオシドであり、

〔L R〕（T）は、ベータ－D－オキシ－L N A チミンヌクレオシドであり、

〔L R〕（A）は、ベータ－D－オキシ－L N A アデニンヌクレオシドであり、

〔L R〕（〔5 m e C〕）は、ベータ－D－オキシ－L N A 5－メチルシトシンヌクレオシドであり、

〔d R〕（G）は、D N A グアニンヌクレオシドであり、

〔d R〕（T）は、D N A チミンヌクレオシドであり、

〔d R〕（A）は、D N A アデニンヌクレオシドであり、

〔d R〕（C）は、D N A シトシンヌクレオシドであり、

〔s P〕は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、

P は、ホスホジエステルヌクレオシド間結合である。

【0 4 9 2】

5 g n 2 c 6 は、図 5 D－1 又は図 5 D－2 の三価 N－アセチルガラクトサミン（G a l N A c）、又は両方の混合物である。

【0 4 9 3】

いくつかの実施形態では、5 g n 2 c 6 は、以下の式を有する G a l N A c 残基 R である。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図 3 に示されるコンジュゲートである。

【0505】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図 4 に示されるコンジュゲートである。

【0506】

図 1 ～ 4 に示す化合物は、プロトン化形態で示される。ホスホロチオエート結合上の S 原子がプロトン化されている。プロトンの存在は分子の環境の酸性度、及び、（例えば、オリゴヌクレオチドが塩形態であるときの）代替のカチオンの存在によって変化することが理解されよう。プロトン化ホスホロチオエートは互変異性形態で存在する。

【0507】

FUBP1 標的化コンジュゲート

いくつかの実施形態では、FUBP1 を標的とするコンジュゲートは、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT、

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT、

5' - GN2 - C6 [X] G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s^mC_sA_s^mC、

5' - GN2 - C6 [X] T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s^mC、

5' - GN2 - C6 [X] A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st_s^mC_st_sA_s^mC、及び

5' - GN2 - C6 [X] ^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s^mC_s

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2 - C6は、図5Dに示されるような三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、例えば図5D-1又は図5D2に示されるような三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、又は両者の混合物であり、オリゴヌクレオチドの5'末端でホスホジエステル結合を介して結合していることが好ましい、からなる群から選択される。分子のいくつかを表す化学図を図8～16に示し、[X]は前述のとおり、c_oa_oを表す。

【0508】

いくつかの実施形態では、FUBP1を標的化するコンジュゲートは、表15に列挙したコンジュゲート又はそれらの薬学的に許容され得る塩の群から選択される。

10

20

30

40

50

【表 1 5 A】

表 1 5 A. 化合物表 (本発明の例示的なコンジュゲート) — H E L M 注釈フォーマット

オリゴ化合物番号 (上記表 1 3 による)	H E L M 注釈 5' - 3' に書かれている	例示的な化合物— 以下の図を参照
3 2 5 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	8
3 2 5 __ 2	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}	9
3 2 6 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	1 0
3 2 6 __ 2	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	1 1
3 2 6 __ 3	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	1 2
3 2 6 __ 4	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}	1 3
3 2 7 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])}	1 4
3 2 8 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	1 5
3 2 9 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[LR]([5meC])}	1 6
3 3 0 __ 1	{{5gn2c6}P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}	

【0 5 0 9】

上記の表において、[5 g n 2 c 6] は、以下の式を有する G a l N A c 残基 R である。

10

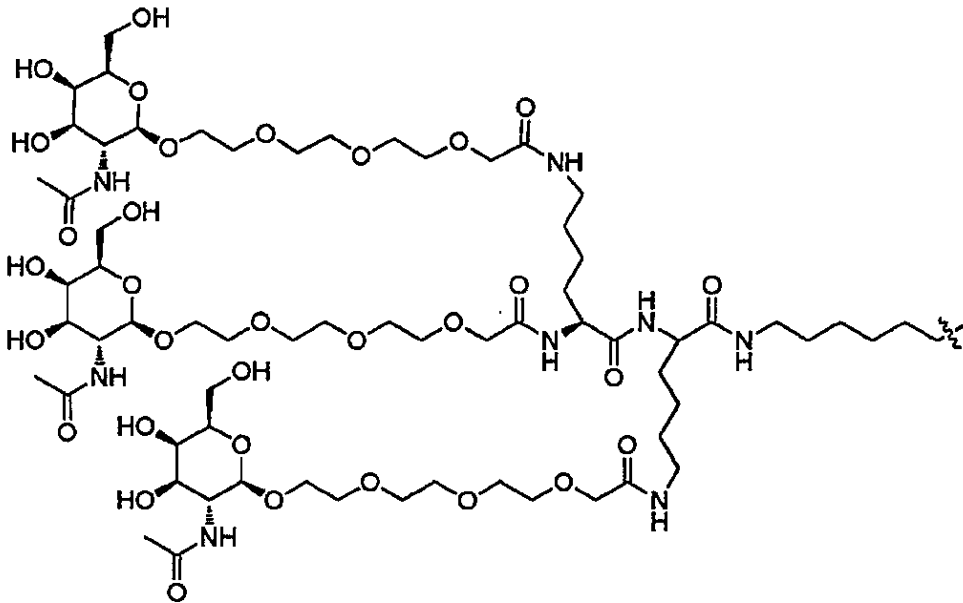
20

30

40

50

【化 1 8】



10

【0 5 1 0】

上記の図に示され、上記の表で使用される R は、図 5 D 1 及び図 5 D 2 に示される 2 つの立体異性体の混合物であることが理解されるべきである。

20

【0 5 1 1】

本発明のさらなる態様によれば、上記の図に示され、上記の表で使用される R は、図 5 D 1 に示される立体異性体である。

【0 5 1 2】

本発明のさらなる態様によれば、上記の図に示され、上記の表で使用される R は、図 5 D 1 に示される立体異性体である。表 1 5 に提供されるコンジュゲートの構造を図 8 ~ 1 6 に示す。

【0 5 1 3】

本発明は、図 8 のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

30

【0 5 1 4】

本発明は、化合物番号 3 2 5 __ 1 のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 1 5】

本発明は、図 9 のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 1 6】

本発明は、化合物番号 3 2 5 __ 2 のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 1 7】

本発明は、図 1 0 のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

40

【0 5 1 8】

本発明は、化合物番号 3 2 6 __ 1 のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 1 9】

本発明は、図 1 1 のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 2 0】

本発明は、化合物番号 3 2 6 __ 2 のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0 5 2 1】

本発明は、図 1 2 のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

50

【0522】

本発明は、化合物番号326__3のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0523】

本発明は、図13のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0524】

本発明は、化合物番号326__4のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0525】

本発明は、図14のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

10

【0526】

本発明は、化合物番号327__1のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0527】

本発明は、図15のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0528】

本発明は、化合物番号328__1のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0529】

本発明は、図16のコンジュゲート又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

20

【0530】

本発明は、化合物番号329__1のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0531】

本発明は、化合物番号330__1のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその薬学的に許容され得る塩を提供する。

【0532】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図8に示されるコンジュゲートである。

【0533】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図9に示されるコンジュゲートである。

30

【0534】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図10に示されるコンジュゲートである。

【0535】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図11に示されるコンジュゲートである。

【0536】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図12に示されるコンジュゲートである。

【0537】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図13に示されるコンジュゲートである。

40

【0538】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図14に示されるコンジュゲートである。

【0539】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図15に示されるコンジュゲートである。

【0540】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、図16に示されるコンジュゲートである

50

。

【0541】

図8～16に示す化合物は、プロトン化形態で示される。ホスホロチオエート結合上のS原子がプロトン化されている。プロトンの存在は分子の環境の酸性度、及び、（例えば、オリゴヌクレオチドが塩形態であるときの）代替のカチオンの存在によって変化することが理解されよう。プロトン化ホスホロチオエートは互変異性形態で存在する。

【0542】

組み合わせ標的化コンジュゲート

いくつかの実施形態では、RTEL1及びFUBP1を標的化する化合物の組み合わせのコンジュゲートは、

5'-GN2-C6₀[X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_st_sa_st_s
sG_sg_sT_sT_oc_oa_oT_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s^m
C_sA_sA_sA_s(CMP番号350__1)、及び

5'-GN2-C6₀[X]^mT_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s
^mC_sA_sA_sA_oc_oa_o^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
G_sg_sT_sT(CMP番号351__1)

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6は、図5Dに示されるような三価N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、例えば図5D-1又は図5D2に示されるような三価N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、又は両者の混合物、好ましくは最も5'のオリゴヌクレオチドの5'末端でホスホジエステル結合を介して結合したものであり、[X]は、前述のとおり、c_oa_oを表す、

からなる群から選択される。

【0543】

【表15B】

表15B：化合物の組み合わせの表（本発明の例示的なコンジュゲート）—HELM注釈フォーマット

オリゴ化合物 ID	HELM注釈（5'-3'に書かれている）
350__1	CHEM1{[5gn2c6]}[RNA1{P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].}CHEM1,RNA1,1:R2-1:R1\$\$\$\$V2.0
351__1	CHEM1{[5gn2c6]}[RNA1{P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR](T)[sP].[LR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)[sP].[LR](A)P.[dR](C)P.[dR](A)P.[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[dR](T)[sP].[LR](A)[sP].[dR](T)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](T)[sP].[dR](A)[sP].[dR](T)[sP].[LR](G)[sP].[dR](G)[sP].[LR](T)[sP].[LR](T)}CHEM1,RNA1,1:R2-1:R1\$\$\$\$V2.0

【0544】

製造方法

さらなる態様では、ヌクレオチド単位を反応させ、それによってオリゴヌクレオチドからなる共有結合された連続ヌクレオチド単位を形成することを含む、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチドを製造するための方法。好ましくは、この方法は、ホスホロアミダイト化学を使用する（例えば、Caruthersら（1987年）「Methods

in Enzymology」第154巻第287～313頁を参照のこと）。さらなる実施形態では、この方法は、連続ヌクレオチド配列をコンジュゲート部分（リガンド）と反応させて、コンジュゲート部分をオリゴヌクレオチドに共有結合させることをさらに含む。さらなる態様では、本発明の組み合わせのオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩、及び／又はアジュバントと混合することを含む、本発明の組み合わせの組成物を製造する方法が提供される。

【0545】

薬学的な塩

本発明による化合物は、その薬学的に許容され得る塩の形態で存在し得る。「薬学的な塩」又は「薬学的に許容され得る塩」という用語は、本発明の化合物の生物学的有効性及び特性を保持し、適切な非毒性の有機若しくは無機酸又は有機若しくは無機塩基から形成される従来の酸付加塩又は塩基付加塩を指す。酸付加塩には、例えば、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸及び硝酸などの無機酸に由来するもの、並びに p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸などの有機酸に由来するものなどが含まれる。塩基付加塩には、アンモニウム、カリウム、ナトリウム及び第四級アンモニウムヒドロキシド、例えば、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドに由来するものが含まれる。医薬化合物の塩への化学修飾は、化合物の物理的及び化学的安定性、吸湿性、流動性並びに溶解性を改善するために、医薬系化学者に周知の技法である。これは例えば、Bastin, Organic Process Research & Development 2000, 4, 427-435 or in Ansel, In: Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6th ed. (1995), pp. 196 and 1456-1457に記載されている。例えば、本明細書で提供される化合物の薬学的に許容され得る塩は、ナトリウム塩であり得る。

【0546】

さらなる態様では、本発明は、1つ若しくは複数のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートの薬学的に許容され得る塩、例えば、薬学的に許容され得るナトリウム塩、アンモニウム塩又はカリウム塩に関する。

【0547】

医薬組み合わせ及びキット

本発明の一態様は、各々が薬学的に許容され得る担体中に製剤化された、本明細書に記載のRTEL1を標的化する阻害剤とFUBP1の阻害剤との医薬組み合わせに関する。

【0548】

本発明の医薬組み合わせは、単独で摂取されるオリゴヌクレオチドなどの含まれる治療用阻害剤よりも効果的にHBV感染症を処置するために使用することができる。一実施形態では、本発明の医薬組み合わせを使用して、単独で摂取されるオリゴヌクレオチドなどの含まれる治療用阻害剤よりも迅速にHBVを阻害し、持続時間を延長してHBVを阻害し、及び／又はより大きな効果でHBVを阻害することができる。これらの効果は、感染細胞におけるcccDNAの減少によって測定され得る。一実施形態では、本発明の医薬組み合わせは、単独で摂取されるオリゴヌクレオチドなどの含まれる治療用阻害剤よりも、感染細胞においてcccDNAのより迅速な減少を引き起こす。一実施形態では、本発明の医薬組み合わせは、含まれる治療用オリゴヌクレオチド又はTLR7アゴニスト単独よりも長期のcccDNAの減少を生じさせる。一実施形態では、本発明の医薬組み合わせは、含まれる治療用オリゴヌクレオチド又はTLR7アゴニスト単独よりも大きなcccDNA力価の低減を生じさせる。

【0549】

本発明の好ましい実施形態では、医薬組み合わせは、RTEL1標的化オリゴヌクレオチド及びFUBP1標的化オリゴヌクレオチド、又はそれらのコンジュゲートを含むか、

又はそれらからなる。

【0550】

本発明の好ましい実施形態では、医薬組み合わせは、RTEL1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド及びFUBP1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド、又はそれらのコンジュゲートを含むか、又はそれらからなる。

【0551】

RTEL1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載のRTEL1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。FUBP1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載されるFUBP1標的化一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。

10

【0552】

用途

本発明の医薬組み合わせは、B型肝炎ウイルス感染症及び／又は癌の処置、特に慢性HBVを有する患者の処置に使用するためのものである。

【0553】

本発明の医薬組み合わせは、研究試薬として、又は診断、治療及び予防に利用することができる。

【0554】

本発明の医薬組み合わせは、B型肝炎ウイルス標的化療法と免疫療法の併用として使用することができる。

20

【0555】

研究では、そのような組み合わせを使用して、細胞（例えば、インビトロ細胞培養物）及び実験動物におけるRTEL1タンパク質の合成を特異的に調節し、それによって標的の機能分析又は治療的介入の標的としてのその有用性の評価を促進することができる。典型的には、標的調節は、タンパク質を生成するmRNAを分解又は阻害し、それによりタンパク質形成を防止することによって、又はタンパク質を生成する遺伝子若しくはmRNAのモジュレータを分解若しくは阻害することによって達成される。

【0556】

本発明の組み合わせを研究又は診断に使用する場合、標的核酸は、cDNA、又はDNA若しくはRNAに由来する合成核酸であり得る。

30

【0557】

本発明はまた、RTEL1を発現している標的細胞においてRTEL1発現を調節するためのインビボ又はインビトロの方法であって、有効量の本発明の組み合わせを該細胞に投与することを含む方法も、包含する。

【0558】

いくつかの実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞、特にヒト細胞である。標的細胞は、哺乳動物の組織の一部を形成するインビトロ細胞培養物又はインビボ細胞であってよい。好ましい実施形態では、標的細胞は、肝臓中に存在する。標的細胞は肝細胞であってよい。

【0559】

本発明の一態様は、医薬として使用するための本発明の組み合わせに関する。

40

【0560】

本発明の一態様では、本発明の組み合わせは、感染細胞中のcccDNAレベルを減少させることができ、したがってHBV感染を阻害することができる。特に、組み合わせは、感染細胞中における以下のパラメータ(i)cccDNAの減少、及び／又は(ii)pgRNAの減少、及び／又は(iii)HBVDNAの減少、及び／又は(iv)HBVウイルス抗原の減少のうちの1つ又は複数に影響を及ぼすことができる。

【0561】

例えば、HBV感染を阻害する組み合わせは、(i)感染細胞中のcccDNAレベルを、対照と比較して、少なくとも40%、例えば50%、60%、70%、80%、又は

50

90%減少、又は(ii) pgRNAレベルを、少なくとも40%、対照と比較して、例えば50%、60%、70%、80%、又は90%減少させることができる。対照は、未処理の細胞若しくは動物、又は適切な対照で処理された細胞若しくは動物であり得る。

【0562】

HBV感染症の阻害は、HBVに感染した初代ヒト肝細胞を用いてインビトロで、又はヒト化肝細胞PXBマウスモデル(PhoenixBioから入手可能、また、Kakuniet al 2014 Int. J. Mol. Sci. 15:58-74も参照されたい)を用いてインビボで測定することができる。HBsAg及び／又はHBeAgの分泌阻害は、製造業者の指示に従って、例えばCLIA ELISAキット(Autobio Diagnostic)を用いてELISAにより測定することができる。細胞内cccDNA又はHBV mRNA及びpgRNAの減少は、例えば、材料及び方法セクションに記載されるように、qPCRによって測定することができる。試験化合物がHBV感染を阻害するかどうかを評価するためのさらなる方法は、例えば国際公開第2015/173208号に記載されているとおりqPCRにより、又はノーザンブロット、インサイチュハイブリダイゼーション、又は免疫蛍光を用いて、HBV DNAの分泌を測定することである。

10

【0563】

RTEL1レベルの減少のために、本発明の組み合わせは、HBV感染症の発症を阻害するために、又はHBV感染症の処置において、使用することができる。特に、cccDNA(本発明の組み合わせ)の不安定化及び低減は、HBsAgの分泌のみを減少させる化合物と比較して、慢性HBV感染症の発症をより効率的に阻害又は処置する。

20

【0564】

したがって、本発明の一態様は、HBV感染個体におけるcccDNA及び／又はpgRNAを減少させるための本発明の組み合わせの使用に関する。

【0565】

本発明のさらなる態様は、慢性HBV感染症の発症を阻害又は処置するための組み合わせの使用に関する。

【0566】

本発明のさらなる態様は、HBV感染者の感染性を減少させるための、本発明の組み合わせの使用に関する。本発明の特定の態様では、本発明の組み合わせは、慢性HBV感染症の発症を阻害する。

30

【0567】

本発明の組み合わせで処置される(又は本発明の組成物を予防的に受ける)対象は、好ましくはヒトであり、より好ましくはHBsAg陽性及び／又はHBeAg陽性のヒト患者であり、より好ましくはHBsAg陽性及びHBeAg陽性のヒト患者である。

【0568】

したがって、本発明は、有効量の本発明の組み合わせを投与することを含む、HBV感染症を処置する方法に関する。本発明はさらに、慢性HBV感染症に起因する肝硬変及び肝細胞癌腫を予防する方法に関する。

【0569】

本発明はまた、医薬、特にHBV感染症若しくは慢性HBV感染症の処置、又はHBV感染者の感染性の減少に使用するための医薬を製造するための本発明の組み合わせの使用を提供する。好ましい実施形態では、医薬は、皮下投与のための剤形で製造される。

40

【0570】

本発明はまた、医薬を製造するための本発明の組み合わせの使用を提供し、医薬は静脈内投与用の剤形である。

【0571】

本発明の組み合わせは、組み合わせ療法において使用され得る。例えば、本発明の組み合わせは、HBVの処置及び／又は予防のために、インターフェロンα-2b、インターフェロンα-2a、及びインターフェロンアルファコン-1(ペグ化及び非ペグ化)、リ

50

バビリン、ラミブジン（３ＴＣ）、エンテカビル、テノホビル、テルビブジン（ＬｄＴ）、アデホビルなどの他の抗ＨＢＶ剤、又はＨＢＶ ＲＮＡ複製阻害剤、ＨＢｓＡｇ分泌阻害剤、ＨＢＶカプシド阻害剤、アンチセンスオリゴマー（例えば、国際公開第２０１２／１４５６９７号、同第２０１４／１７９６２９号、及び同第２０１７／２１６３９０号に記載）、ｓｉＲＮＡ（例えば、国際公開第２００５／０１４８０６号、同第２０１２／０２４１７０号、同第２０１２／２０５５３６２号、同第２０１３／００３５２０号、同第２０１３／１５９１０９号、同第２０１７／０２７３５０号、及び同第２０１７／０１５１７５号に記載）、ＨＢＶ治療ワクチン、ＨＢＶ予防ワクチン、ＨＢＶ抗体療法（単クローン性又は多クローン性）、又はＴＬＲ２、３、７、８、若しくは９アゴニストなどの他の抗ＨＢＶ剤と組み合わせてもよい。

10

本発明の実施形態

【０５７２】

本発明の以下の実施形態は、本明細書に記載される任意の他の実施形態と組み合わせ使用することができる。

【０５７３】

１．ＲＴＥＬ１の阻害剤及びＦＵＢＰ１の阻害剤を含む組成物。

【０５７４】

２．ＲＴＥＬ１の阻害剤及びＦＵＢＰ１の阻害剤又はそれらの薬学的に許容され得る塩、並びに薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩及び／又はアジュバントを含む、医薬組成物。

20

【０５７５】

３．ＲＴＥＬ１の阻害剤及びＦＵＢＰ１の阻害剤を含むキット。

【０５７６】

４．ＲＴＥＬ１の阻害剤が感染細胞においてｃｃｃＤＮＡを減少させることができる、項目１若しくは２に記載の組成物又は項目３に記載のキット。

【０５７７】

５．ＲＴＥＬ１阻害剤が、哺乳動物ＲＴＥＬ１標的核酸、特にヒトＲＴＥＬ１標的核酸に対して少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％相補的な少なくとも１０ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む、１２～６０ヌクレオチド長、好ましくは１２～３０ヌクレオチド長、より好ましくは１２～２５ヌクレオチド長、さらにより好ましくは１５～２１ヌクレオチド長の核酸分子であり、核酸分子がＲＴＥＬ１の発現を減少させることができる、項目１～４のいずれかに記載の組成物又はキット。

30

【０５７８】

６．哺乳動物ＲＴＥＬ１標的核酸が配列番号１又は２から選択される、項目５に記載の組成物又はキット。

【０５７９】

７．連続ヌクレオチド配列が、配列番号１及び／又は２、好ましくは配列番号１に対して少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９５％相補的である、項目５又は６に記載の組成物又はキット。

40

【０５８０】

８．連続ヌクレオチド配列が、配列番号１及び／又は配列番号２、好ましくは配列番号１の標的核酸に対して少なくとも９８％の相補性である、項目５～７のいずれかに記載の組成物又はキット。

【０５８１】

９．連続ヌクレオチド配列が、配列番号１及び／又は配列番号２、好ましくは配列番号１の標的核酸に対して１００％の相補性である、項目５～８のいずれかに記載の組成物又はキット。

【０５８２】

50

10. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号3～26から選択される標的配列に少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも98%、例えば100%相補的であり、好ましくは、配列番号5、13、14、15、16から選択される標的配列に100%相補的であり；より好ましくは、配列番号14及び16から選択される標的配列に100%相補的である、項目5～9のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0583】

11. RTE L1阻害剤が、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド、s iRNA又はshRNA分子から選択される、項目1～10のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0584】

12. RTE L1阻害剤が、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである、項目1～11のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0585】

13. RTLE1阻害剤が、配列番号1又は2のRTE L1プレmRNAなどのRTE L1プレmRNAなどの哺乳動物RTE L1標的核酸、特に配列番号1のヒトRTE L1プレmRNAなどのヒトRTE L1プレmRNAなどのヒトRTE L1標的核酸に相補的な少なくとも10ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む12～30ヌクレオチド長の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドが、RTE L1の発現を減少させることができる、項目1～12のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0586】

14. 連続ヌクレオチド配列が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド長である、項目13に記載の組成物又はキット。

【0587】

15. 連続ヌクレオチド配列が、12～25、特に15～21ヌクレオチド長である、項目13又は14に記載の組成物又はキット。

【0588】

16. アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号27～246からなる群より選択される配列を含む、項目12～15に記載の組成物又はキット。

【0589】

17. アンチセンスオリゴヌクレオチドが、1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む、項目12～16のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0590】

18. 1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドが、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、及びLNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される、項目17に記載の組成物又はキット。

【0591】

19. 1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、項目17又は18に記載の組成物又はキット。

【0592】

20. アンチセンスオリゴヌクレオチドが少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、項目12～19のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0593】

21. 連続ヌクレオチド配列中の全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、項目12～20のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0594】

22. オリゴヌクレオチドが、RNase Hを動員することができる、項目12～21のいずれかに記載の組成物又はキット。

10

20

30

40

50

【0595】

23. アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列が、式 5' - F - G - F' - 3' のギャップマーからなるか、又はそれを含み、式中、領域 F 及び F' が独立して 1 ~ 4 個の 2' 糖修飾ヌクレオシドを含み、G が RNase H を動員することが可能な 6 ~ 16 個のヌクレオシドの領域、例えば 6 ~ 18 個の DNA ヌクレオシドを含む領域である、項目 12 ~ 22 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0596】

24. RTE L1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、

A A T T t t a c a t a c t c t g G T (配列番号 243)、

10

A A t t t t a c a t a c t c t G G T C (配列番号 244)、

T T a c a t a c t c t g g t C A A A (配列番号 245)、

C T t t a t t a t a a c t T g a A t C T C (配列番号 246)、及び

C T t t a t t a t a a c t t g a a T C T C (配列番号 246)；

好ましくは、T T a c a t a c t c t g g t C A A A (配列番号 245)；又は

C T t t a t t a t a a c t t g a a T C T C (配列番号 246)；

ここで、大文字はベター D-オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、全ての LNA C は 5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、

を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目 12 ~ 23 のいずれかに記載の組成物又はキット。

20

【0597】

25. RTE L1 阻害剤が shRNA である、項目 11 に記載の組成物又はキット。

【0598】

26. RTE L1 阻害剤が siRNA である、項目 11 に記載の組成物又はキット。

【0599】

27. RTE L1 阻害剤が少なくとも 1 つのコンジュゲート部分に共有結合している、項目 1 ~ 26 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0600】

28. コンジュゲート部分が、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミル-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-n-ブタノイル-ガラクトサミン、及び N-イソブタノイルガラクサミンからなる群から選択される、少なくとも 1 つのアシアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含む、項目 27 に記載の組成物又はキット。

30

【0601】

29. アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分が、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) である、項目 28 に記載の組成物又はキット。

【0602】

30. コンジュゲート部分が、アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分に関して、一価、二価、三価、又は四価である、項目 27 又は 28 に記載の組成物又はキット。

40

【0603】

31. コンジュゲート部分が、2 ~ 4 つの末端 GalNAc 部分と、アンチセンス化合物にコンジュゲートされ得るブランチ分子に各 GalNAc 部分を結合するスペーサーと、からなる、項目 30 に記載の組成物又はキット。

【0604】

32. スペーサーが PEG スペーサーである、項目 31 に記載の組成物又はキット。

【0605】

33. コンジュゲート部分が、三価の N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分である、項目 28 ~ 32 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0606】

50

結合しており、及び／又はGN2-C6は、図5D1若しくは図5D2の三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6は、図5D1若しくは図5D2に示される三価N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）残基の混合物であり、[X]は、前述のとおり、c.o.a.を表す、からなる群から選択される、項目28～36のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【0610】

38. コンジュゲートが、図1に示されるコンジュゲートである、項目28～37のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【0611】

39. コンジュゲートが、図2に示されるコンジュゲートである、項目28～37のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【0612】

40. コンジュゲートが、図3に示されるコンジュゲートである、項目28～37のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【0613】

41. コンジュゲートが、図4に示されるコンジュゲートである、項目28～37のいずれか一項に記載の組成物又はキット。
【0614】

42. RTEL1阻害剤が薬学的に許容され得る塩の形態である、項目1～41のいずれかに記載の組成物又はキット。
【0615】

43. 塩が、ナトリウム塩、カリウム塩又はアンモニウム塩である、項目28に記載の組成物又はキット。
【0616】

44. 組成物が、リン酸緩衝生理食塩水などの水性希釈剤又は溶媒を含む、項目1～43のいずれかに記載の組成物又はキット。
【0617】

45. FUBP1の阻害剤が、感染細胞においてcccDNA及び／又はpgRNAを減少させることができる、項目1～44のいずれかに記載の組成物又はキット。
【0618】

46. FUBP1阻害剤が、10～30ヌクレオチド長、好ましくは12～25ヌクレオチド長、特に15～21ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる、12～60ヌクレオチド長、好ましくは12～30ヌクレオチド長、より好ましくは12～25ヌクレオチド長、さらにより好ましくは15～21ヌクレオチド長の核酸分子であり、連続ヌクレオチド配列が、哺乳動物FUBP1標的核酸、特にヒトFUBP1標的核酸に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%の相補性であり、核酸分子が、FUBP1の発現を阻害することができる、項目1～45のいずれかに記載の組成物又はキット。
【0619】

47. 哺乳動物FUBP1標的核酸が配列番号247～254から選択される、項目46に記載の組成物又はキット。
【0620】

48. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号247及び／又は251、好ましくは配列番号247に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%相補的である、項目46又は47に記載の組成物又はキット。
【0621】

49. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号247及び／又は配列番号251、好ましくは配列番号247の標的核酸に対して少なくとも98%の相補性である、項目46～48

10

20

30

40

50

のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0622】

50. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号247及び／又は配列番号251、好ましくは配列番号247の標的核酸に対して100%の相補性である、項目46～49のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0623】

51. 連続ヌクレオチド配列が、ヒトFUBP1のエクソン14又はエクソン20内の領域（表4参照）に対して少なくとも90%相補的である、項目46～50のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0624】

52. 連続ヌクレオチド配列が、ヒトFUBP1のエクソン14又はエクソン20内の領域（表4参照）に対して100%相補的である、項目46～51のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0625】

53. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号247の9141～9156、16184～16205、16188～16205、16184～16203、16184～16200、16186～16203、16189～16205又は30536～30553からなる群から選択される標的配列に対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%相補的である、項目46～50のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0626】

54. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号247の9141～9156、16184～16205、16188～16205、16184～16203、16184～16200、16186～16203、16189～16205又は30536～30553からなる群から選択される標的配列に100%相補的である、項目46～53のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0627】

55. FUBP1阻害剤が、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA又はshRNA分子から選択される、項目1～54のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0628】

56. FUBP1阻害剤が、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである、項目1～55のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0629】

57. FUBP1阻害剤が、哺乳動物FUBP1、特にヒトFUBP1に相補的な少なくとも10ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む12～30ヌクレオチド長の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドが、FUBP1の発現を阻害することができる、項目1～56のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0630】

58. 連続ヌクレオチド配列が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30ヌクレオチド長である、項目57に記載の組成物又はキット。

【0631】

59. 連続ヌクレオチド配列が、12～25、特に15～21ヌクレオチド長である、項目57又は58に記載の組成物又はキット。

【0632】

60. 一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが、配列番号275～330からなる群より選択される配列を含むか又はそれからなる、項目56～59に記載の組成物又はキット。

【0633】

61. アンチセンスオリゴヌクレオチドが、1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドを

10

20

30

40

50

含む、項目 56～60 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0634】

62. 1つ又は複数の 2' 糖修飾ヌクレオシドが、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、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸 (ANA)、2'-フルオロ-ANA、及び LNA ヌクレオシドからなる群から独立して選択される、項目 61 に記載の組成物又はキット。

【0635】

63. 1つ又は複数の 2' 糖修飾ヌクレオシドが LNA ヌクレオシドである、項目 61 又は 62 に記載の組成物又はキット。

【0636】

64. アンチセンスオリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む、項目 56～63 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0637】

65. 連続ヌクレオチド配列中の全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、項目 56～64 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0638】

66. オリゴヌクレオチドが、RNase H を動員することができる、項目 56～65 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0639】

67. アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列が、式 5'-F-G-F'-3' のギャップマーからなるか、又はそれを含み、式中、領域 F 及び F' が独立して 1～4 個の 2' 糖修飾ヌクレオシドを含み、G が RNase H を動員することが可能な 6～16 個のヌクレオシドの領域、例えば 6～18 個の DNA ヌクレオシドを含む領域である、項目 56～66 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0640】

68. FUBP1 の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

CTTatGcttttttatgGT (配列番号 325)、

CTTATgcttttttatgGT (配列番号 325)、

CTtATgcttttttatgGTT (配列番号 326)、

CTtAtgcttttttatgGTT (配列番号 326)、

CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号 326)、

CTtAtgcttttttatGGTT (配列番号 326)、

GcttTtttatggTtCAC (配列番号 327)、

TATgCTtttttatggTtTC (配列番号 328)、

AcCAAtttttcatttCtAC (配列番号 329)、及び

CcccataaccataGTC (配列番号 330)；

好ましくは、CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号 326)；又は

CcccataaccataGTC (配列番号 330)；

ここで、大文字はベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、全ての LNA C は 5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目 56 又は 67 に記載の組成物又はキット。

【0641】

69. FUBP1 阻害剤が shRNA である、項目 55 に記載の組成物又はキット。

【0642】

70. FUBP1 阻害剤が siRNA である、項目 55 に記載の組成物又はキット。

【0643】

10

20

30

40

50

71. F U B P 1 阻害剤が少なくとも1つのコンジュゲート部分に共有結合している、項目1～70のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0644】

72. コンジュゲート部分が、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミル-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-n-ブタノイル-ガラクトサミン、及びN-イソブタノイルガラクトサミンからなる群から選択される、少なくとも1つのアジアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含む、項目71に記載の組成物又はキット。

【0645】

73. アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分が、N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) である、項目72に記載の組成物又はキット。 10

【0646】

74. コンジュゲート部分が、アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分に関して、一価、二価、三価、又は四価である、項目71又は72に記載の組成物又はキット。

【0647】

75. コンジュゲート部分が、2～4つの末端G a l N A c部分と、アンチセンス化合物にコンジュゲートされ得るブランチー分子に各G a l N A c部分を結合するスペーサーと、からなる、項目74に記載の組成物又はキット。

【0648】

76. スペーサーがP E Gスペーサーである、項目75に記載の組成物又はキット。 20

【0649】

77. コンジュゲート部分が、三価のN-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) 部分である、項目71～76のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0650】

78. コンジュゲート部分が、図5の三価G a l N A c部分のうち1つから選択される、項目71～77のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0651】

79. コンジュゲート部分が、図5の三価G a l N A c部分、例えば図5D-1若しくは図5D-2の三価G a l N A c部分、又は両方の混合物である、項目71に記載の組成物又はキット。 30

【0652】

80. アンチセンスオリゴヌクレオチドとコンジュゲート部分との間に位置するリンカーを含み、好ましくはリンカーがC A D N A ジヌクレオチドである、項目71～79のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0653】

81. コンジュゲートが、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_s、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_s、 40

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_sT_s、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_sT_s、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_sT_s、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_sT_s、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sA_sT_sG_sC_sT_sT_sT_sT_sT_sT_sA_sT_sG_sG_sT_sT_s、 50

m C_sA_s^mC、

5' - GN2 - C₆ [X] T_s A_s T_s g_s c_s T_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s g_s g_s t_s T_s T_s T_s ^mC、

5' - GN2 - C₆ [X] A_s c_s ^mC_s A_s A_s t_s t_s t_s t_s t_s c_s a_s t_s t_s t_s ^mC_s t_s A_s ^mC、及び

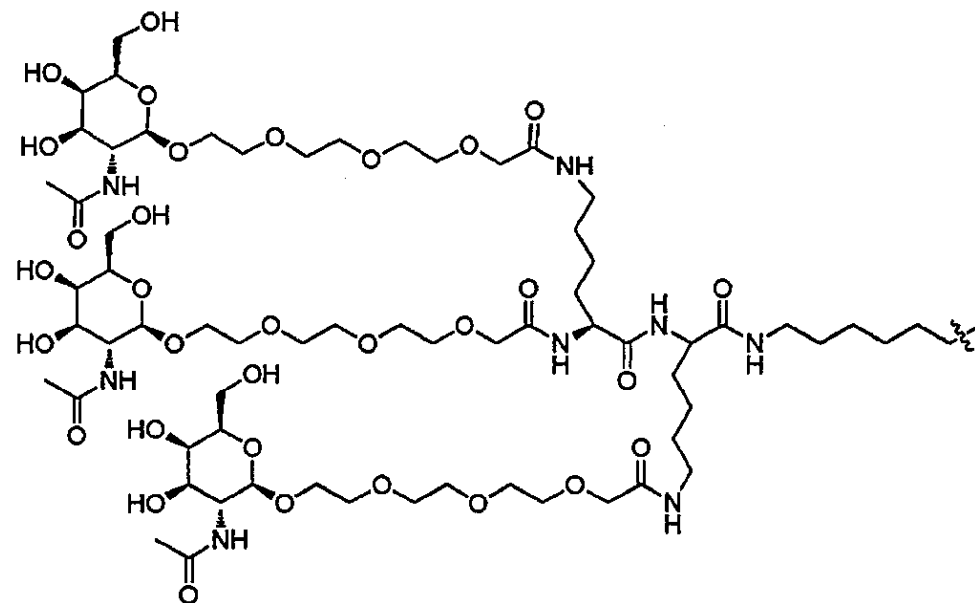
5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_s c_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s ^mC_s；

好ましくは、5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_s T_s t_s A_s t_s g_s c_s t_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s G_s g_s T_s；又は

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_s c_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s ^mC_s；

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、^mCは5-メチルシトシンDNAであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2 - C₆は下記式の残基であり：

【化20】



残基GN2 - C₆は、オリゴヌクレオチドの5'末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又はGN2 - C₆は、図5D1若しくは図5D2の三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2 - C₆は、図5D1若しくは図5D2に示される三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、[X]は、前述のとおり、c_oa_oを表す、からなる群から選択される、項目71～80のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0654】

82. コンジュゲートが、図8に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0655】

83. コンジュゲートが、図9に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0656】

84. コンジュゲートが、図10に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0657】

85. コンジュゲートが、図11に示されるコンジュゲートである、項目71～81の

いずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0658】

86. コンジュゲートが、図12に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0659】

87. コンジュゲートが、図13に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0660】

88. コンジュゲートが、図14に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0661】

89. コンジュゲートが、図15に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0662】

90. コンジュゲートが、図16に示されるコンジュゲートである、項目71～81のいずれか一項に記載の組成物又はキット。

【0663】

91. FUBP1阻害剤が薬学的に許容され得る塩の形態である、項目1～90のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0664】

92. 塩が、ナトリウム塩、カリウム塩又はアンモニウム塩である、項目91に記載の組成物又はキット。

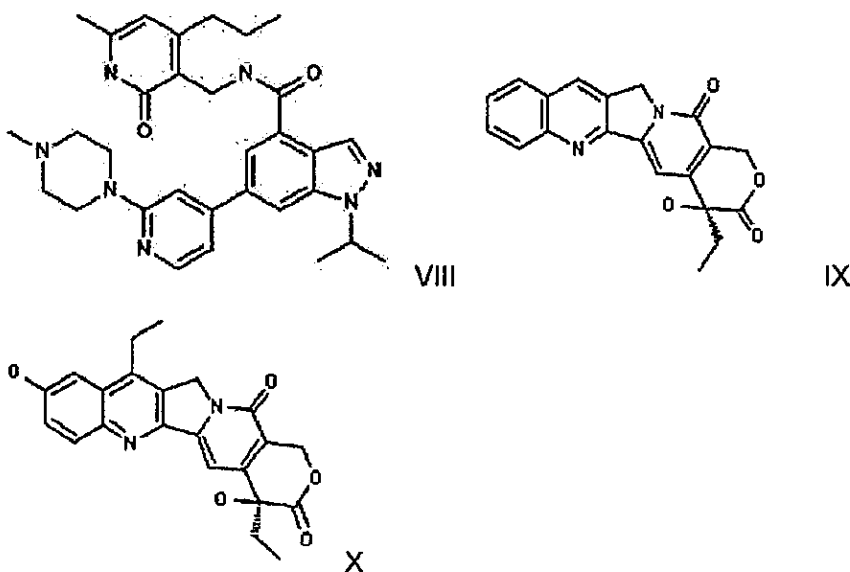
【0665】

93. 組成物が、リン酸緩衝生理食塩水などの水性希釈剤又は溶媒を含む、項目1～92のいずれかに記載の組成物又はキット

【0666】

94. FUBP1阻害剤が、式VII、IX又はXの化合物から選択される、請求項1～44のいずれかに記載の組成物又はキット。

【化21】



95. RTE L1の阻害剤は、AAT T t t a c a t a c t c t g G T (配列番号243)を含むか又はそれからなる、RTE L1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

FUBP1の阻害剤は、FUBP1の発現を減少させることができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

C T T a t G c t t t t t a t g G T (配列番号 325)、
 C T T a T g c t t t t t a t g G T (配列番号 325)、
 C T t A T g c t t t t t a t g G T T (配列番号 326)、
 C T t A t g c t t t t t a t g G T T (配列番号 326)、
 C T t A t g c t t t t t a t G g T T (配列番号 326)、
 C T t A t g c t t t t t a t G G T T (配列番号 326)、
 G c t t T t t a t g g t T t C A C (配列番号 327)、
 T A T g c T t t t t a t g g t T T C (配列番号 328)、
 A c C A A t t t t c a t t t C t A C (配列番号 329)、及び
 C c c c a t a a c c a t a G T C (配列番号 330)；

10

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、
 を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目1～94のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0667】

96. RTE L1の阻害剤が、5'-GN2-C₆[X] A_sA_sT_sT_st_st_sa_s
 s c s a s t s a s c s t s c s t s g s G s T、(図1に示される)からなるコンジュゲートであり、及び

20

FUBP1の阻害剤が、

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s g s G s T (図8に示される)、

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s g s G s T (図9に示される)、

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s g s G s T s T (図10に示される)、

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s g s G s T s T (図11に示される)、

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s G s g s T s T (図12に示される)、

30

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_s
 s G s G s T s T (図13に示される)、

5'-GN2-C₆[X] G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s
^mC_sA_s^mC (図14に示される)、

5'-GN2-C₆[X] T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_s
 t_sT_sT_s^mC (図15に示される)、

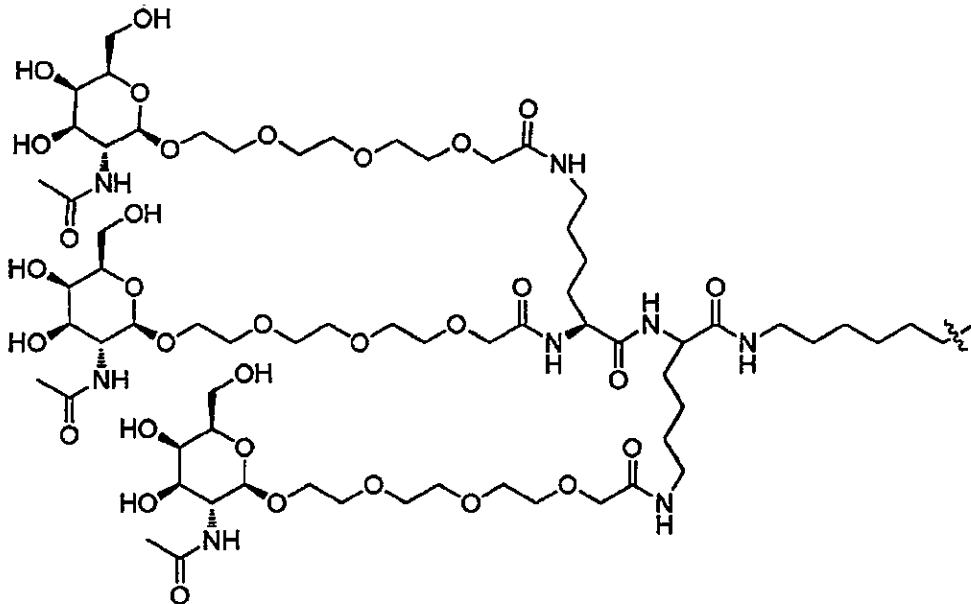
5'-GN2-C₆[X] A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st_s
^mC_st_sA_s^mC (図16に示される)、及び

5'-GN2-C₆[X] ^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG
 s T s ^mC s；

40

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、^mCは5-メチルシトシンDNAであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C₆は下記式の残基であり：

【化 2 2】



10

残基 GN2-C6 は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又は GN2-C6 は、図 5 D 1 若しくは図 5 D 2 の三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6 は、図 5 D 1 若しくは図 5 D 2 に示される三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、[X] は、前述のとおり、c.o.a. を表す、からなる群から選択されるコンジュゲートである、項目 9 5 に記載の組成物又はキット。

20

【0668】

97. RTE L1 の阻害剤は、AA t t t t a c a t a c t c t G G T C (配列番号 244) を含むか又はそれからなる、RTE L1 の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

FUB P1 の阻害剤は、FUB P1 の発現を減少させることができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

30

CTT a t G c t t t t t a t g G T (配列番号 325)、

CTT a T g c t t t t t a t g G T (配列番号 325)、

CTt A T g c t t t t t a t g G T T (配列番号 326)、

CTt A t g c t t t t t a t g G T T (配列番号 326)、

CTt A t g c t t t t t a t G g T T (配列番号 326)、

CTt A t g c t t t t t a t G G T T (配列番号 326)、

G c t t T t t a t g g t T t C A C (配列番号 327)、

T A T g c T t t t t a t g g t T T C (配列番号 328)、

A c C A A t t t t t c a t t t C t A C (配列番号 329) 及び

C c c c a t a a c c a t a G T C (配列番号 330) ;

40

ここで、大文字はベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、全ての LNA C は 5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、

を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目 1 ~ 9 6 に記載の組成物又はキット。

【0669】

98. RTE L1 の阻害剤が、5'-GN2-C6 [X] A s A s t s t s t s t s a s c s a s t s a s c s t s c s t s G s G s T s m C s (図 2 に示される) からなるコンジュゲートであり、

FUB P1 の阻害剤が、

50

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sg_sG_sT (図 8 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sg_sG_sT (図 9 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sg_sG_sT_sT (図 10 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sg_sG_sT_sT (図 11 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sG_sg_sT_sT (図 12 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_s
s_sG_sG_sT_sT (図 13 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s
^mC_sA_s^mC (図 14 に示される)、

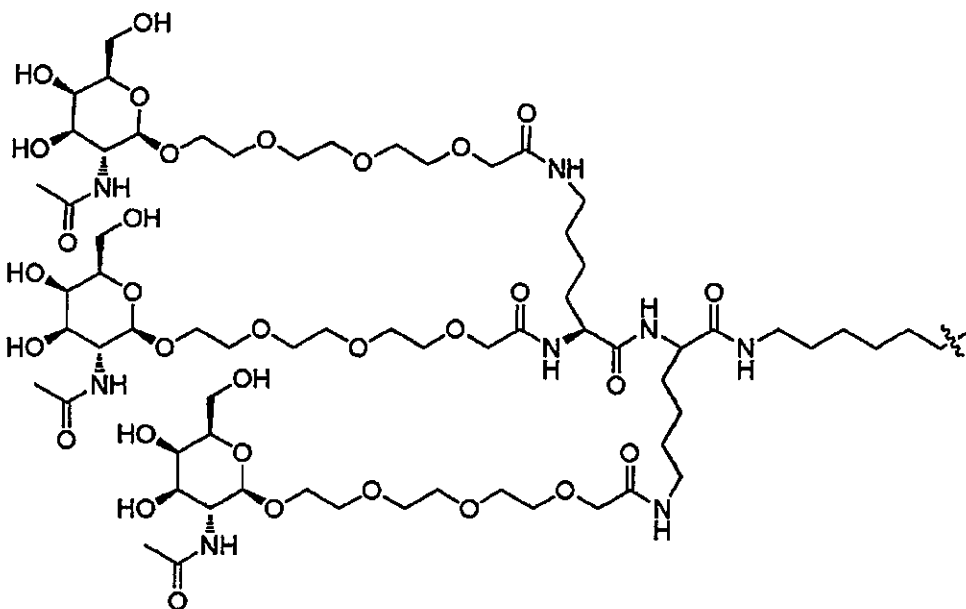
5' - GN2 - C₆ [X] T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_sa_st_sg_sg_s
t_sT_sT_s^mC (図 15 に示される)、

5' - GN2 - C₆ [X] A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st_s
s^mC_st_sA_s^mC (図 16 に示される)、及び

5' - GN2 - C₆ [X] ^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_s
s_sT_s^mC_s ;

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、^mCは5-メチルシトシンDNAであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6は下記式の残基であり：

【化 2 3】



残基GN2-C6は、オリゴヌクレオチドの5'末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又はGN2-C6は、図5D1若しくは図5D2の三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6は、図5D1若しくは図5D2に示される三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物である、

からなる群から選択されるコンジュゲートである、項目97に記載の組成物又はキット。

【0670】

10

20

30

40

50

99. RTEL1の阻害剤は、TTacatactctggTCAA (配列番号245)を含むか又はそれからなる、RTEL1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

FUBP1の阻害剤は、FUBP1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、以下を含むか又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択され：

CTTatGcttttttatgGT (配列番号325)、
 CTTaTgcttttttatgGT (配列番号325)、
 CTtATgcttttttatgGTT (配列番号326)、
 CTtAtgcttttttatgGTT (配列番号326)、
 CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号326)、
 CTtAtgcttttttatGGTT (配列番号326)、
 GcttTtttatggTtCAC (配列番号327)、
 TATgctTtttttatggTtTC (配列番号328)、
 AcCAAtttttcattttCtAC (配列番号329) 及び
 CcccataaccataGTC (配列番号330)；

好ましくは、CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号326)；

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、

を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目1～98のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0671】

100. RTEL1の阻害剤が、5'-GN2-C₆[X]T_sT_sa_sc_sa_st_sa_sc_st_sc_st_sg_sg_st_s^mC_sA_sA_sA_s (図3に示される) からなるコンジュゲートであり、

FUBP1の阻害剤が、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図8に示される)、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図9に示される)、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図10に示される)、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図11に示される)、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT (図12に示される)、

5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT (図13に示される)、

5'-GN2-C₆[X]G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s^mC_sA_s^mC (図14に示される)、

5'-GN2-C₆[X]T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s^mC (図15に示される)、

5'-GN2-C₆[X]A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st_s^mC_st_sA_s^mC (図16に示される)、及び

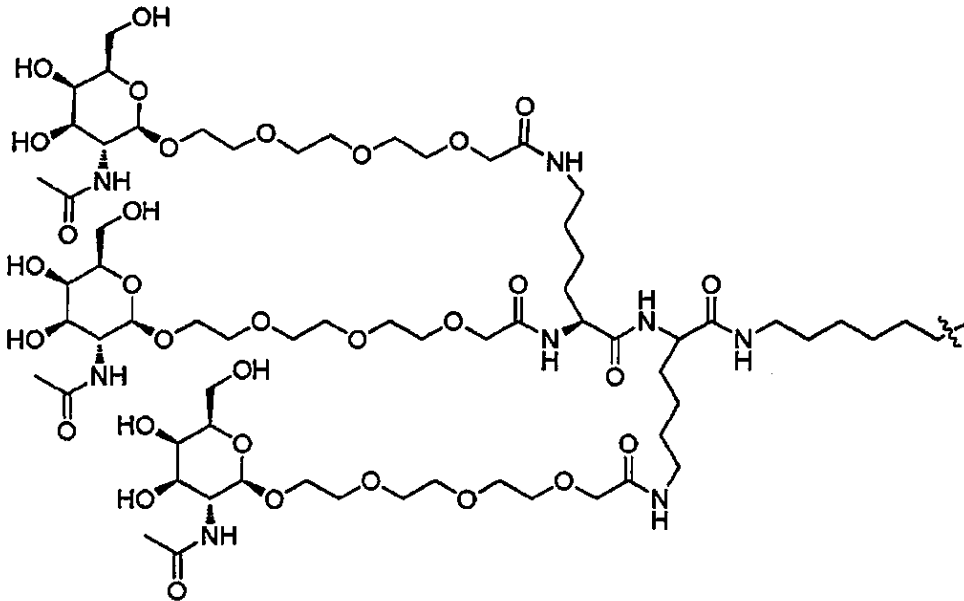
5'-GN2-C₆[X]^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s^mC_s；

好ましくは、5'-GN2-C₆[X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT (図12に示される)；

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌク

レオシドを表し、各 LNA シトシンは 5-メチルシトシンであり、^mC は 5-メチルシトシン DNA であり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字 o はホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6 は下記式の残基であり：

【化 24】



残基 GN2-C6 は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又は GN2-C6 は、図 5D1 若しくは図 5D2 の三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6 は、図 5D1 若しくは図 5D2 に示される三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、[X] は、前述のとおり、c o a o を表す、

からなる群から選択されるコンジュゲートである、項目 99 に記載の組成物又はキット。

【0672】

101. RTE L1 の阻害剤は、CTttattataactTgaAtCTC (配列番号 246) を含むか又はそれからなる、RTE L1 の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

FUBP1 の阻害剤は、FUBP1 の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、以下を含むか又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択され：

CTTatGcttttttatgGT (配列番号 325)、
 CTTaTgcttttttatgGT (配列番号 325)、
 CTtATgcttttttatgGTT (配列番号 326)、
 CTtAtgcttttttatgGTT (配列番号 326)、
 CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号 326)、
 CTtAtgcttttttatGGTT (配列番号 326)、
 GcttTttatggtTtCAC (配列番号 327)、
 TATgcttttttatggtTTC (配列番号 328)、
 AcCAAatttttcatttCtAC (配列番号 329) 及び
 CcccataaaccataGTC (配列番号 330)；

ここで、大文字はベータ-D-オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、全ての LNA C は 5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、

を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目 1～100 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0673】

102. RTE L1の阻害剤が、5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_sT_sg_sa_sA_st_s^mC_sT_s^mC_s (図4に示される) からなるコンジュゲートであり、及び

FUBP1の阻害剤が、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図8に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図9に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図10に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図11に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT (図12に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT (図13に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s^mC_sA_s^mC (図14に示される)、

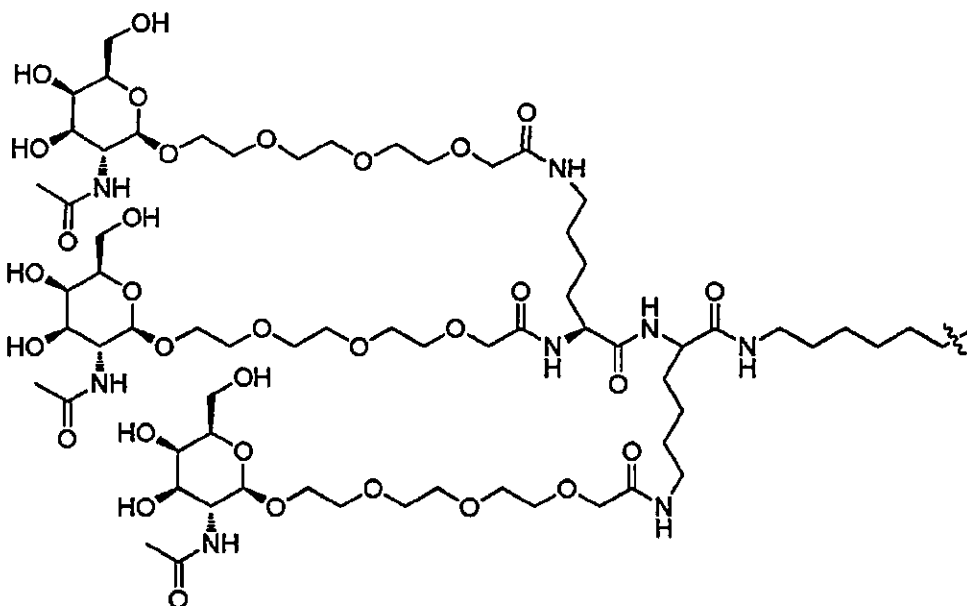
5'-GN2-C₆ [X] T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s^mC (図15に示される)、

5'-GN2-C₆ [X] A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st_s^mC_st_sA_s^mC (図16に示される)、及び

5'-GN2-C₆ [X] ^mC_sc_sc_sc_sa_st_sa_sa_sc_sc_sa_st_sa_sG_sT_s^mC_s;

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、^mCは5-メチルシトシンDNAであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字oはホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6は下記式の残基であり：

【化25】



残基GN2-C6は、オリゴヌクレオチドの5'末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又はGN2-C6は、図5D1若しくは図5D2の三価N-アセチ

ルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6は、図5D1若しくは図5D2に示される三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、[X]は、前述のとおり、 $c_0 a_0$ を表す、からなる群から選択されるコンジュゲートである、項目101に記載の組成物又はキット。

【0674】

103. RTE L1の阻害剤は、CTttattataacttgaaTCTC (配列番号246)を含むか又はそれからなる、RTE L1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

FUBP1の阻害剤は、FUBP1の発現を阻害することができる一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、以下を含むか又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択され：

CTTAatGcttttttatgGT (配列番号325)、
CTTAatGcttttttatgGT (配列番号325)、
CTtATgcttttttatgGTT (配列番号326)、
CTtAtgcttttttatgGTT (配列番号326)、
CTtAtgcttttttatGgTT (配列番号326)、
CTtAtgcttttttatGGTT (配列番号326)、
GcttTttatggTtCAC (配列番号327)、
TATgcttttttatggTtTC (配列番号328)、
AcCAAatttttcattttCtAC (配列番号329) 及び
CcccataaccataGTC (配列番号330)；

好ましくは、CcccataaccataGTC (配列番号330)；

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、項目1~102のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0675】

104. RTE L1の阻害剤が、5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_st_st_sa_st_st_sa_st_sa_sa_sc_st_st_sg_sa_sa_sT_s^mC_sT_s^mC_sからなるコンジュゲートであり、及び

FUBP1の阻害剤が、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_sT_sa_st_sG_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図8に示される)、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_sT_sa_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT (図9に示される)、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_st_sA_sT_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図10に示される)、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sg_sG_sT_sT (図11に示される)、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sg_sT_sT (図12に示される)、

5'-GN2-C6 [X]^mC_sT_st_sA_st_sg_sc_st_st_st_st_st_sa_st_sG_sG_sT_sT (図13に示される)、

5'-GN2-C6 [X]G_sc_st_st_sT_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_st_s^mC_sA_s^mC (図14に示される)、

5'-GN2-C6 [X]T_sA_sT_sg_sc_sT_st_st_st_st_sa_st_sg_sg_st_sT_sT_s^mC (図15に示される)、

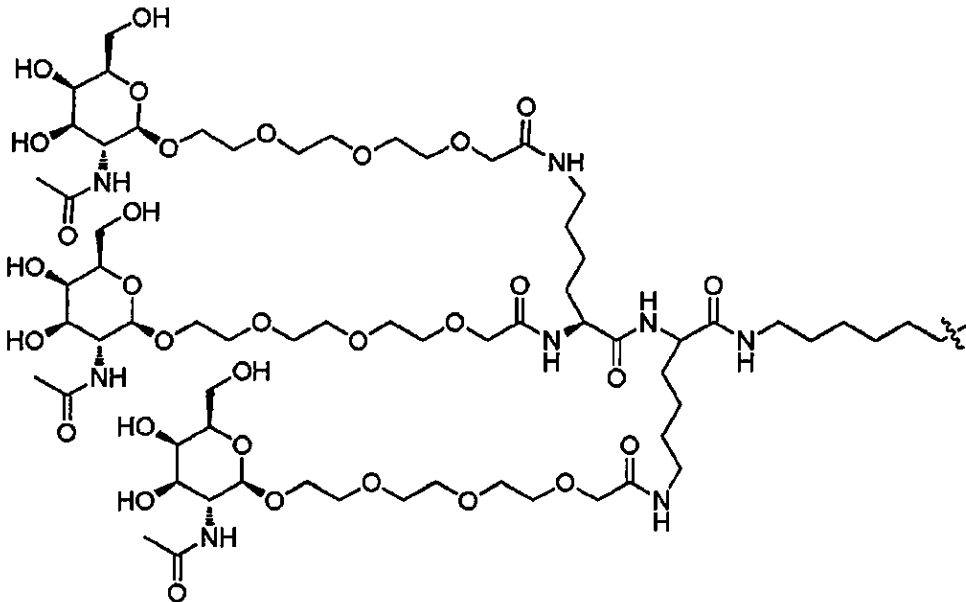
5'-GN2-C6 [X]A_sc_s^mC_sA_sA_st_st_st_st_sc_sa_st_st_st

$s^m C_s t A_s^m C$ (図 16 に示される)、及び

$5' - GN2 - C_6 [X]^m C_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s^m C_s$;

好ましくは、 $5' - GN2 - C_6 [X]^m C_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s^m C_s$; ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、各LNAシトシンは5-メチルシトシンであり、 mC は5-メチルシトシンDNAであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字 o はホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、 $GN2 - C_6$ は下記式の残基であり：

【化 26】



残基 $GN2 - C_6$ は、オリゴヌクレオチドの $5'$ 末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又は $GN2 - C_6$ は、図 5 D 1 若しくは図 5 D 2 の三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、 $GN2 - C_6$ は、図 5 D 1 若しくは図 5 D 2 に示される三価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、 $[X]$ は、前述のとおり、 $c_o a_o$ を表す、からなる群から選択されるコンジュゲートである、項目 103 に記載の組成物又はキット。

【0676】

105. 疾患の処置又は予防に使用するための、項目 1 ~ 104 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0677】

106. B型肝炎ウイルス (HBV) 感染症の処置又は予防に使用するための、項目 1 ~ 105 のいずれかに記載の組成物又はキット。

【0678】

107. 疾患の処置又は予防に使用するための RTEL1 の阻害剤であって、処置又は予防が、FUBP1 の阻害剤の投与をさらに含む、RTEL1 の阻害剤。

【0679】

108. B型肝炎ウイルス (HBV) 感染症及び／又は癌の処置又は予防において、好ましくはHBV関連肝細胞癌腫 (HCC) を発症するリスクがある、発症したことがある、又は以前に発症したことがある対象において使用するための、RTEL1 の阻害剤であって、処置又は予防が、FUBP1 の阻害剤の投与をさらに含む、RTEL1 の阻害剤。

【0680】

109. RTEL1 の阻害剤が、項目 4 ~ 44 のいずれかで定義される阻害剤である、

項目 1 0 7 又は 1 0 8 のいずれかに記載の使用のための R T E L 1 の阻害剤。

【 0 6 8 1 】

1 1 0 . 疾患の処置又は予防に使用するための F U B P 1 の阻害剤であって、処置又は予防が、R T E L 1 の阻害剤の投与をさらに含む、F U B P 1 の阻害剤。

【 0 6 8 2 】

1 1 1 . B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症及び／又は癌の処置又は予防において、好ましくは H B V 関連肝細胞癌腫 (H C C) を発症するリスクがある、発症したことがある、又は以前に発症したことがある対象において使用するための、F U B P 1 の阻害剤であって、処置又は予防が、R T E L 1 の阻害剤の投与をさらに含む、F U B P 1 の阻害剤。

【 0 6 8 3 】

1 1 2 . F U B P 1 の阻害剤が、項目 4 5 ～ 9 4 のいずれかで定義される阻害剤である、項目 1 1 0 又は 1 1 1 のいずれかに記載の使用のための F U B P 1 の阻害剤。

【 0 6 8 4 】

1 1 3 . 疾患の処置又は予防に使用するための、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤との組み合わせ。

【 0 6 8 5 】

1 1 4 . 疾患の処置又は予防に使用するための、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤との組み合わせであって；R T E L 1 阻害剤が、項目 4 ～ 4 4 のいずれかに記載の阻害剤である、組み合わせ。

【 0 6 8 6 】

1 1 5 . 項目 1 1 3 又は 1 1 4 に記載の、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤との組み合わせであって；F U B P 1 阻害剤が、項目 4 5 ～ 9 4 のいずれかに記載の阻害剤である、組み合わせ。

【 0 6 8 7 】

1 1 6 . B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症及び／又は癌の処置又は予防において、好ましくは H B V 関連肝細胞癌腫 (H C C) を発症するリスクがある、発症したことがある、又は以前に発症したことがある対象において使用するための、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤の組み合わせ。

【 0 6 8 8 】

1 1 7 . 項目 1 1 6 に記載の使用のための、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤との組み合わせであって；R T E L 1 阻害剤が、項目 4 ～ 4 4 のいずれかに記載の阻害剤である、組み合わせ。

【 0 6 8 9 】

1 1 8 . 項目 1 1 6 又は 1 1 7 に記載の使用のための、R T E L 1 の阻害剤と F U B P 1 の阻害剤との組み合わせであって；F U B P 1 阻害剤が、項目 4 5 ～ 9 4 のいずれかに記載の阻害剤である、組み合わせ。

【 0 6 9 0 】

1 1 9 . H B V 感染症が慢性 H B V 感染症である、項目 1 0 5 又は 1 0 6 に記載の使用のための組成物又はキット；項目 1 0 7 ～ 1 0 9 のいずれかに記載の使用のための R T E L 1 の阻害剤；項目 1 1 0 ～ 1 1 2 のいずれかに記載の使用のための F U B P 1 の阻害剤；又は項目 1 1 3 ～ 1 1 8 のいずれかに記載の使用のための組み合わせ。

【 0 6 9 1 】

1 2 0 . R T E L 1 阻害剤が感染細胞において c c c D N A を減少させることができる、項目 1 0 5 又は 1 0 6 に記載の使用のための組成物又はキット；項目 1 0 7 ～ 1 0 9 のいずれかに記載の使用のための R T E L 1 の阻害剤；項目 1 1 0 ～ 1 1 2 のいずれかに記載の使用のための F U B P 1 の阻害剤；又は項目 1 1 3 ～ 1 1 8 のいずれかに記載の使用のための組み合わせ。

【 0 6 9 2 】

1 2 1 . H B V 感染細胞における c c c D N A が、対照と比較した場合に少なくとも 6 0 % 減少する、使用のための組成物又はキット；使用のための R T E L 1 の阻害剤；使用

10

20

30

40

50

のための F U B P 1 の阻害剤；又は項目 1 2 0 に記載の使用のための組み合わせ。

【0693】

1 2 2 . 疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量の R T E L 1 の阻害剤を投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法であって、有効量の F U B P 1 の阻害剤の投与をさらに含む方法。

【0694】

1 2 3 . 疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量の F U B P 1 の阻害剤を投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法であって、有効量の R T E L 1 の阻害剤の投与をさらに含む方法。

【0695】

1 2 4 . 疾患に罹患しているか又は罹患しやすい対象に、治療有効量又は予防有効量の R T E L 1 の阻害剤と治療有効量又は予防有効量の F U B P 1 の阻害剤との組み合わせを投与することを含む、疾患を処置又は予防する方法。

【0696】

1 2 5 . B 型肝炎ウイルス (H B V) 及び／又は癌を処置又は予防するための医薬を調製するための、F U B P 1 の阻害剤及び R T E L 1 の阻害剤の使用。

【0697】

1 2 6 . 疾患が B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症及び／又は癌である、項目 1 2 2 ~ 1 2 5 のいずれかに記載の方法又は使用。

【0698】

1 2 7 . 疾患が慢性 B 型肝炎ウイルス (H B V) 感染症である、項目 1 2 2 ~ 1 2 6 のいずれかに記載の方法又は使用。

【0699】

1 2 8 . R T E L 1 及び F U B P 1 を発現している標的細胞において R T E L 1 及び F U B P 1 の発現を調節するためのインビボ又はインビトロの方法であって、R T E L 1 の阻害剤及び F U B P 1 の阻害剤を有効量で該細胞に投与することを含む方法。

【0700】

1 2 9 . R T E L 1 の阻害剤が、項目 4 ~ 4 4 のいずれかに定義される阻害剤、又は項目 2 に記載の医薬組成物である、項目 1 2 2 ~ 1 2 8 のいずれかに記載の方法又は使用。

【0701】

1 3 0 . F U B P 1 の阻害剤が、項目 4 5 ~ 9 4 のいずれかに定義される阻害剤、又は項目 2 に記載の医薬組成物である、項目 1 2 2 ~ 1 2 9 のいずれかに記載の方法又は使用。

【0702】

1 3 1 . R T E L 1 及び F U B P 1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる化合物であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

C C C C A T A A C C A T A G T C C A C T T T A T T A T A A C T T G A A T C T C
(配列番号 3 4 8) ;

C T T T A T T A T A A C T T G A A T C T C C A C C C C A T A A C C A T A G T C
(配列番号 3 4 9) ;

C T T A T G C T T T T T A T G G T T C A T T A C A T A C T C T G G T C A A A (配列番号 3 5 0) ; 又は

T T A C A T A C T C T G G T C A A A C A C T T A T G C T T T T T A T G G T T (配列番号 3 5 1) ;

好ましくは、

C T T A T G C T T T T T A T G G T T C A T T A C A T A C T C T G G T C A A A (配列番号 3 5 0) ; 又は

T T A C A T A C T C T G G T C A A A C A C T T A T G C T T T T T A T G G T T (配列番号 3 5 1)

10

20

30

40

50

を含むか又はそれからなるヌクレオチド配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、化合物。

【0703】

132. RTE L1 及び FUBP1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる化合物であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

$mC_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s mC_o c_o a_o mC_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s t_s g_s a_s a_s T_s mC_s T_s mC$;

$mC_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s t_s g_s a_s a_s T_s mC_s T_s mC_o c_o a_o mC_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s mC$;

$mC_s T_s t_s A_s t_s g_s c_s t_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s G_s g_s T_s T_o c_o a_o T_s T_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s g_s t_s mC_s A_s A_s A$; 又は

$T_s T_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s g_s t_s mC_s A_s A_s A_o c_o a_o mC_s T_s t_s A_s t_s g_s c_s t_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s G_s g_s T_s T$;

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、 mC は5-メチルシトシンLNAであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字 o はホスホジエステルヌクレオシド間結合を表す、

を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、化合物。

【0704】

133. RTE L1 及び FUBP1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる化合物であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

5'-GN2-C6 [X] $mC_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s mC_o c_o a_o mC_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s t_s g_s a_s a_s T_s mC_s T_s mC$;

5'-GN2-C6 [X] $mC_s T_s t_s t_s a_s t_s t_s a_s t_s a_s a_s c_s t_s t_s g_s a_s a_s T_s mC_s T_s mC_o c_o a_o mC_s c_s c_s c_s a_s t_s a_s a_s c_s c_s a_s t_s a_s G_s T_s mC$;

5'-GN2-C6 [X] $mC_s T_s t_s A_s t_s g_s c_s t_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s G_s g_s T_s T_o c_o a_o T_s T_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s g_s t_s mC_s A_s A_s A$ 、又は

5'-GN2-C6 [X] $T_s T_s a_s c_s a_s t_s a_s c_s t_s c_s t_s g_s g_s t_s mC_s A_s A_s A_o c_o a_o mC_s T_s t_s A_s t_s g_s c_s t_s t_s t_s t_s t_s a_s t_s G_s g_s T_s T$;

ここで、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、 mC は5-メチルシトシンLNAであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、下付き文字 o はホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、GN2-C6 は下記式の残基であり：

10

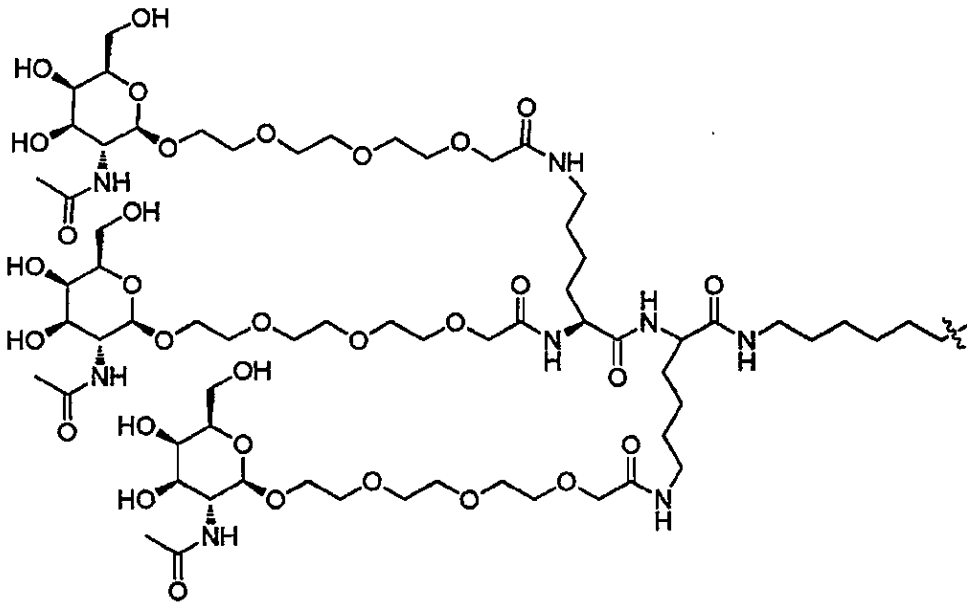
20

30

40

50

【化 27】



10

残基 GN2-C6 は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端にホスホジエステル結合を介して結合しており、及び／又は GN2-C6 は、図 5D1 若しくは図 5D2 の三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、又は両方の混合物であり、より好ましくは、GN2-C6 は、図 5D1 若しくは図 5D2 に示される三価 N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 残基の混合物であり、[X] は、前述のとおり、c.o.a.o. を表す、を含むか又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、化合物。

20

【0705】

134. RTE L1 及び FUBP1 の発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる化合物であって、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、表 12D 又は表 15B に示される HELM 配列のいずれかを含むか又はそれからなる配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの群から選択される、化合物。

30

【0706】

135. 疾患、好ましくは B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染症の処置又は予防に使用するための、項目 131～134 のいずれかに記載の化合物。

【0707】

136. B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染症及び／又は癌の処置又は予防において、好ましくは HBV 関連肝細胞癌腫 (HCC) を発症するリスクがある、発症したことがある、又は以前に発症したことがある対象において使用するための、項目 131～134 のいずれかに記載の化合物。

【0708】

137. 疾患、好ましくは B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染症及び／又は癌を、より好ましくは HBV 関連肝細胞癌腫 (HCC) を発症するリスクがある、発症したことがある、又は以前に発症したことがある対象において処置又は予防する方法であって；治療有効量又は予防有効量の項目 131～134 のいずれかに記載の化合物を投与することを含む、方法。

40

【0709】

138. B 型肝炎ウイルス (HBV) 及び／又は癌を処置又は予防するための医薬を調製するための、項目 13～134 のいずれかに記載の化合物の使用。

【0710】

139. RTE L1 及び FUBP1 を発現している標的細胞において RTE L1 及び FUBP1 の発現を調節するためのインビボ又はインビトロの方法であって、項目 131～

50

134のいずれかに記載の化合物を有効量で該細胞に投与することを含む方法。

【実施例】

【0711】

実施例1－RTEL1を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチド

材料及び方法

オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド合成は、当技術分野で一般に知られている。以下は、適用できるプロトコルである。本発明のオリゴヌクレオチドは、使用される装置、支持体、及び濃度に関してわずかに異なる方法によって、生成されている場合がある。

【0712】

オリゴヌクレオチドは、Oligomaker 48のホスホロアミダイトアプローチを1 μ molスケールで用いて、ウリジンユニバーサル支持体上で合成される。合成の最後に、水性アンモニアを60℃で5～16時間使用してオリゴヌクレオチドを固相支持体から切断する。オリゴヌクレオチドを逆相HPLC (RP-HPLC) 又は固相抽出によって精製し、UPLCによって特徴付け、分子量をさらにESI-MSによって確認する。

【0713】

β -シアノエチル-ホスホロアミダイトのカップリング (DNA-A (Bz)、DNA-G (ibu)、DNA-C (Bz)、DNA-T、LNA-5-メチル-C (Bz)、LNA-A (Bz)、LNA-G (dmf)、又はLNA-T) は、アセトニトリル中の0.1Mの5'-O-DMT保護アミダイト及びアセトニトリル (0.25M) 中のDCI (4, 5-ジシアノイミダゾール) の溶液を活性剤として用いて行われる。最終サイクルでは、所望の修飾を有するホスホロアミダイト、例えばコンジュゲート基を結合するためのC6リンカー、又はそのようなコンジュゲート基を使用できる。ホスホルチオエート結合を導入するためのチオール化は、水素化キサンタン (アセトニトリル/ピリジン9:1中0.01M) を用いることにより行われる。ホスホジエステル結合は、THF/ピリジン/水7:2:1中の0.02Mヨウ素を用いて導入できる。残りの試薬は、オリゴヌクレオチド合成に通常使用される試薬である。

【0714】

固相合成後のコンジュゲートでは、固相合成の最後のサイクルで市販のC6アミノリンカーホルフォラミダイトを使用でき、脱保護及び固相支持体からの切断後、アミノ結合脱保護オリゴヌクレオチドが単離される。コンジュゲートは、標準的な合成方法を使用した官能基の活性化によって導入される。

【0715】

粗化合物は、Phenomenex Jupiter (登録商標) C18 10 μ 150 x 10mmカラムでの分取RP-HPLCにより精製される。0.1M酢酸アンモニウムpH8及びアセトニトリルを5mL/分の流速で緩衝液として使用する。収集された画分を凍結乾燥して、精製された化合物を典型的には白色固体として得る。

【0716】

略語：

DCI：4, 5-ジシアノイミダゾール

DCM：ジクロロメタン

DMF：ジメチルホルムアミド

DMT：4, 4'-ジメトキシトリチル

THF：テトラヒドロフラン

Bz：ベンゾイル

Ibu：イソブチリル

RP-HPLC：逆相高速液体クロマトグラフィ

初代ヒト肝細胞 (PXB-PHH)

ヒト化マウス (uPA/SCID)

【0717】

10

20

30

40

50

マウス) (本明細書ではPHHと呼ばれる) から採取した新鮮な初代ヒト肝細胞 (PXB-PHH) を、Phoenix Bio Co., Ltd (日本) から96ウェル形式で入手し、改変肝細胞クローン増殖培地 (dHCGM) 中で培養した。dHCGMは、100 U/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシン、20 mMのHepes、44 mMのNaHCO₃、15 µg/mlのL-ブロリン、0.25 µg/mlのインスリン、50 nMのデキサメタゾン、5 ng/mlのEGF、0.1 mMのAsc-2P、2%のDMSO及び10%のFBSを含有するDMEM培地である (Ishida et al., 2015)。

【0718】

細胞を、5% CO₂を含む加湿雰囲気下において37℃で培養した。培養培地を、週末を除いて、採取まで2日毎に交換した。

【0719】

HBV感染及びオリゴヌクレオチド処置 (RTEL1)

PHHを、4% PEGと共に40の感染多重度 (MOI) でHBV (慢性B型肝炎 (CHB) 個体から精製) と24時間インキュベートした。翌日、ウイルス接種材料を除去し、細胞をPBSで3回洗浄した後、新鮮な培地を添加した。

【0720】

PHHにおけるcccDNA確立化合物処置を、HBV感染後3日目に開始した。細胞を、10 µMで開始する1:10希釈段階用量応答様式で投与した。HBV感染後3日目、5日目及び7日目に、細胞に、100 µI/ウェルのdHCGM培地の最終容量でオリゴヌクレオチド化合物を投与した。感染後5日目に10 nMのエンテカビル (ETV) 処置を開始し、qPCRによる実際のcccDNA測定を確実にし、HBV感染後16日目に細胞が採取されるまで、10 nMのETVを含む培地を (週末を除いて) 2日毎に交換した。実験を生物学的に三連で行った。

【0721】

HBV感染及びオリゴヌクレオチド処置 (FUBP1)

到着したら、PHH培地中の4% (v/v) PEG中でPHH細胞をHBVと共に16時間インキュベートすることによって、慢性患者由来の精製接種物 (遺伝子型C) を使用してPHHにMOI 110を感染させた。次いで、細胞をPBSで3回洗浄し、新鮮なPHH培地中で5% CO₂の加湿雰囲気中で培養した。感染の4日後、細胞を、10 µMの最終濃度のFUBP1 LNA (表1.1参照) で二連で、又は薬物なし対照 (NDC) としてPBSで処理した。処理の当日に、古い培地を細胞から除去し、400 µl/ウェルの新鮮なPHH培地と交換した。ウェル毎に、100 µLの50 µMの各FUBP1 LNA又はNDCとしてのPBSを400 µLのPHH培地に添加した。感染後4、11及び18日目に同じ処置を3回繰り返した。細胞培養培地を、感染後7、14及び21日目に、3日毎に新鮮培地と交換した。

【0722】

細胞内RTEL1 RNAのリアルタイムPCR

製造業者のプロトコルに従って、Qiagen BioRobot Universal System、及びRNeasy 96ウェル抽出プレート (RNeasy 96 BioRobot 8000 Kit (12) /カタログ番号II D: 967152)

を使用して細胞から全mRNAを抽出した。ABI QuantStudio (商標) 12k FlexでリアルタイムPCRを使用してmRNA発現レベルを分析した。β-アクチン (ACT B) を、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life Technologies、カタログ番号4444558) を用いてqPCRによって技術的複製で定量した。Fast SYBR (商標) Green Master Mix (Life Technologies、カタログ番号4385612) を用いて、RTEL1遺伝子に対するqPCRを行った。結果はヒトACT B内因性対照で正規化した。mRNA発現は、参照遺伝子ACT B及び未処置細胞に対して正規化した比較サイクル閾値2-ΔΔCt法を用いて分析した。ACTB RNA及びRTE

10

20

30

40

50

L 1 RNAの定量に用いられるプライマーを表16に列挙する。

【表16】

表16：ACT B及びRTEL1 RNA qPCRプライマー

パラメータ	方向	プライマー配列	配列番号
RTEL1	Fwd	5'-CCATCCTGGACATTGAGGACT-3'	332
	Rev	5'-CAGGTTCCGGGACAGGTAGTA-3'	333
ハウスキーピング遺伝子プライマー-ACT B (VIC):Hs01060665_g1 (Thermo Fisher Scientific)			

10

【0723】

HBV cccDNAの定量

DNAを、SDS溶解緩衝液(50mM Tris pH8、5mM EDTA、1% SDS)を使用してHBV感染初代ヒト肝細胞から抽出した。細胞を80μlのSDS溶解緩衝液で溶解した後、試料を-80℃で最低2時間凍結した。試料を37℃で解凍し、1μlのプロテイナーゼK(Ambion biosciencesのカatalog番号AM25448、20mg/mLストック)を96ウェルプレートの各ウェルに添加し、試料を56℃で30分間インキュベートした。インキュベーション後、ZYMO Research Genomic DNA Clean&Concentratorキット(ZymoResearch、カatalog番号D4067)からの3容量のChIP DNA結合緩衝液を添加し、製造業者のプロトコルに従ってDNAを精製した。DNAを20μlのDNA溶出緩衝液で溶出し、2μlのDNAを用いてqPCRを行った。

20

【0724】

cccDNA発現レベルを、比較サイクル閾値 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用して技術的複製で定量した。QuantStudio 12K Flex PCR System(Applied Biosystems)で定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応測定を行った。Fast SYBR(商標)Green Master Mix(Life Technologies、カatalog番号4385612)を使用して、ミトコンドリアDNA(mitoDNA)及び内因性対照として未処置細胞に対して正規化を行った。サイク

30

【表17】

表17：cccDNA qPCRプライマー。

パラメータ	方向	プライマー配列	配列番号
cccDNA	Fwd	5'-CGTCTGTGCCTTCTCATCTGC-3'	333
	Rev	5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGAA-3'	334
ミトコンドリアDNA	Fwd	5'-CCGTCTGAACTATCCTGCCC-3'	335
	Rev	5'-GCCGTAGTCGGTGTACTCGT-3'	336

40

【0725】

実施例1. 1-HBV感染PHH細胞におけるRTEL1 RNA及びcccDNAに対するRTEL1を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果。

RTEL1 RNA及びcccDNAに対するRTEL1ノックダウンの効果を、表6のオリゴヌクレオチド化合物を用いて試験した。PHHは、材料及び方法のセクションに記載されているとおりに培養した。HBV感染PHH細胞を、上記の表6の化合物で処置した。16日間の処置後、RTEL1 mRNA及びcccDNAを上記のようにqPCRによって測定した。結果を、平均薬物なし対照(NDC)試料の%として表18に示す

50

(すなわち、値が低いほど、阻害／減少は大きくなる)。

【表 18】

表 18 : LNA ASO による RTEL1 ノックダウン後の cccDNA に対する効果

番号 CMP	配列番号	化合物	対照の cccDNA% (平均)	cccDNA SD	対照の RTEL% (平均)	RTEL SD
243_1	243	AATTtacatactctgGT	28	13	19	3
244_1	244	AAtttacatactctGGTC	3	1	24	2
245_1	245	TTacatactctggtCAAA	21	6	35	11
246_1	246	CTttattataactTgaAtCTC	39	5	21	8

10

化合物について：大文字は LNA ヌクレオシドを表し（ベーター-D-オキシ LNA ヌクレオシドを使用した）、全ての LNA シトシンは 5-メチルシトシンであり、小文字は DNA ヌクレオシドを表す。全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0726】

実施例 1. 2-用量応答曲線のための異なる濃度でのヒト MDA-MB-231 細胞株における RTEL1 mRNA を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ有効性の試験。

20

ヒト MDA-MB-231 細胞株は ATCC から購入し、供給業者による推奨のとおり、37℃、5% CO₂ の加湿インキュベーター内で維持した。アッセイでは、3500 細胞／ウェルを培地中の 96 マルチウェルプレートに播種した。細胞を 24 時間インキュベートした後、PBS に溶解したオリゴヌクレオチドを添加した。オリゴヌクレオチドの最高スクリーニング濃度：50 μM 及びその後の 8 段階の 1：1 希釈。オリゴヌクレオチドの添加の 3 日後に、細胞を採取した。RNA は、製造元の指示に従って PureLink (商標) Pro 96 RNA Purification キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して抽出し、50 μl の水で溶出した。続いて RNA を DNase/RNase フリー水 (Gibco) で 10 倍に希釈し、90℃で 1 分間加熱した。

30

【0727】

遺伝子発現解析では、One Step RT-qPCR を、二重鎖セットアップで、qScript (商標) XLT One-Step RT-qPCR Tough Mix (登録商標)、Low ROX (商標) (Quantabio) を使用して実施した。次の TaqMan プライマーアッセイを qPCR に使用した：RTEL1_Hs00249668_m1 [FAM-MGB] 及び内因性対照 GUSB_Hs99999908_m1 [VIC-MGB]。全てのプライマーセットは、ThermoFisher Scientific 社から購入した。IC50 決定を、n=2 の生物学的複製物からの Graph Pad Prism 7.04 において行った。50 μM オリゴヌクレオチドで処置したときの相対的な RTEL1 mRNA レベルを対照 (PBS 処置試料) のパーセントとして表 19 に示す。

40

【表 19】

表 19：最大 K_D での IC_{50} 値及びmRNAレベル

配列番号	モチーフ	CMP番号	化合物	MDA-MB-231における IC_{50}	SD	MDA-MB-231における最大 K_D でのmRNAレベル	SD
243	aattttacatactctggt	243__1	AATTttacatactctgGT	0.6	0.1	38	1
244	aattttacatactctggtc	244__1	AAttttacatactctGGTC	0.3	0.1	14	1
245	ttacatactctggc aaa	245__1	TTacatactctggtCAAA	0.9	0.3	9	4
246	ctttattataacttgaatctc	246__1	CTttattataactTgaAtCTC	0.4	0.1	18	3

10

【0728】

化合物は、図7に提供されるヒト細胞株MDA-MB-231における濃度応答曲線が示すように、ヒトRTEL1 mRNAのノックダウンに対する非常に良好な有効性及び効力を示す。

【0729】

実施例2-FUBP1を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチド

20

序論

FUBP1の過剰発現及び突然変異は、長年にわたり癌に関連することが知られている。特に、ヒト肝細胞癌腫(HCC)におけるFUBP1の強い過剰発現は、腫瘍成長を支持し、患者の予後不良と相関する。

【0730】

感染肝細胞におけるHBV cccDNAは持続的な慢性感染及び再活性化に関与し、全てのウイルスサブゲノム転写物及びプレゲノムRNA(pgRNA)の鋳型であって、新たに合成されたウイルス子孫と細胞内ヌクレオカプシド再循環を介したcccDNAプール補充との両方を確実にする。

【0731】

30

国際公開第2019/193165号では、FUBP1がcccDNA安定性に関連することが示された。この知識により、HBV感染対象におけるcccDNAを不安定化する機会が生まれ、慢性感染HBV患者の完全治癒の機会が開ける。

【0732】

本研究では、ヒトFUBP1を標的とする2300個のアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングした。このスクリーニングでは、ヒトFUBP1を標的とするのに特に強力かつ有効な化合物を同定した。具体的には、ヒトFUBP1のエクソン14内の領域を標的とし、インビトロでヒトFUBP1の強い下方制御を付与する、9つの交互フラックギャップマーLNAオリゴヌクレオチドを同定した。さらに、ヒトFUBP1のエクソン20内の領域を標的とし、ヒトFUBP1の強い下方制御も付与する、1つの交互フラックギャップマーLNAオリゴヌクレオチドを同定した。同定された9つの化合物の概要を上記の表12Bに示す。

40

【0733】

同定された化合物の標的配列は、国際公開第2019/193165号に開示されているCMP番号294__1及び295__1の標的配列と重複する。これら2つの化合物は、HeLa細胞中のFUBP1を5 μ Mで約70%に阻害する。しかしながら、9つの同定された化合物は、HeLa細胞中のFUBP1を3.3 μ Mで約25%~35%まで、又は5 μ Mで約27%まで阻害するので、明らかにより有効である(CMP番号329__1)。加えて、それらは、国際公開第2019/193165号の最良の化合物であるCMP番号291__1よりも、HeLa細胞におけるFUBP1の標的化においてより効率的で

50

ある（実施例 2. 1 参照）。

【0734】

国際公開第 2019 / 193165 号の先行技術化合物 276__1、291__1、294__1、295__1、319__1 及び 320__1 の概要を以下の表 20 に提供する。化合物は、均一フラックを有するギャップマーである。CMP 番号 291__1 は P H H 細胞において最良の化合物であり、CMP 番号 276__1 は H e L a 細胞において最良の化合物であった。CMP 番号 294__1 及び 295__1 は、CMP 番号 325__1、325__2、326__1、326__2、326__3、326__4；327__1 及び 328__1 に最も近い化合物である。CMP 番号 319__1 及び 320__1 は、CMP 番号 329__1 に最も近い化合物である。

10

【表 20】

表 20：対照オリゴヌクレオチド化合物のリスト（国際公開第 2019 / 193165 号に開示されている）

配列番号	モチーフ配列	配列番号 1 における 開始位置		塩基	CMP 番号	オリゴヌクレオチド 化合物
		開始	終了			
276	CCCATAACCATAGTCAT	9142	9157	3-12-2	276__1	CCCataaccatagtcAT
291	CCATTTCTTCCTATTACAA	14783	14801	3-14-2	291__1	CCAttcttcctattacAA
294	GCTTTTTATGGTTTCACC	16183	16200	1-15-2	294__1	GcttttatggtttcaCC
295	ATGCTTTTTATGGTTTCACC	16183	16202	1-17-2	295__1	AtgcttttatggtttcaCC
319	ATATTAACCTCCTATCAGT	30511	30530	1-15-3	319__1	AtattaacctcctatcAGT
320	AATATTAACCTCCTATCAG	30512	30531	3-13-3	320__1	AATattaacctcctatCAG

20

化合物について：大文字は L N A ヌクレオシドを表し（ベーター D - オキシ L N A ヌクレオシドを使用した）、全ての L N A シトシンは 5 - メチルシトシンであり、小文字は D N A ヌクレオシドを表す。全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である

30

【0735】

実施例 2. 1 - H e L a 細胞におけるヒト F U B P 1 mRNA を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ有効性の試験。

F U B P 1 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを、E C A C C から取得したヒト H e L a 細胞（カタログ番号 93021013）における F U B P 1 mRNA 発現を減少させる能力について試験した。

【0736】

H e L a 細胞を細胞培養培地（10%ウシ胎児血清 [S i g m a、カタログ番号 F 7 5 2 4]、2mM グルタミン [S i g m a、G 7 5 1 3]、0.1mM N E A A [S i g m a、M 7 1 4 5] 及び 0.025mg / mL ゲンタマイシン [S i g m a、カタログ番号 G 1 3 9 7] を補充した E M E M [S i g m a、カタログ番号 M 2 2 7 9]）中で増殖させた。細胞は、リン酸緩衝塩類溶液（P B S）[S i g m a cat. no 14190-094] で洗浄し、次に 0.25% トリプシン - E D T A 溶液（S i g m a、T 3 9 2 4）を添加して 37℃ で 2 ~ 3 分インキュベートし、摩砕することによって、5 日毎にトリプシン処理した後、細胞播種した。

40

【0737】

実験に使用するために、ウェルあたり 2500 個の細胞を 96 ウェルプレート（N u n c カタログ番号 167008）内で 190 μ L の成長培地中で播種した。細胞を播種して最終的なカスタム濃度に達したおよそ 24 時間後に、P B S に溶解した A S O を添加した

50

。培地を交換せずに細胞を3日間インキュベートした。

【0738】

インキュベーション後、培地を除去し、続いて125 μLのRLT Lysis緩衝液 (Qiagen 79216) 及び125 μLの70%エタノールを添加することによって細胞を回収した。RNAを製造者の説明書 (Qiagen RNeasy 96キット) に従って精製し、200 μLのDNase/RNase非含有水 (Gibco) の最終容量で溶出した。

【0739】

RNAに90℃で40秒間熱ショックを与えて、RNA:LNA二重鎖を融解させ、氷に直接移動させ、使用前にスピンドウンした。一段階qPCR反応のために、qPCRミックス (qScript (商標) XLE 1ステップRT-qPCR TOUGH MIX (登録商標) Low ROX (QuantaBio製、カタログ番号95134-500)) を2つのIDTプローブ (最終濃度1X) と混合してマスターミックスを生成した。Taqmanプローブは、IDT:FUBP1:Hs.PT.58.26883775 (プライマー・プローブ比2、FAM) 又はThermoFisher Scientific:GUSB:4326320E. から入手した。次に、マスターミックス (6 μL) 及びRNA (4 μL、1~2 ng/μL) を定量的PCRプレート (MICROAMP (登録商標) 光学384ウェル、4309849) 内で混合した。播種後、プレートにRTで1分間の1000gのクイックスピンを与え、ViiATM 7システム (Applied Biosystems、Thermo) に移し、以下のPCR条件を使用した: 50℃で15分間; 95℃で3分間; 以下の40サイクル: 95℃で5秒間、続いて1.6℃/秒の温度低減、続いて60℃で45秒間。QuantStudio (商標) Real-time PCRソフトウェアを使用してデータを分析した。

【0740】

qPCRデータを捕捉し、生データの品質管理をQuantstudio 7ソフトウェアで行った。

【0741】

次いで、データをE-Workbookにインポートし、BioBookテンプレートを使用してデータを捕捉及び分析した。以下の工程を使用してデータを分析した:

1. デルタデルタCt法により量を算出 ($\text{量} = 2^{-(\Delta Ct)} * 10000000000$)

2. 同じウェルで実行するハウスキーピング遺伝子アッセイ用に計算した量に対して、量を正規化。相対標的量 = $\text{量}_{\text{標的}} / \text{量}_{\text{ハウスキーピング}}$

3. 同じプレート上の全てのPBS処理ウェルの平均で割ることにより、各ウェルについてRNAノックダウンを計算した。正規化標的量 = $(\text{相対標的量} / [\text{平均} \text{相対標的量}]_{\text{pbs ウェル}}) * 100$

4. 最終データを未処理 (PBS) ウェルのパーセンテージとして示す。

5. 濃度応答実験のために、各化合物 [希釈モデルに応じて、8又は10の濃度のいずれか] についてRNAノックダウン値 (工程3~4) から曲線をフィッティングした。曲線は、BioBookの4パラメータ・シグモイド用量応答モデルを使用してフィッティングされる。

【0742】

相対的なFUBP1 mRNA発現レベルを表21に、対照の割合として示す。すなわち、値が小さいほど、阻害は大きい。さらに、結果を図17に示す。

10

20

30

40

【表 2 1】

表 2 1 : H e l a 細胞における抗 F U B P 1 化合物のインビトロ有効性。F U B P 1 m R N A レベルを G U S B に対して正規化し、対照の % として示す。

CMP 番号	F U B P 1 残留 m R N A レベル、対照の %	
	3 . 3 μ M	5 μ M
3 2 5 _ 1	3 4	n d
3 2 5 _ 2	2 6	n d
3 2 6 _ 1	2 9	n d
3 2 6 _ 2	2 9	n d
3 2 6 _ 3	3 4	n d
3 2 6 _ 4	2 6	n d
3 2 7 _ 1	n d	1 5
3 2 8 _ 1	3 3	n d
3 2 9 _ 1	n d	2 7 . 8
3 3 7 _ 1 **	5 4	3 4
3 3 8 _ 1 **	5 9	3 2
2 9 1 _ 1 *	n d	6 2
2 9 4 _ 1 *	n d	7 0
2 9 5 _ 1 *	n d	7 8
3 1 9 _ 1 *	n d	6 8 . 4
3 2 0 _ 1 *	n d	5 1 . 4

*対照化合物、n d : 未決定

**CMP 番号 3 3 7 _ 1 は以下: A T g c t T t t t a t g g t t t C A (配列番号 3 3 7) の通りであり、CMP 番号 3 3 8 _ 1 は以下: T T A t g c t t t t t a t g g T T T (配列番号 3 3 8) の通りであり、大文字はペーター D - オキシ L N A ヌクレオシドであり、小文字は D N A ヌクレオシドであり、すべての L N A C は 5 - メチルシトシンであり、すべてのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。CMP 番号 3 3 7 は、配列番号 2 4 7 の n t 1 6 1 8 5 ~ 1 6 2 0 2 を標的とする。CMP 番号 3 3 8 は、配列番号 2 4 7 の 1 6 2 0 4 の n t 1 6 1 8 7 を標的とする。

対照化合物を用いた実験は別々に行った。

【 0 7 4 3 】

実施例 2 . 2 - 初代ヒト肝細胞 (P X B - P H H) におけるヒト F U B P 1 m R N A を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ有効性の試験。

ヒト化マウス (u P A / S C I D マウス) (本明細書では P H H と呼ばれる) から採取した新鮮な初代ヒト肝細胞 (P X B - P H H) を、 P h o e n i x B i o C o . , L t d (日本) から 9 6 ウェル形式で入手し、改変肝細胞クローン増殖培地 (d H C G M) 中で培養した。 d H C G M は、 1 0 0 U / m l のペニシリン、 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、 2 0 m M の H e p e s 、 4 4 m M の N a H C O ₃ 、 1 5 μ g / m l の L - プロリン、 0 . 2 5 μ g / m l のインスリン、 5 0 n M のデキサメタゾン、 5 n g / m l の

EGF、0.1mMのAsc-2P、2%のDMSO及び10%のFBSを含有するDMEM培地である(Ishida et al., 2015)。

【0744】

細胞を、5%CO₂を含む加湿雰囲気下において37℃で培養した。回収まで培養培地を週に2回交換した。

【0745】

非感染細胞を5μMで1回処理し、7日後に回収した。全ての処理において、細胞に、120μI/ウェルのdHCGM培地の最終容量でオリゴヌクレオチド化合物を投与した。RNA測定のための実験は、生物学的に二連で行った。

【0746】

その後、FUBP1 RNAのリアルタイムPCRを行った。製造業者のプロトコルに従って、Magna Pureロボット及びMagna Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit (Roche, 番号05467535001)を用いて全mRNAを細胞から抽出した。mRNA発現レベルを、QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems)、TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems, #4392938)、及びヒトGusB内因性対照 (Applied Biosystems, #Hs00939627_m1)を使用してqPCRによって技術的に二連で定量した。mRNA発現は、参照遺伝子GusB及び非処理細胞に対して正規化した比較サイクル閾値2-ΔΔCt法を用いて分析した。GusB RNA及びFUBP1 RNAの定量に使用されるTaqManプライマーを以下の表22に列挙する。

【表22】

表22: GusB RNA及びFUBP1 RNA定量のためのプライマー

パラメータ	供給元
FUBP1	ThermoFisherアッセイID: Hs00900762_m1
GusB	ThermoFisherアッセイID: <u>Hs00939627_m1</u>

【0747】

PXB-PHH細胞における8つの化合物の相対的なFUBP1 mRNA発現レベル(CMP番号: 325__1、325__2、326__1、326__2、326__3、326__4; 327__1及び328__1. CMP番号319__1及び320__1)を対照の%として表23に示す。すなわち、値が低いほど阻害は大きくなる。PXB-PHH細胞におけるCMP番号329__1)のFUBP1 mRNA発現レベルを実施例2.3で分析する。

【表 2 3】

表 2 3 : P X B - P H H 細胞における抗 F U B P 1 化合物のインビトロ有効性。F U B P 1 mRNA レベルを G U S B に対して正規化し、対照の % として示す。

配列番号	CMP 番号	Rel. mRNA レベル P X B - P H H (25 μ M)	SD	Rel. mRNA P X B - P H H (5 μ M)	SD
3 2 5	3 2 5 _ 1	3 7	3	4 6	4
3 2 5	3 2 5 _ 2	3 3	4	4 5	4
3 2 6	3 2 6 _ 1	3 1	1	5 2	1 5
3 2 6	3 2 6 _ 2	2 1	1	4 3	2
3 2 6	3 2 6 _ 3	3 3	1	4 9	5
3 2 6	3 2 6 _ 4	2 6	0	4 1	0
3 2 7	3 2 7 _ 1	3 3	1	5 9	5
3 2 8	3 2 8 _ 1	2 2	2	6 0	3 8

実施例 2 . 1 及び 2 . 2 から導き出される結論

実施例 2 . 1 及び 2 . 2 のデータは、表 1 2 B に示すように L N A A S O で F U B P 1 を標的化することが、F U B P 1 の効率的な減少につながることを示している。

【0 7 4 8】

実施例 2 . 3 - C M P 番号 3 2 6 _ 1 及び 3 2 9 _ 1 のさらなる分析。

以下では、9 つの同定された化合物のうちの 2 つを用いた追加の実験を記載する。C M P 番号 3 2 6 _ 1 及び 3 2 9 _ 1 . これらの実験では、2 つの化合物を、国際公開第 2 0 1 9 / 1 9 3 1 6 5 号において最良の結果を与えた 2 つの先行化合物と比較した

【0 7 4 9】

材料及び方法

初代ヒト肝細胞 (P X B - P H H)

ヒト化マウス (u P A / S C I D マウス) (本明細書では P H H と呼ばれる) から採取した新鮮な初代ヒト肝細胞 (P X B - P H H) を、P h o e n i x B i o C o . , L t d (日本) から 2 4 ウェル形式で入手し、改変肝細胞クローン増殖培地 (d H C G M) 中で培養した。d H C G M は、1 0 0 U / m l のペニシリン、1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、2 0 m M の H e p e s 、4 4 m M の N a H C O ₃、1 5 μ g / m l の L - プロリン、0 . 2 5 μ g / m l のインスリン、5 0 n M のデキサメタゾン、5 n g / m l の E G F、0 . 1 m M の A s c - 2 P、2 % の D M S O 及び 1 0 % の F B S を含有する D M E M 培地である (I s h i d a e t a l . , 2 0 1 5) 。

【0 7 5 0】

細胞を、5 % C O ₂ を含む加湿雰囲気下において 3 7 $^{\circ}$ C で培養した。回収まで培養培地を週に 2 回交換した。

【0 7 5 1】

A S O 配列及び化合物

表 2 4 は、実施例 2 . 3 で試験した化合物の概要を提供する。

【表 2 4】

表 2 4 : A S O が標的とするヒト F U B P 1 配列

説明	配列	CMP 番号
本発明の化合物	5' -CTTATGCTTTTATGGTT-3' (配列番号 3 2 6)	3 2 6__3 *
対照化合物 (H e L a 細胞における 最良の従来技術の化合物)	5' -CCCATAACCATAGTCAT-3' (配列番号 2 7 6)	2 7 6__1 **
本発明の化合物	5' -ACCAATTTTCATTTCTAC-3' (配列番号 3 2 9)	3 2 9__1 *
対照化合物 (P H H 細胞における 最良の従来技術の化合物)	5' -CCATTCTTCCTATTACAA-3' (配列番号 2 9 1)	2 9 1__1 **

*表 1 2 B を参照のこと、本発明による化合物

**表 2 0 を参照のこと：国際公開第 2 0 1 9 / 1 9 3 1 6 5 号に開示されている対照化合物

【 0 7 5 2 】

H B V 感染及びオリゴヌクレオチド処置

到着したら、P H H 培地中の 4 % (v / v) P E G 中で P H H 細胞を H B V と共に 1 6 時間インキュベートすることによって、慢性患者由来の精製接種物（遺伝子型 C）を使用して P H H に M O I 1 1 0 を感染させた。次いで、細胞を P B S で 3 回洗浄し、新鮮な P H H 培地中で 5 % C O ₂ の加湿雰囲気中で培養した。感染の 4 日後、細胞を、1 0 μ M の最終濃度の F U B P 1 L N A（表 2 4 参照）で二連で、又は薬物なし対照（N D C）として P B S で処理した。処理の当日に、古い培地を細胞から除去し、4 0 0 μ l / ウェルの新鮮な P H H 培地と交換した。ウェル毎に、1 0 0 μ L の 5 0 μ M の各 F U B P 1 L N A 又は N D C としての P B S を 4 0 0 μ L の P H H 培地に添加した。感染後 4、1 1 及び 1 8 日目に同じ処置を 3 回繰り返した。細胞培養培地を、感染後 7、1 4 及び 2 1 日目に、3 日毎に新鮮培地と交換した。

【 0 7 5 3 】

細胞内 H B V p g R N A 及び F U B P 1 m R N A のリアルタイム P C R

細胞生存率の決定後、細胞を P B S で 1 回洗浄した。製造業者のプロトコルに従って、M a g N A P u r e ロボット及び M a g N A P u r e 9 6 C e l l u l a r R N A L a r g e V o l u m e K i t (R o c h e , 番号 0 5 4 6 7 5 3 5 0 0 1) を用いて全 R N A を細胞から抽出した。F U B P 1 m R N A 及びウイルス p g R N A 発現レベルを、Q u a n t S t u d i o 1 2 K F l e x (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 、T a q M a n R N A - t o - C T 1 ステップキット (A p p l i e d B i o s y s t e m s 、 # 4 3 9 2 9 3 8) 、及びヒト G u s B 内因性対照 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 、 # H s 0 0 9 3 9 6 2 7 _ m 1) を使用して q P C R によって技術的に二連で定量した。参照遺伝子 G u s B 及び非処理細胞に対して正規化された比較サイクル閾値 2 - Δ Δ C t 法を使用して、F U B P 1 m R N A 及びウイルス p g R N A の相対発現を分析した。G u s B R N A 、F U B P 1 R N A 及び H B V p g R N A の定量に使用した T a q M a n プライマーを表 2 5 に列挙する。

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 5 : G u s B 遺伝子、F U B P 1 RNA 及び H B V pgRNA の定量に使用した T a q M a n プライマー

パラメータ	供給元
F U B P 1	T h e r m o F i s h e r - アッセイ ID : H s 0 0 9 0 0 7 6 2 _ m 1
H B V pgRNA	カスタム : A I L J K X 5
G u s B	T h e r m o F i s h e r - アッセイ ID : H s 0 0 9 3 9 6 2 7 _ m 1

10

【0 7 5 4】

結果

結果を、表 2 6 及び図 1 8 に示す。表 2 6 及び図 1 8 から導き出すことができるように、本発明の両方の化合物 (C M P 番号 3 2 6 _ 3 及び 3 2 9 _ 1) は、N D C と比較して標的 mRNA 発現を約 8 0 % 減少させる。F U B P 1 mRNA レベルに対するそれらの効果は、先行技術の化合物の効果よりもはるかに強い。

【表 2 6】

表 2 6 : P X B - P H H 細胞における抗 F U B P 1 化合物のインビトロ有効性。F U B P 1 mRNA レベルを G U S B に対して正規化し、対照の % として示す。

20

		H e L a における最良の ネイキッド先行技術				P H H における最良の ネイキッド先行技術	
C M P 番号 3 2 6 _ 3		C M P 番号 2 7 6 _ 1		C M P 番号 3 2 9 _ 1		C M P 番号 2 9 1 _ 1	
N D C (=1) に対する 残存発現	S D	N D C (=1) に対する 残存発現	S D	N D C (=1) に対する 残存発現	S D	N D C (=1) に対する 残存発現	S D
0, 2 3	0, 0 4	0, 4 6	0, 0 5	0, 2 2	0, 0 0	0, 3 8	0, 0 3

【0 7 5 5】

実施例 3 - R T E L 1 を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチド-インビボ

材料及び方法

動物

ヒト化肝臓を有するキメラマウス (P X B マウス) を、ヒト肝細胞を注射したウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子 c D N A / 重症複合免疫不全マウスから作製した。(T a t e n o C, K a w a s e Y, T o b i t a Y, e t a l. G e n e r a t i o n o f n o v e l c h i m e - r i c m i c e w i t h h u m a n i z e d l i v e r s b y u s i n g h e m i z y g o u s c D N A - u P A / S C I D m i c e . P L o S O n e . 2 0 1 5 ; 1 0 : e 0 1 4 2 1 4 5 .)

【0 7 5 6】

候補動物は、体重、全体的な健康状態、血清 h - A l b 及び H B V DNA 濃度に基づいて試験に割り当てられた。初期体重の 2 0 % を超える体重減少、瀕死、研究中の死亡又は自発的腫瘍形成などの予想外の異常を有するマウスをそれぞれの群から取り出した。

30

40

50

【表 2 7】

表 2 7 : 動物群及び化合物投与

群	株	マウス 数	試験化合物 (配列番号)	用量				
				レベル (mg / kg)	濃度 (mg / kg)	体積 (ml / kg)	経路	頻度
1	PXB (HBV C感染)	5	ビヒクル	0	0	10	s. c.	QD、8回、 0、7、14、 21、28、 35、42、 49日目
2	PXB (HBV C感染)	5	330__1	10	1			
3	PXB (HBV C感染)	5	246__2	10	1			
4	PXB (HBV C感染)	5	330__1	10	1			
			246__2	10	1			

10

【0757】

化合物を、永久的に取り付けられた針 (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を有する使い捨て 1.0 mL シリンジを使用して、0、7、14、21、28、35、42、49 日目に上背部の頸部皮下組織に注射することによって投与した。

20

【0758】

採血及び血清分離

各時点で Intramedic (商標) Polyethylene Tubing (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を使用して後眼窩神経叢／洞を介してイソフルラン (ISOFLURANE 吸入溶液 [Pfizer], Mylan, Osaka, Japan) 麻酔下で対象動物から 75 マイクロリットル (75 μ L) の血液を採取した。終了時点で、動物をイソフルラン麻酔で麻酔し、心臓を介して各動物から血液を採取し、その後、動物を心臓穿刺及び放血によって殺した。血液試料を室温で 5 分間インキュベートして凝固させ、13200 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心分離して血清を得る。血清試料を -80 $^{\circ}$ C で保存する。

30

【0759】

組織試料の調製

殺時に、全ての動物の肝臓全体を採取し、小片に切断し、液体窒素で急速凍結する。

【0760】

血清 HBV DNA 定量

HBV 感染 PXB マウスからの血清をデジタル PCR によって定量し、適切な量の血清中 HBV DNA 用 HBV 前処理溶液 (KUBIX HBV qPCR キット、KUBIX Inc., Hakusan, Japan) で希釈して標的希釈系列を作成することによって HBV 標準として使用した。

40

【0761】

分析する試料を、適切な量の血清中 HBV DNA 用 HBV 前処理溶液と混合し、98 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、次いで qPCR によって分析した。リアルタイム qPCR は、KUBIX HBV qPCR キット (KUBIX Inc.) 及び CFX96 Touch (商標) リアルタイム PCR 検出システム (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を使用して行った。20 マイクロリットル (20 μ L) の HBV 2 $\times$ PCR 溶液を 20 μ L の加熱試料に添加した。初期活性化を 95 $^{\circ}$ C で 2 分間行った。その後の PCR 増幅は、CFX96 Touch (商標) リアル

50

タイムPCR検出システムにおいて、サイクルあたり、95℃で5秒間の変性、並びに54℃で30秒間のアニーリング及び伸長の45サイクルからなった。平均血清HBVDNAレベルを、2つの技術的反復実験から計算した。

【0762】

血清B型肝炎表面抗原(HBsAg)及びB型肝炎e抗原(HBeAg)の定量

血清HBsAg及びHBeAg濃度は、Fujirebioによって開発された化学発光酵素免疫アッセイ(CLEIA)(LUMIPULSE HBsAg-HQ, LUMIPULSE (登録商標) PrestoII及びLUMIPULSE HBeAg, LUMIPULSE (登録商標) PrestoII)を使用して、SRL, Inc. (Tokyo, Japan)によって決定した。

【0763】

肝臓組織からの全DNA抽出

マウス肝臓を、1mlの全DNA抽出緩衝液(50mMトリスpH8、5mM EDTA、150mM NaCl、1% SDS)中、室温、6000rpmで20秒間ホモジナイズした。各試料に2.5ul RNaseカクテル(Invitrogen、#AM2286)を添加し、混合し、室温で30分間インキュベートした。タンパク質消化を、1ul(20ug)のプロテイナーゼK(Ambion、#AM2546、20mg/ml)を用いて56℃で300rpmにて2時間行った。試料を13,000gで3分間遠心分離し、上清を新しい管に移した。DNAを、1mlの試薬を添加し、混合し、4℃で15分間フルスピードでスピンド、水溶液を新しい管に移すことによって、UltraPure Buffer-Saturated Phenol(Life Technologies、#15513-039)で2~3回、及びUltraPure Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol(25:24:1)(Life Technologies、#15593-031)で1回抽出した。次いで、DNAを1mlの100% EtOH及び40ulの3M NaAc(SigmaAldrich、#S7899)を用いて-20℃で一晩沈殿させる。DNAを最高速度4℃で15分間ペレット化し、70% EtOH 1mlで洗浄し、完全に風乾した。再懸濁は、50ulの10mM Tris-HCl、pH8中であつた。DNAをNanoDropによって定量し、1.5ug/ul DNAに調整し、サザンプロット及びqPCRによって分析した。

【0764】

サザンプロット

DNAを1%アガロースゲルにロードし、ゲル電気泳動によって50Vで3.5時間分離した。サイズマーカーとして、DIG標識DNA分子量マーカーVII(Sigma、#11669940910)を使用した。ゲルを新たに調製した500mLの0.2M HCl中で10分間インキュベートした。DNA変性を変性緩衝液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)で30分間行った。次いで、ゲルを500mLの中和緩衝液(0.5M Tris-HCl pH7.5、1.5M NaCl)で中和し、最後に500mLのUltraPure 20X SSC緩衝液(Life Technologies、#15557-036)中でそれぞれ30分間インキュベートした。

【0765】

DNAを、20XSSC緩衝液中のキャピラリー転写によってHybond-XL膜(GE Healthcare、#RPN2020S)に一晩転写した。次いで、DNAを膜に1800x1000uJ/cm²で1回UV架橋し、乾燥させた。20mLのDIG Easy Hyb緩衝液(Roche、#11603558001)中、37℃で1時間プレハイブリダイゼーション後、HBV特異的DIG標識DNAプローブを100℃で5分間変性させ、8mlの新鮮なDIG Easy Hyb緩衝液中、37℃で一晩メンブレン上でインキュベートする。フォワードプライマー(5-GTTTTTTCACCTCTGCCTAATCATC-3; 配列番号339)及びリバースプライマー(5-GCAA AAAGTTGCATGGTGCTGGT-3; 配列番号340)を有するDIG PC

Rプローブキット (Sigma # 11636090910) 並びに鋳型としてのHBV GtC含有プラスミドを使用して、DIG標識HBV DNAプローブを調製した。qPCRを95℃で5分間、続いて95℃15秒間、58℃30秒間、68℃3分間及び15秒間を40サイクル行い、続いて68℃で5分間を行い、12℃で保持した。

【0766】

過剰なプローブを50mLのSSC洗浄緩衝液I (2xSSC、0.1% SDS) で5分間に2回、次いで50mLのSSC洗浄緩衝液II (0.5xSSC、0.1% SDS) で65℃で15分間2回洗浄する。

【0767】

次に、指示書に従ってDIG Wash and Block Buffer Set (Roche、#11585762001) を使用してDIG検出を行う。抗DIG抗体を40mLで1:20,000希釈し、膜上で60分間インキュベートし、その後、100mL洗浄緩衝液中で15分間2回洗浄し、50mL検出緩衝液中で5分間インキュベートする。

【0768】

発光検出のために、NitroBlockを有する2~3mLのCDP-Starを使用し、画像をFusion Fx (VILBER) で取り込み、バンドをImageStudio liteソフトウェアで定量化する。

【0769】

qPCRによる肝内HBVDNAの定量

cccDNA及び総HBV DNAレベルを、qPCRによって、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, #4444557) を用いて、プライマーHBB (ThermoFischer, #Hs00758889_s1, VIC)、総HBV (ThermoFischer, #Pa03453406_s1 P, S/P, FAM) 及びcccDNAプライマー (フォワード: CCGTGTCACCTTCGCTTCA、配列番号341; リバース: GCACAGCTTGAGGCTTGA、配列番号342; プローブ: FAM-CATGGA GACCAACCGTGAACGCC-5NFQ、配列番号343) を用いて決定した。qPCRを、急速加熱ブロック (95℃で20秒間、次いで95℃1秒間及び60℃20秒間を40サイクル、10ul反応容量) の標準設定を有するQuantStudio 12K Flex Cyclerで実行した。HBB CT値を使用して、cccDNA及び総HBV DNA CTを正規化し、 2^{-ddCT} 法を使用してddCT及び倍数変化を計算した。

【0770】

肝臓組織からのRNA抽出

組織切片を溶解し、2mLのMagna Lyser Green Beads (Roche, #03358941001) を用いて1400ulのMagnaPure LC RNA Isolation Tissue緩衝液 (Roche, #03604721001) 中でホモジナイズし、6000rpmで20秒間ホモジナイズし、RTで30分間インキュベートした。ホモジネートを13000rpmで3分間遠心分離した。キットCellular RNA Large Volume Kit (Roche, #05467535001) を使用してRNAをMagna Pure 96 (Roche) によって上清から抽出し、使用されるプロトコルは「RNA Tissue FF Standard LV 3.1」であり、溶出は50ulで行う。

【0771】

RNA濃度を、SuperScript (商標) III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, #11752250) を製造者のプロトコルに従って20ulの体積で使用して、NanoDrop及びcDNAに転写された1ugのRNAによって測定した。40ul H2Oを添加することによってcDNAを水で1:3希釈し、ウェルあたり10ulの総

10

20

30

40

50

体積でTaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems、#4444557)を使用してqPCRによって分析する。使用されるTaqmanプライマーアッセイは、pgRNA (プローブ配列GAGGCAGGTCCCCCTAGAAAGA; 配列番号344-FAM標識、fwd__配列GGAGTGTGGATTTCGCACTCCT, 配列番号345; rev__配列AGATTGAGATCTTCTGCGAC, 配列番号346)、FUBP1 (ThermoFischer, #Hs0090076__m1, FAM)、GUSB (ThermoFischer, #Hs00939627__m1, VIC)、RTEL1 (ThermoFischer, #Hs02568623__s1, FAM)、総HBV (ThermoFischer, #Pa03453406__s1 P, S/P, FAM)である。qPCRを、急速加熱ブロック (95℃で20秒間、次いで95℃1秒間及び60℃20秒間を40サイクル、10ul反応容量)の標準設定を有するQuantStudio Cyclerで実行した。GUSB CT値を使用して、標的CTを正規化し、ddCT及び倍数変化を計算した。【0772】

結果

肝内HBV DNAレベルをサザンブロッティングによって評価し、qPCRによって半定量した。

【0773】

サザンブロッティングは、FUBP1及びRTEL1 LNA単剤処置アームにおけるcccDNA及び総HBV DNAの減少を明らかにし、これは、FUBP1+RTEL1組み合わせアームにおいてさらに増強される (図19を参照)。

【表28】

表28: サザンロットバンド相対バンド強度 (図19)。

マウス群	シグナル (%)	平均	SEM	N
ビヒクル	>100	100	2.93	3
	94.15			
	>100			
	103.21			
	102.64			
FUBP1	60.73	52.88	11.07	4
	76.73			
	24.03			
	50.03			
RTEL1	47.41	71.85	12.22	3
	83.51			
	84.62			
FUBP1+RTEL1	27.35	36.63	8.35	5
	22.93			
	33.52			
	69.30			
	30.07			

【0774】

qPCRでは、単一化合物投与は、FUBP1 LNAではおよそ32%、RTEL1

LNAでは41%のcccDNA減少を示した(図20及び表29)。FUBP1とRTEL1 LNAの二重の組み合わせは、さらにより高い有効性を示し、73%の減少を示した。総HBV DNAレベルも、FUBP1 LNAで51%有意に減少したが、RTEL1 LNAは総HBV DNAレベルに影響を及ぼさなかった。一方、FUBP1とRTEL1 LNAの組み合わせは、68%の低減をもたらす。

【表29】

表29：qPCRによる肝内cccDNA及び総DNAレベルの半定量化(図19参照)。

	ビヒクル			FUBP1			RTEL1			FUBP1+RTEL1		
	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N
cccDNA	1,015	0,087	5	0,681	0,145	4	0,588	0,023	3	0,273	0,043	5
HBV DNA	1,002	0,029	5	0,494	0,162	4	0,973	0,078	3	0,329	0,067	5

【0775】

ベースライン補正血清HBV DNAレベルは、単剤及び二重組み合わせアームの両方で処置全体を通してHBV DNAの漸進的な低下を示した(図21並びに表30及び31)。単剤処置アームは、FUBP1 LNAでは $0.46 + / - 0.23$ の対数降下に達し、RTEL1 LNAでは $0.24 + / - 0.31$ の対数降下には達したが、二重組み合わせは、HBV DNAをビヒクル対照よりも $0.84 + / - 0.27 \log$ 低く減少させた。

【0776】

同様にベースライン補正血清HBsAgレベルは、単剤及び二重組み合わせアームの両方で処置全体を通して漸進的な低下を示した(図22並びに表32及び33)。単剤処置アームは、FUBP1 LNAでは $0.35 + / - 0.18$ の対数降下には達し、RTEL1 LNAでは $0.31 + / - 0.10$ の対数降下には達したが、二重組み合わせは、HBV DNAをビヒクル対照よりも $0.61 + / - 0.07 \log$ 低く減少させた。

【0777】

ベースライン補正血清HBeAgレベルの場合、低下はより微妙であるが、単一化合物及び二重組み合わせアームによる処置による連続減少(図23並びに表34及び35)を検出することができる。単剤処置アームは、FUBP1 LNAでは $0.16 + / - 0.03$ の対数降下には達し、RTEL1 LNAでは $0.12 + / - 0.18$ の対数降下には達したが、二重組み合わせは、HBV DNAをビヒクル対照よりも $0.26 + / - 0.15 \log$ 低く減少させた。

10

20

30

40

50

【表 3 0】

表 3 0 : 血清HBV DNA動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		RTEL1 10mg/kg		FUBP1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0.000	0.120	0.000	0.283	0.000	0.114	0.000	0.183
7	0.121	0.124	0.115	0.278	0.054	0.130	-0.042	0.167
14	0.004	0.167	-0.170	0.307	-0.062	0.136	-0.234	0.188
21	0.191	0.141	-0.146	0.260	-0.210	0.137	-0.421	0.191
28	-0.018	0.147	-0.361	0.263	-0.354	0.165	-0.794	0.176
35	0.077	0.136	-0.254	0.238	-0.399	0.163	-0.863	0.177
42	0.084	0.137	-0.251	0.257	-0.392	0.155	-0.801	0.168
49	-0.103	0.134	-0.556	0.242	-0.600	0.161	-1.122	0.147
56	-0.303	0.201	-0.540	0.241	-0.763	0.117	-1.141	0.174

10

【表 3 1】

表 3 1 : ビヒクル対照群に対して正規化された血清HBV DNA動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		RTEL1 10mg/kg		FUBP1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0.000	0.169	0.000	0.307	0.000	0.166	0.000	0.219
7	0.000	0.175	-0.006	0.304	-0.067	0.180	-0.163	0.208
14	0.000	0.236	-0.174	0.350	-0.066	0.215	-0.238	0.252
21	0.000	0.200	-0.338	0.296	-0.402	0.197	-0.613	0.238
28	0.000	0.208	-0.343	0.301	-0.337	0.221	-0.777	0.229
35	0.000	0.192	-0.331	0.274	-0.475	0.212	-0.940	0.223
42	0.000	0.194	-0.335	0.291	-0.476	0.207	-0.885	0.216
49	0.000	0.189	-0.452	0.276	-0.497	0.209	-1.018	0.199
56	0.000	0.284	-0.237	0.314	-0.460	0.233	-0.838	0.266

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 2 : 血清HBsAg動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		RTEL1 10mg/kg		FUBP1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0.000	0.124	0.000	0.059	0.000	0.204	0.000	0.086
7	-0.064	0.118	-0.018	0.057	-0.052	0.189	-0.084	0.080
14	-0.016	0.137	-0.007	0.068	-0.085	0.200	-0.116	0.086
21	-0.073	0.145	-0.128	0.083	-0.199	0.188	-0.255	0.093
28	-0.066	0.135	-0.118	0.092	-0.220	0.204	-0.359	0.094
35	-0.083	0.138	-0.166	0.090	-0.244	0.187	-0.428	0.085
42	-0.091	0.131	-0.187	0.086	-0.254	0.165	-0.458	0.083
49	-0.146	0.138	-0.259	0.088	-0.317	0.164	-0.550	0.067
56	-0.117	0.148	-0.308	0.100	-0.346	0.177	-0.608	0.069

10

【表 3 3】

表 3 3 : ビヒクル対照群に対して正規化された血清HBsAg動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		RTEL1 10mg/kg		FUBP1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0.000	0.175	0.000	0.137	0.000	0.239	0.000	0.151
7	0.000	0.167	0.046	0.131	0.012	0.223	-0.021	0.143
14	0.000	0.194	0.009	0.153	-0.069	0.242	-0.100	0.162
21	0.000	0.204	-0.055	0.167	-0.126	0.238	-0.182	0.172
28	0.000	0.191	-0.052	0.163	-0.154	0.244	-0.292	0.164
35	0.000	0.195	-0.083	0.164	-0.161	0.233	-0.345	0.162
42	0.000	0.185	-0.096	0.157	-0.163	0.211	-0.368	0.155
49	0.000	0.195	-0.113	0.164	-0.171	0.214	-0.404	0.153
56	0.000	0.210	-0.192	0.179	-0.229	0.231	-0.491	0.163

20

30

40

50

【表 3 4】

表 3 4 : 血清HB e A g 動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		FUBP1 10mg/kg		RTEL1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0	0.097277	0	0.076883	0	0.170624	0	0.081801
7	-0.05643	0.100342	0.021962	0.062111	-0.08878	0.177554	-0.03	0.081588
14	-0.00677	0.10343	0.067472	0.078954	-0.07326	0.155543	-0.02	0.084903
21	-0.01767	0.102722	0.05285	0.082236	-0.06093	0.153053	-0.09	0.083717
28	0.018471	0.109088	0.021087	0.084894	-0.11016	0.161684	-0.12	0.083923
35	-0.05957	0.101027	-0.04855	0.083032	-0.23351	0.136016	-0.25	0.090098
42	-0.04271	0.106042	-0.09115	0.089527	-0.13864	0.134806	-0.22	0.076051
49	-0.14716	0.106203	-0.15171	0.098287	-0.26485	0.143994	-0.38	0.093478
56	-0.1525	0.115082	-0.17789	0.111281	-0.27138	0.141619	-0.41	0.088166

10

【表 3 5】

表 3 5 : ビヒクル対照群に対して正規化された血清HB s A g 動態 (ベースライン補正)

日数	ビヒクル		FUBP1 10mg/kg		RTEL1 10mg/kg		FUBP1+RTEL1, 10mg/kg	
	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM	平均	SEM
0	0.000	0.138	0.000	0.124	0.000	0.196	0.000	0.127
7	0.000	0.142	0.078	0.118	-0.032	0.204	0.022	0.129
14	0.000	0.146	0.074	0.130	-0.066	0.187	-0.014	0.134
21	0.000	0.145	0.071	0.132	-0.043	0.184	-0.076	0.133
28	0.000	0.154	0.003	0.138	-0.129	0.195	-0.141	0.138
35	0.000	0.143	0.011	0.131	-0.174	0.169	-0.193	0.135
42	0.000	0.150	-0.048	0.139	-0.096	0.172	-0.173	0.130
49	0.000	0.150	-0.005	0.145	-0.118	0.179	-0.232	0.141
56	0.000	0.163	-0.025	0.160	-0.119	0.182	-0.256	0.145

20

30

【0778】

エンドポイント 殺時に、肝内標的結合及びmRNAレベルでのLNAの抗ウイルス有効性をRT-qPCRによって評価した(図24及び表36)。使用されるFUBP1 LNA及びRTEL1 LNAは、肝臓mRNA試料における良好な標的結合であるはずである。FUBP1 LNAは、単一処置アームでは88%、二重処置アームでは80%、FUBP1 mRNAを減少させた。RTEL1 LNAはわずかに効力が弱く、RTEL1 mRNAは単一アームで69%、組み合わせアームで73%減少した。総HBV mRNAレベルは、3つの処置条件全てで減少した。ここで、最も強い効果は、FUBP1+RTEL1 LNAの組み合わせ(59%の減少)、続いてFUBP1単独(48%の減少)、次いでRTEL1単独処置(19%の減少)で見られた。pgRNAレベルはさらにより減少し、3つの処置条件について同じ傾向に従うようであった。ここで、最も強い影響は、FUBP1+RTEL1 LNAの組み合わせ(72%の減少)、続いてFUBP1単独(62%の減少)、次いでRTEL1単剤処置(29%の減少)で観察される。

40

【0779】

50

【表 3 6】

表 3 6 : RTEL1 及び FUBP1 LNA 分子の肝内標的結合及び有効性

	FUBP1 mRNA			RTEL1 mRNA			総HBV mRNA			pgRNA		
	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N	平均	SEM	N
ビヒクル	1, 015	0, 060	5	1, 012	0, 049	5	1, 028	0, 060	5	1, 040	0, 106	5
FUBP1 LNA	0, 123	0, 020	4	0, 765	0, 051	4	0, 515	0, 073	4	0, 380	0, 063	4
RTEL1 LNA	0, 720	0, 033	3	0, 314	0, 020	3	0, 810	0, 183	3	0, 705	0, 149	3
Combo LNA	0, 203	0, 018	5	0, 268	0, 015	5	0, 409	0, 020	5	0, 280	0, 032	5

10

実施例 4 - PHH における組み合わせ化合物のインビトロ試験

実施例 2. 1 - 初代ヒト肝細胞 (PHH)

ヒト化マウス (uPA / SCID マウス) (本明細書では PHH と呼ばれる) から採取した新鮮な初代ヒト肝細胞 (PHH) を、Phoenix Bio Co., Ltd (日本) から 96 ウェル形式で入手し、改変肝細胞クローン増殖培地 (dHCGM) 中で培養した。dHCGM は、100 U / ml のペニシリン、100 µg / ml のストレプトマイシン、20 mM の Hepes、44 mM の NaHCO₃、15 µg / ml の L-プロリン、0.25 µg / ml のインスリン、50 nM のデキサメタゾン、5 ng / ml の EGF、0.1 mM の Asc-2P、2% の DMSO 及び 10% の FBS を含有する DMEM 培地である (Ishida et al., 2015)。細胞を、5% CO₂ を含む加湿雰囲気下において 37 °C で培養した。

20

【0780】

4% PEG の存在下で 16 ~ 20 時間、HepG2.2.15 細胞培養物由来の HBV GtD に PHH を感染させた。翌日、ウイルス接種材料を除去し、細胞を PBS で 3 回洗浄した後、新鮮な培地を添加した。LNA 処置は、HBV 感染後 4 日目に、ウェルあたり 120 µl の総体積で 1 : 3 希釈系列で三連で開始した。開始濃度を表 37 に示す。11 日目及び 18 日目に同じ処置を繰り返した。21 日目に、上清を回収し、HBsAg、HBeAg 及び分泌された HBV DNA のさらなる分析のために -80 °C で保存した。細胞を 150 µl / ウェルを使用して 1 × DPBS (Gibco、#14190250) で 1 回洗浄した。RNA 読み出しのために、200 µl / ウェルの MagNA Pure 96 External Lysis Buffer (Roche、#06374913001) を添加し、プレートを -80 °C で凍結した。

30

40

50

【表 3 7】

表 3 7：試験された LNA の開始濃度

CMP 番号	コンジュゲーション	標的	開始濃度
3 3 5 _ 1	ネイキッド	スクランブル	3 0 μ M
3 3 0 _ 1	ネイキッド	FUBP 1	3 0 μ M
2 4 6 _ 2	ネイキッド	RTEL 1	3 0 μ M
3 3 1 _ 2	ネイキッド	FUBP 1 + RTEL 1	1 5 μ M
3 3 1 _ 1	ネイキッド	FUBP 1 + RTEL 1	1 5 μ M
3 3 2 _ 1	ネイキッド	RTEL 1 + FUBP 1	1 5 μ M
3 3 0 _ 1 + 2 4 6 _ 2	ネイキッド	FUBP 1 + RTEL 1	各 1 5 μ M
3 3 2 _ 2	ネイキッド	RTEL 1 + FUBP 1	1 5 μ M
3 3 5 _ 1	GalNAc	スクランブル	1 0 μ M
3 2 6 _ 3	GalNAc	FUBP 1	1 0 μ M
2 4 5 _ 1	GalNAc	RTEL 1	1 0 μ M
3 3 3 _ 1	GalNAc	FUBP 1 + RTEL 1	5 μ M
3 3 4 _ 1	GalNAc	RTEL 1 + FUBP 1	5 μ M
3 2 6 _ 3 + 2 4 5 _ 1	GalNAc	FUBP 1 + RTEL 1	5 μ M

【0 7 8 1】

実施例 2 . 2 - 代謝安定性アッセイ

処理した PHH 細胞の生存率を、Cell Counting Kit-8 (CK8) を製造者の説明書に従って使用して、感染後 21 日目に決定した。CCK8 試薬を 1 : 10 の比で分化培地に添加することにより、CCK8 混合物を調製した。したがって、細胞上清を除去し、-80℃で保存し、100 μ L の CCK8 混合物を各ウェルに添加し、37℃で 1 時間インキュベートした。Envisionリーダー (Perkin Elmer) を使用して 450 nm での吸光度を測定した。

【0 7 8 2】

実施例 2 . 3 - RNA 抽出及び RT-qPCR

総 RNA を、MAGNA Pure ロボット及び MAGNA Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit (Roche、#05467535001) を使用して、製造者のプロトコルに従って最終溶出体積 50 μ L で「Cellular RNA LV」プロトコルを使用する、細胞から抽出した。

【0 7 8 3】

RTEL1 及び FUBP1 mRNA、pgRNA 及び肝内 DNA 発現レベルを、QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems)、TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems、#4392938)、及びヒト GusB 内因性対照を使用して qPCR によって技術的に二連で定量した。qPCR は、QuantStudio Cycler で、48℃で 15 分間、次いで 95℃で 10 分間、次いで 95℃で 15 秒間及び 60℃で 1 分

間を40サイクル、全反応体積10 μ lで行った。mRNA発現は、参照遺伝子GusB及びHBV感染、非処理細胞に対して正規化した比較サイクル閾値2- $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて分析した。GusB mRNA、RTEL1 mRNA、FUBP1 mRNA、総肝内HBV DNA及びpgRNAの定量に使用したTaqManプライマーを表38に列挙する。

【表38】

表38：GusB mRNA、RTEL1 mRNA、FUBP1 mRNA、総肝内HBV DNA及びpgRNAの定量のためのプライマー

標的	供給元
FUBP1	ThermoFisher-アッセイID:Hs0090076_m1; FAM
RTEL1	ThermoFisher-アッセイID:Hs02568623_s1; FAM
総HBV DNA	ThermoFisher-アッセイID:Pa03453406_s1 P, S/P; FAM
pgRNA	ThermoFisher-カスタムアッセイ: プローブFAM GAGGCAGGTCCCCTAGAAGA (配列番号344) フォワードGGAGTGTGGATTTCGCACTCCT (配列番号345) リバーサAGATTGAGATCTTCTGCGAC (配列番号346)
GusB	ThermoFisher-アッセイID:Hs00939627_m1

【0784】

実施例2.4-分泌されたHBV DNAを定量するための上清DNA抽出及びqPCR
最終溶出体積50 μ lで「Viral NA Plasma ext lys SV
4.0」プロトコルを使用して、製造業者のプロトコルに従って、Magna Pure
96 DNA及びViral NA Small Volume Kit (Roche、
#06543588001)を用いて、Magna Pureロボット上の40 μ lの上
清からDNAを抽出した。

【0785】

HBV DNAを定量するために、コア領域を覆う99ヌクレオチド断片を、TaqMan Gene Expression Master Mix及び以下のサイクリング
条件を使用して、フォワードプライマーCTG TGC CTT GGG TGG CT
T T (最終濃度200nM)、リバーサプライマーAAG GAA AGA AGT
CAG AAG GCA AAA (最終濃度200nM)、及びプローブ56-FAM-
AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC GAT G
TC CAT G-3IABkFQ (最終濃度100nM) (IDT DNA)で増幅し
た:50 $^{\circ}$ Cで2分、95 $^{\circ}$ Cで10分、並びに95 $^{\circ}$ C15秒及び60 $^{\circ}$ C1分を40サイクル
。QuantStudio 12K Flex Real Time PCRシステム (Life Technologies)を使用して、全てのqPCR反応を行った。分泌
HBV DNA定量化に使用したTaqManプライマーを表39に列挙する。

【0786】

相対発現レベルは、HBV感染非処理細胞に対して正規化された比較サイクル閾値2- ΔC_t 法を使用して計算した。

10

20

30

40

50

【表 39】

表 39：上清定量からのHBV用プライマー

標的	供給元
HBV コア	フォワードプライマーCTG TGC CTT GGG TGG CTT T (配列番号353) リバースプライマーAAG GAA AGA AGT CAG AAG GCA AAA (配列番号354) プローブ56-FAM-AGC TCC AAA/ZEN/TTC TTT ATA AGG GTC G AT GTC CAT G-3IABkFQ (配列番号355)

10

【0787】

実施例 2. 5-HBsAg/HBeAg化学発光免疫アッセイ

HBsAg又はHBeAg CLIAキット (DiaSino、#DS1877032012V4、#DS1877012012V4) を使用して、感染後21日目に採取した上清中のHBsAg及びHBeAgを決定した。アッセイを製造者のプロトコルに従って行い、上清を1:50希釈で使用した。Envisionリーダー (Perkin Elmer) を使用して発光シグナルを測定した。

【0788】

結果

結果 4. 1: RTEL1及びFUBP1 mRNAのノックダウンの機能的検証としてのHBV感染PHH細胞におけるHBV pgRNAの減少

実験設定は、RTTEL1及びFUBP1に対して、単一分子、両方の分子を組み合わせて、及び共有結合分子として利用した。

20

【0789】

図25から導き出すことができるように、陰性対照 (Gal-NAc-352__1) は、肝内pgRNAの減少に影響を及ぼさなかった。単一処理として、Gal-NAc-326 (FUBP1 ASO) は、最高濃度のpgRNAを約51%の残存pgRNAまで減少させた。Gal-NAc-245__1 (RTTEL1 ASO) の単一処理を使用して、最高10uM濃度でHBV RNA減少 (すなわち、約12%) の傾向を観察することができた。RTTEL1及びFUBP1の2つの単一ASOを組み合わせると (それぞれGal-NAc-245__1及びGal-NAc-326__3)、以前にGal-NAc-326によって得られた最大有効性 (すなわち50%) と比較して、HBV RNAの減少の最大有効性 (すなわち18~25%) のわずかな低減が見られた。興味深いことに、両方の二重分子はpgRNAレベルに対して濃度応答効果を示した: 二重分子Gal-NAc-350__1は、pgRNAの40%の減少で最大の有効性を示した。第2の二重FUBP1/RTTEL1 ASO Gal-NAc-351__1もpgRNAの減少を示し、最大有効性は34%であった。

30

【0790】

結果 4. 2: RTEL1及びFUBP1 mRNAのノックダウンの機能的検証としてのHBV感染PHH細胞における肝内総HBV RNAの減少

実験設定は、RTTEL1及びFUBP1に対して、単一分子、両方の分子を組み合わせて、及び共有結合分子として利用する。

40

【0791】

図26に示すように、陰性対照 (Gal-NAc-352__1) は、肝内HBV RNAの減少に影響を及ぼさなかった。単一処理として、Gal-NAc-326 (FUBP1 ASO) は、HBV RNAを用量反応様式で減少させ、最高濃度 (10uM) でHBV RNAの約50%の阻害の最大の効果を示した。Gal-NAc-245__1 (RTTEL1 ASO) の単一処理を使用して、本発明者らは、最高濃度 (10uM) でHB

50

V RNAのわずかな減少（約14%）を観察した。

【0792】

RTEL1及びFUBP1に対する2つの単一ASO（それぞれGalNAc-245__1及びGalNAc-326）を同一処理に組み合わせた場合、HBV RNAの用量応答阻害も観察され、両方の化合物に使用された最高用量（5uM）で最大の有効性（すなわち37%）が見られた。驚くべきことに、分子を共有結合させると、HBV RNAのより強い阻害が用量依存的に誘導され、GalNAc-350__1及びGalNAc-351__1でそれぞれ67%及び60%の最大有効性があった。

【0793】

全体として、これらの結果は、共有結合分子を使用すると、RTEL1及びFUBP1 mRNA標的を標的とする単一分子又は単一ASOの組み合わせの使用と比較して、肝内HBV RNAの減少を改善できることを実証した。

【0794】

結果4.3：mRNA発現及び関連するEC50の減少

表40及び図27（RTEL1ノックダウン）；並びに表41及び図28（FUBP1ノックダウン）から導き出すことができるように、調査した両方の二重化合物（CMP番号：GalNAc-350__1及びGalNAc-351__1）は、FUBP1及びRTEL1のmRNA標的の両方について約0.1uMのEC50で標的mRNA発現を減少させる。両方の二重化合物（すなわち、共有結合したFUBP1及びRTEL1 ASO）の効果は、FUBP1（FUBP1 k.dのEC50は0.095uMである）及びRTEL1（RTEL1 k.dのEC50は0.10uMである）について個々のASO分子を使用して得られたEC50に匹敵する。したがって、両方のASO分子がリンカーによって共有結合的に連結された単一分子を有する標的mRNAの同様のk.d.を得ることが可能である。

【0795】

要約すると、これは、共有結合した二重ASO分子が、個々のASO分子を使用した場合と比較して、両方の標的mRNA（すなわち、RTEL1及びFUBP mRNA）の同程度のノックダウンを発揮することを実証している。さらに、二重分子のEC50は、FUBP1及びRTEL1の個々のASOの組み合わせを使用した場合に得られるEC50にも匹敵する。

【表40】

表40：PXB-PHH細胞における二重RTEL1/FUBP1 ASO、単一RTEL1 ASO、単一FUBP1 ASO、及び単一ASOの組み合わせのインビトロ効力。標的RTEL1 mRNAレベルをGUSBに対して正規化し、対照の%として計算する。以下の表では、RTEL1標的結合の個々のEC50値を見出すことができる：

RTEL1ノックダウンEC50

化合物番号	EC50 RTEL1 k. d.
GalNAc-352__1（陰性対照）	N/A
GalNAc-326__3（FUBP1）	N/A
GalNAc-245__1（RTEL1）	0.10uM
GalNAc-350__1（二重）	0.13uM
GalNAc-351__1（二重）	0.12uM
GalNAc-326__3+GalNAc-245__1（FUBP1及びRTEL1を2つの個別ASOとして追加した）	0.07uM

【表 4 1】

表 4 1 : P X B - P H H 細胞における二重 R T E L 1 / F U B P 1 A S O、単一 R T E L 1 A S O、単一 F U B P 1 A S O、及び単一 A S O の組み合わせのインビトロ効力。標的 F U B P 1 m R N A レベルを G U S B に対して正規化し、対照の % として計算する。以下の表では、F U B P 1 標的結合の個々の E C 5 0 値を見出すことができる：

F U B P 1 ノックダウン E C 5 0

化合物番号	E C 5 0 F U B P 1 k. d.
G a l N A c - 3 5 2 _ 1 (陰性対照)	N / A
G a l N A c - 3 2 6 _ 3 (F U B P 1)	0. 0 9 5 u M
G a l N A c - 2 4 5 _ 1 (R T E L 1)	N / A
G a l N A c - 3 5 0 _ 1 (二重)	0. 1 2 u M
G a l N A c - 3 5 1 _ 1 (二重)	0. 0 8 2 u M
G a l N A c - 3 2 6 _ 3 + G a l N A c - 2 4 5 _ 1 (F U B P 1 及び R T E L 1 を 2 つ の 個 別 A S O と し て 追 加 し た)	0. 1 5 u M

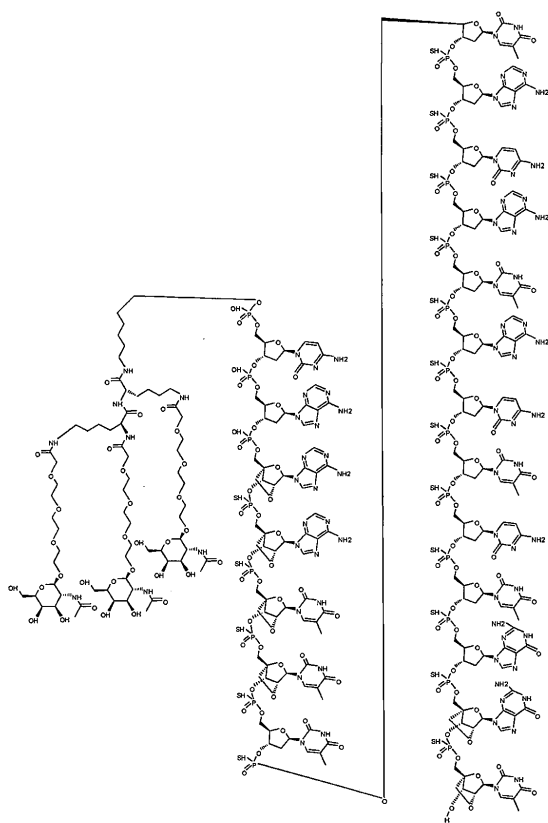
【 0 7 9 6 】

結 論

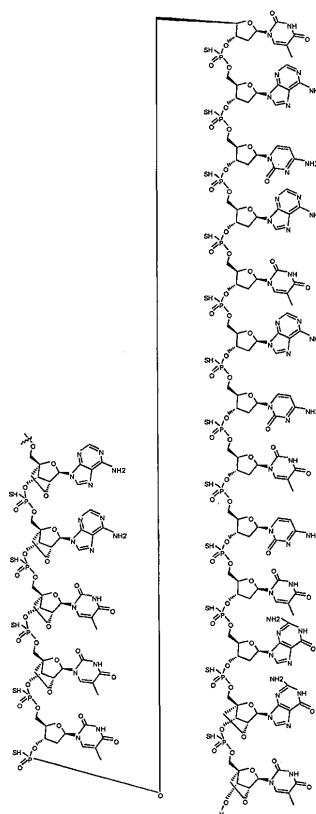
これらの結果は、F U B P 1 L N A 及び R T E L 1 L N A による単剤療法が、H B V D N A、H B s A g 及び H B e A g を含む肝内 c c c D N A 量、肝内 H B V 転写活性及び H B V 血清ウイルス血症を減少させることを示している。さらに、これらの結果は、F U B P 1 L N A と R T E L 1 L N A との組み合わせが追加の利益をもたらし、c c c D N A、H B V m R N A 及び血清ウイルス読み出しのウイルス量のさらなる減少をもたらすことを示している。この理由のために、F U B P 1 及び R T E L 1 の組み合わせ療法は、単剤療法よりも付加的な利益をもたらす可能性があり、慢性 H B V 患者における潜在的な組み合わせ戦略として評価されるべきである。

【図面】

【図 1】



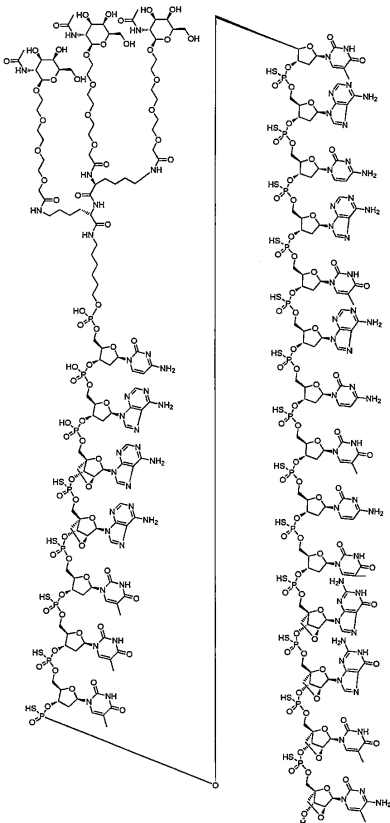
【図 1 A】



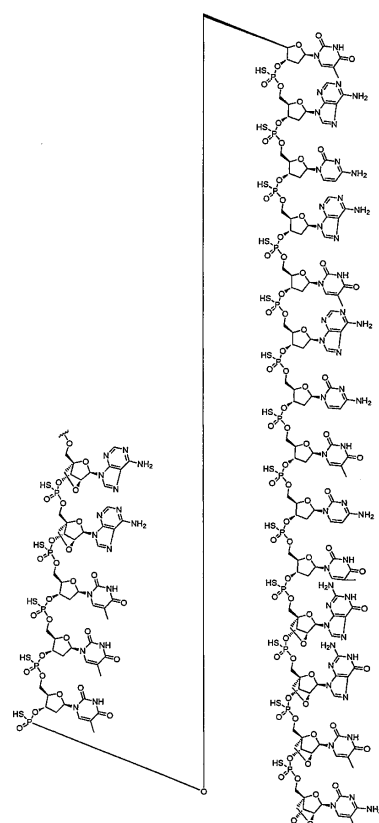
10

20

【図 2】



【図 2 A】

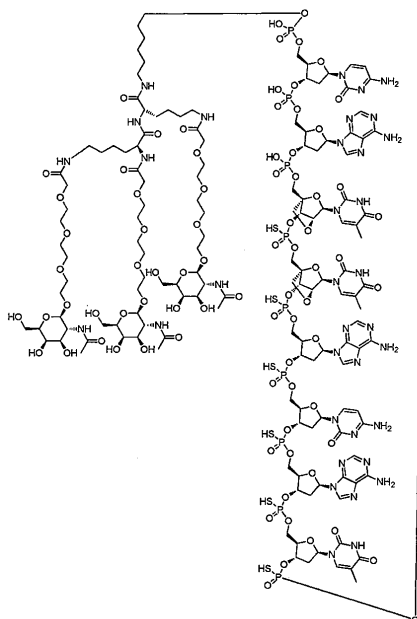


30

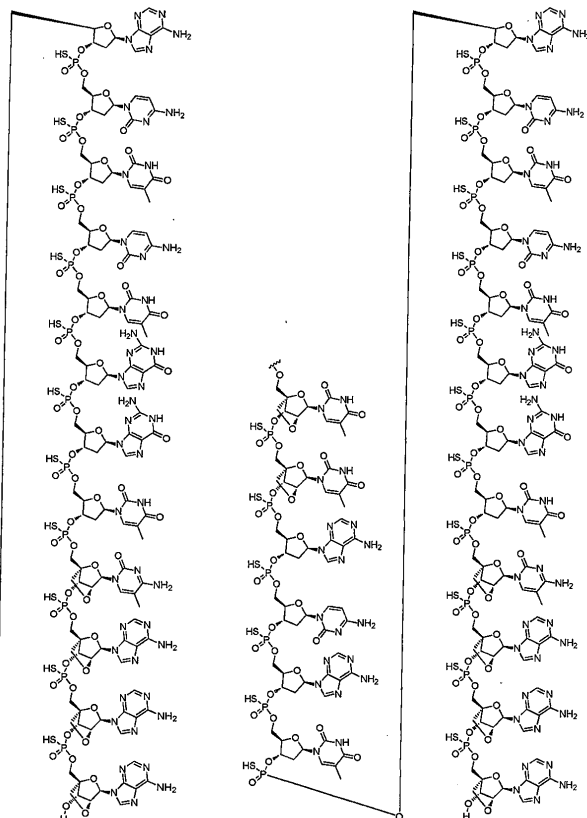
40

50

【図 3】



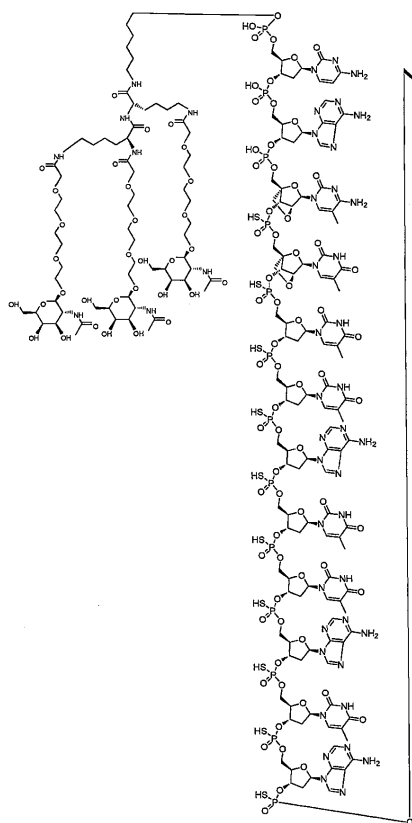
【図 3 A】



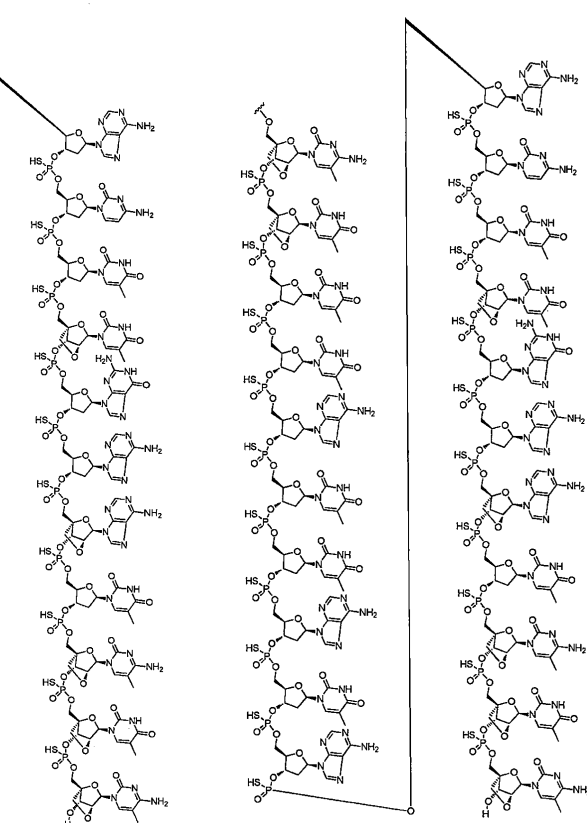
10

20

【図 4】



【図 4 A】



30

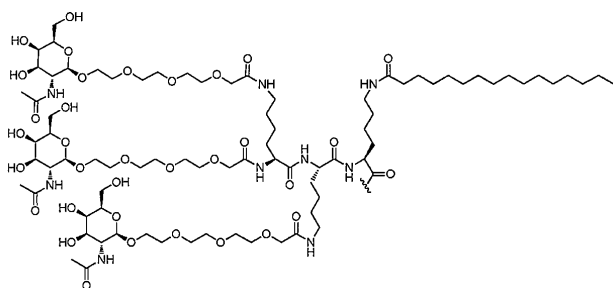
40

50

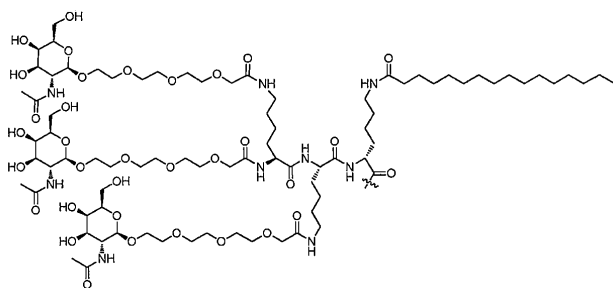
【図 5 - 1】

(GalNAc 残基)

A1

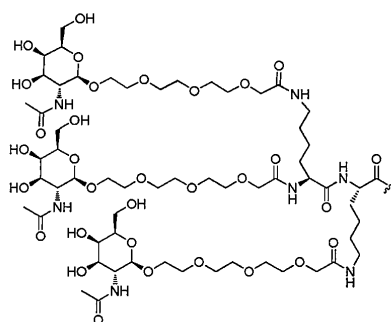


A2



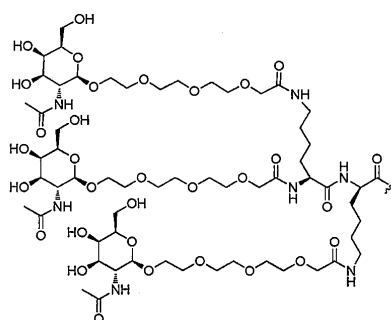
【図 5 - 2】

B1



10

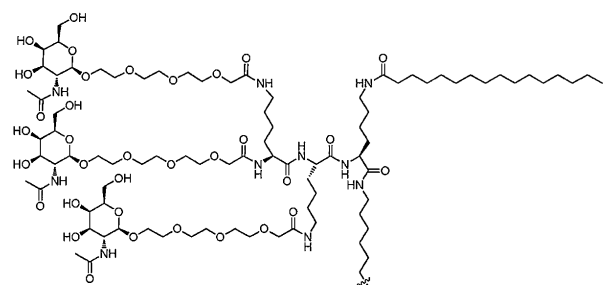
B2



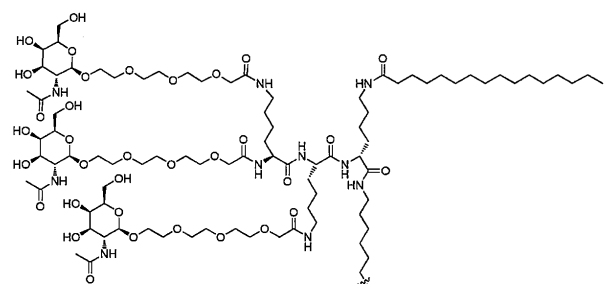
20

【図 5 - 3】

C1

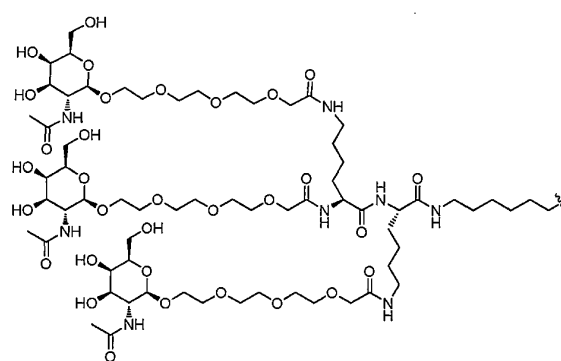


C2



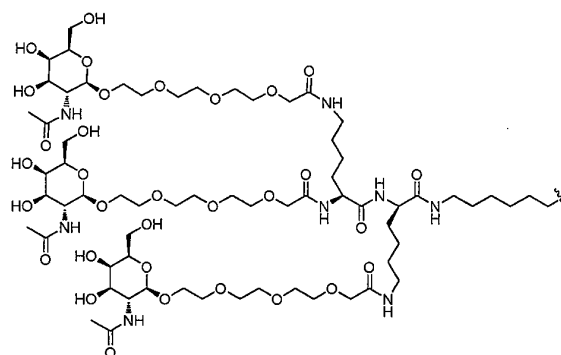
【図 5 - 4】

D1



30

D2

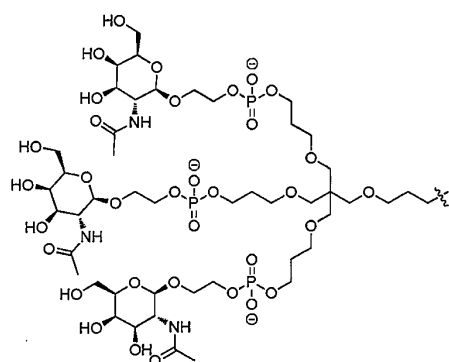


40

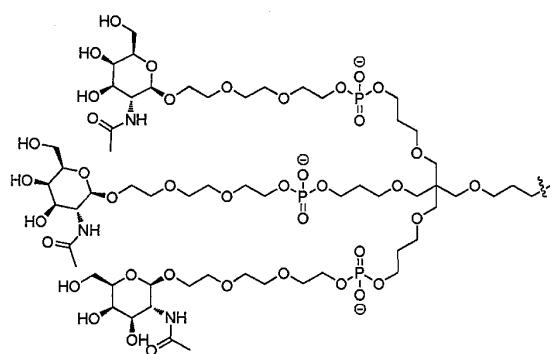
50

【図 5 - 5】

E1

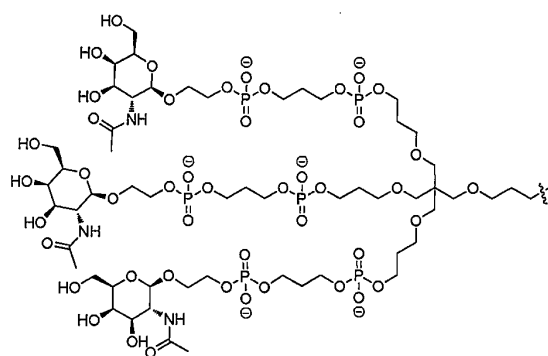


F1



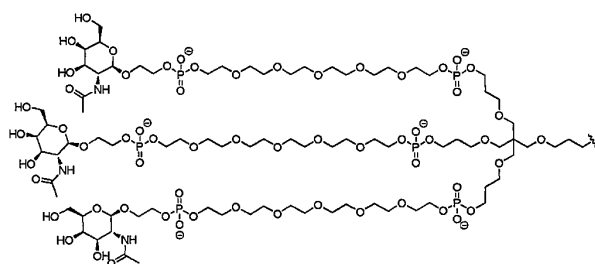
【図 5 - 6】

G1



10

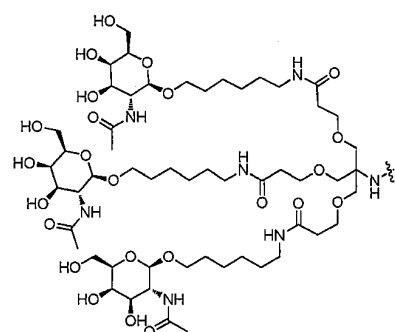
H1



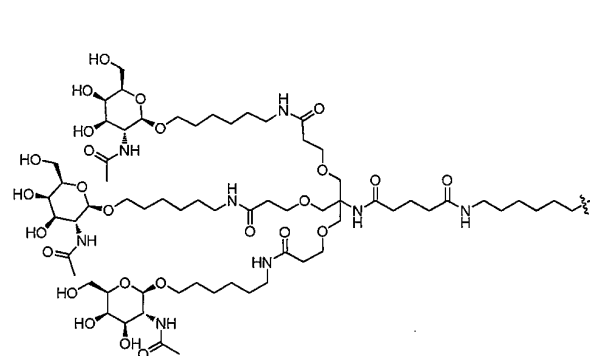
20

【図 5 - 7】

I1

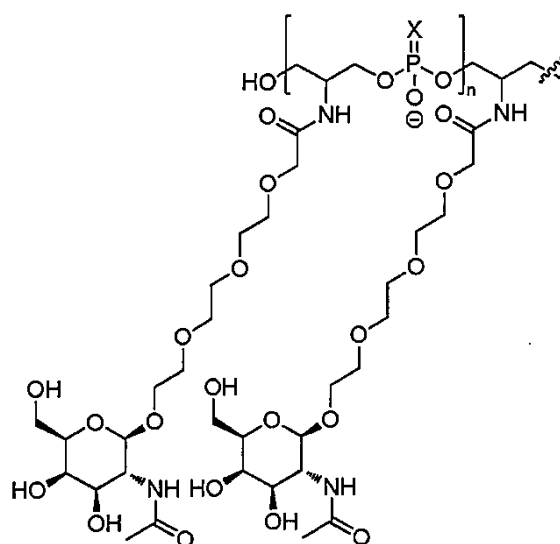


J1



【図 5 - 8】

L1



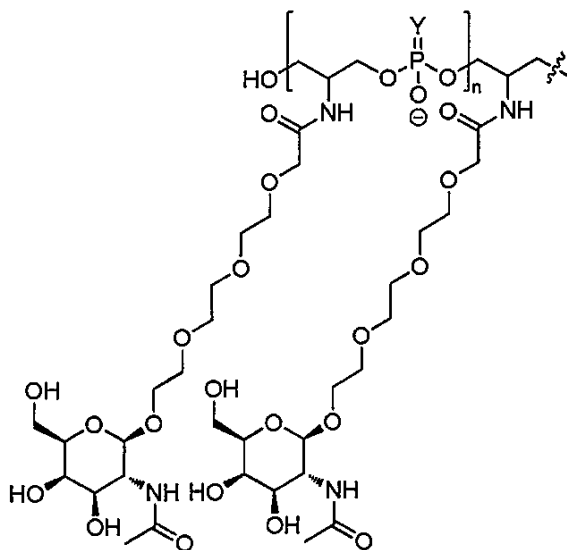
30

40

50

【図 5 - 9】

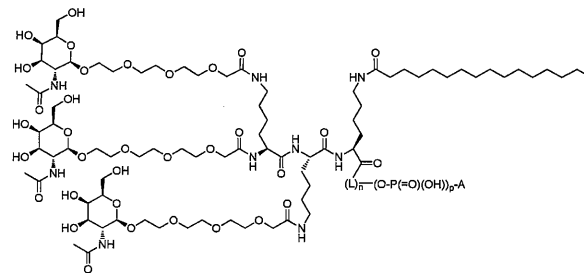
L2



【図 6 - 1】

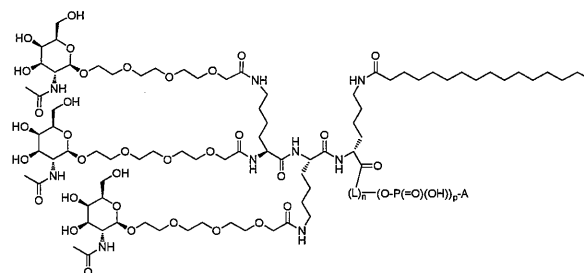
(化合物)

A1



10

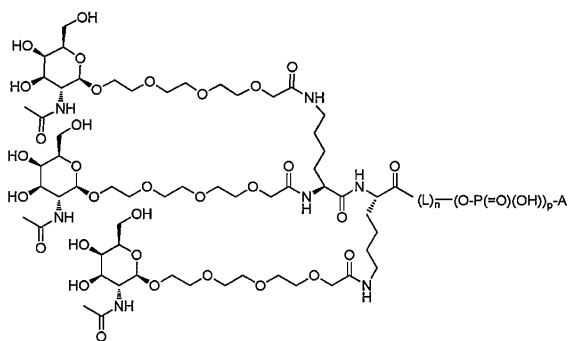
A2



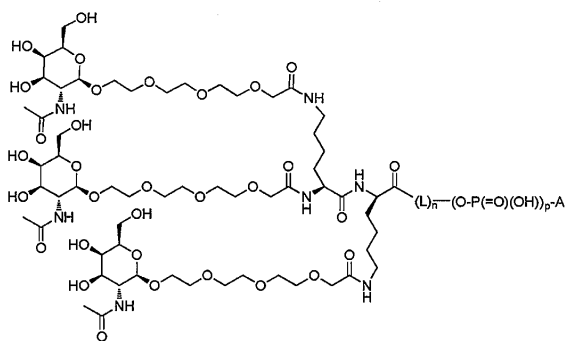
20

【図 6 - 2】

B1

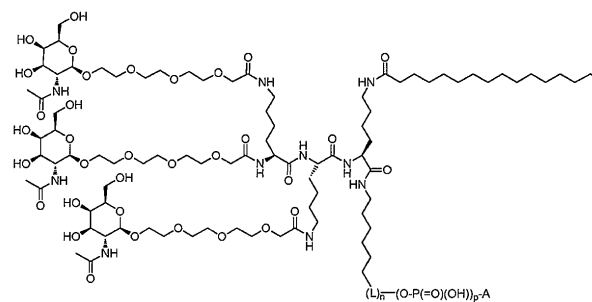


B2



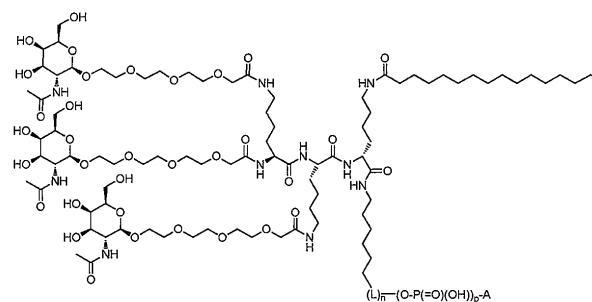
【図 6 - 3】

C1



30

C2

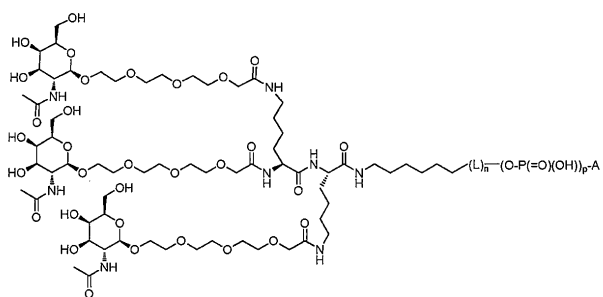


40

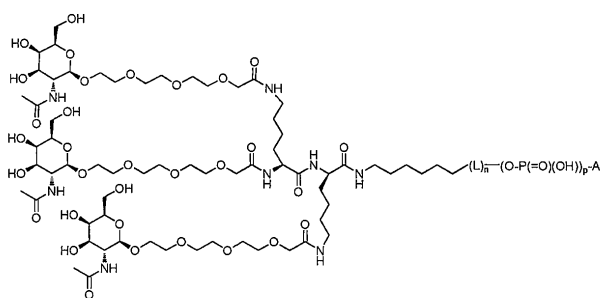
50

【図 6 - 4】

D1

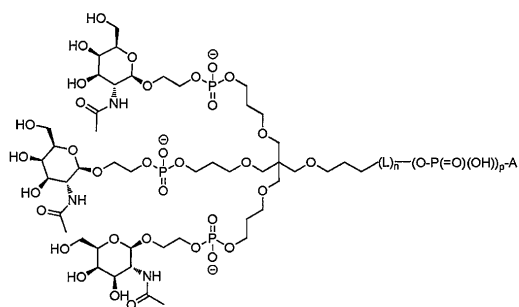


D2

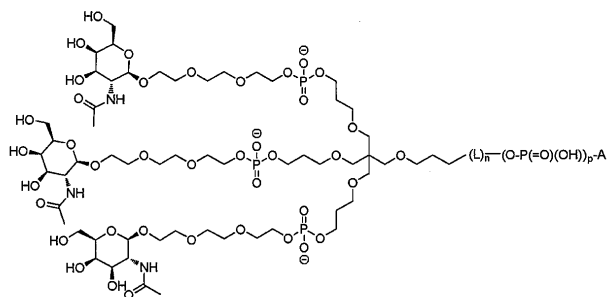


【図 6 - 5】

E1



F1

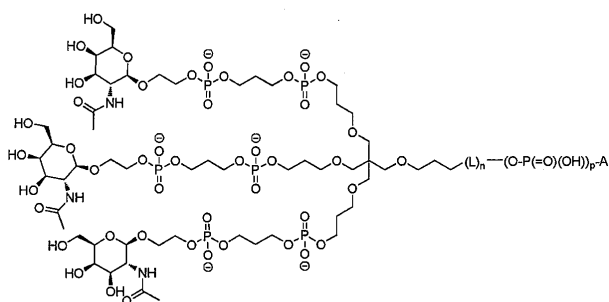


10

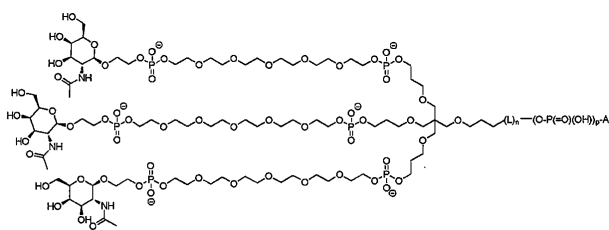
20

【図 6 - 6】

G1

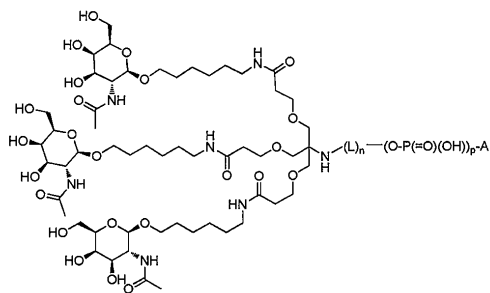


H1

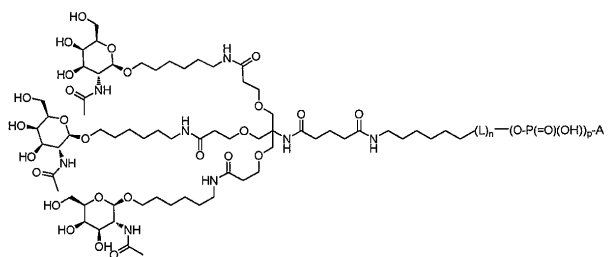


【図 6 - 7】

I1



J1



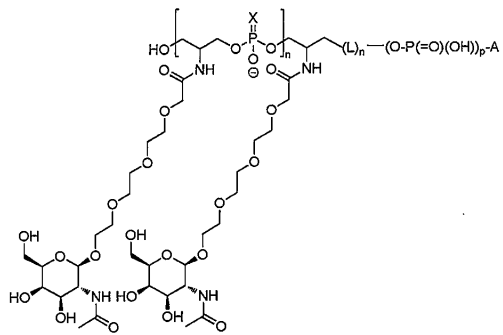
30

40

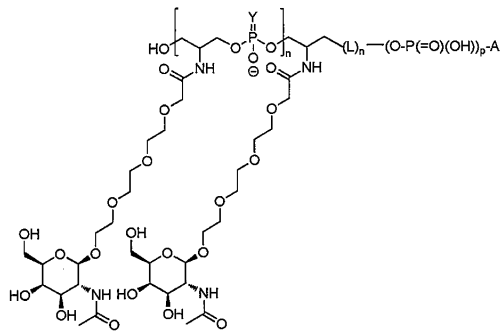
50

【図 6 - 8】

L1

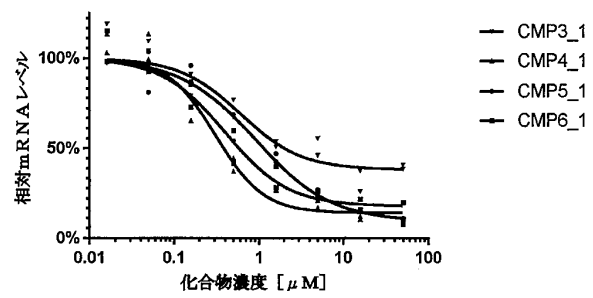


L2



【図 7】

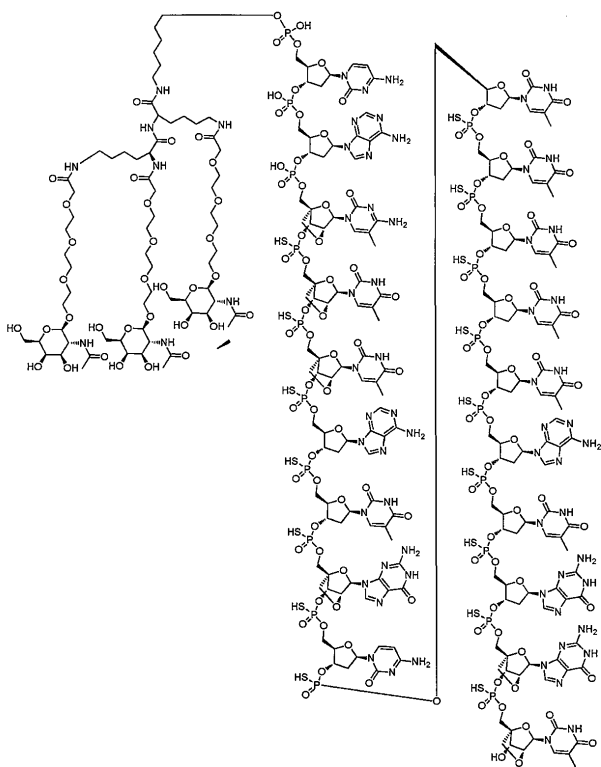
ヒトMDA-MB-231におけるRTEL1 mRNA



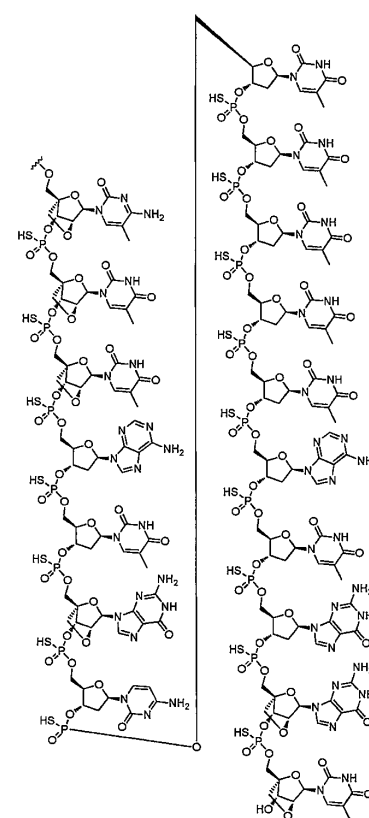
10

20

【図 8】



【図 8 A】

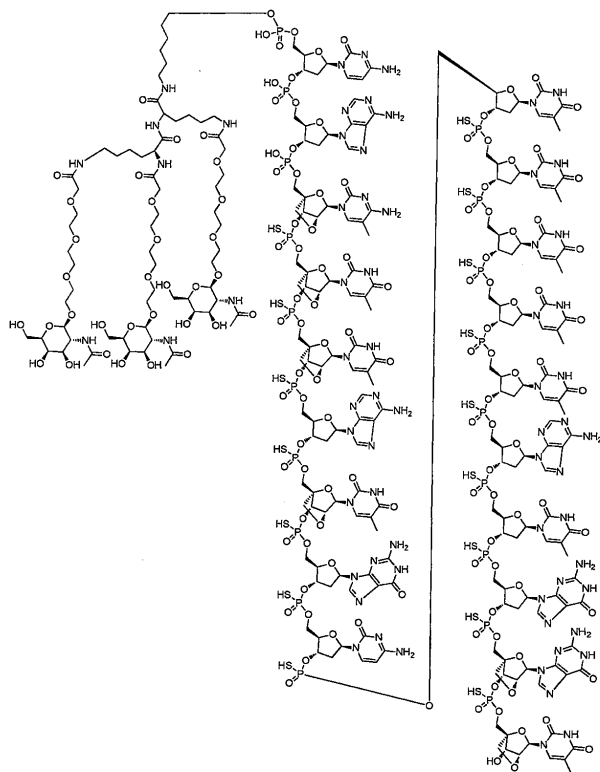


30

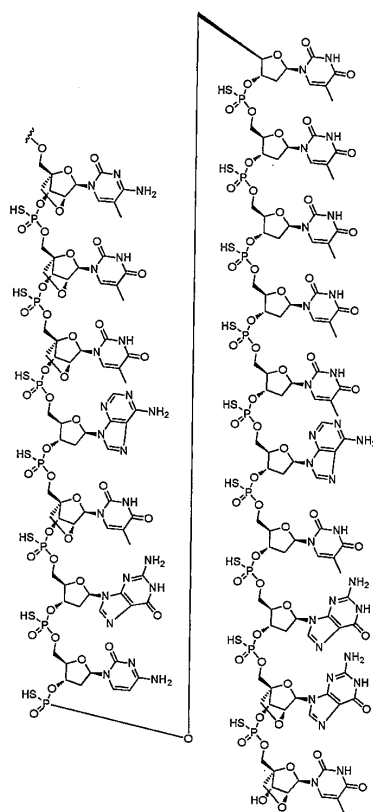
40

50

【図 9】



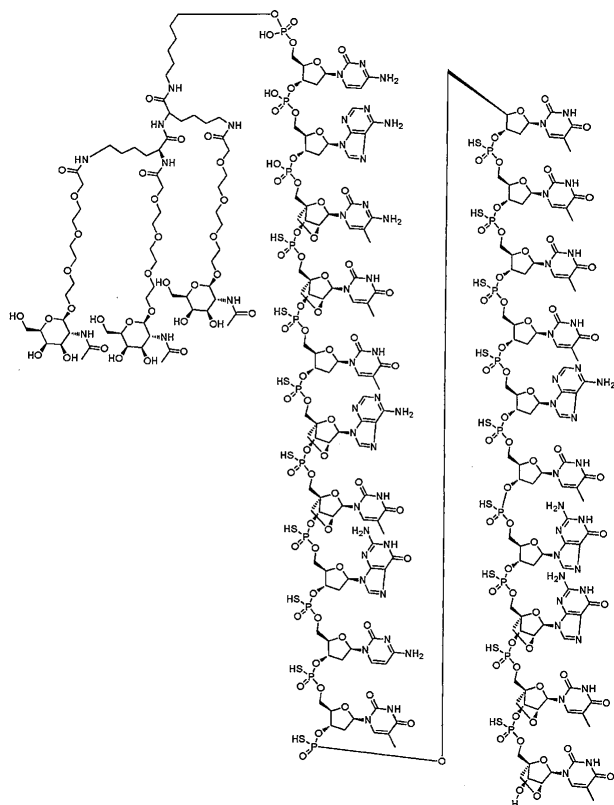
【図 9 A】



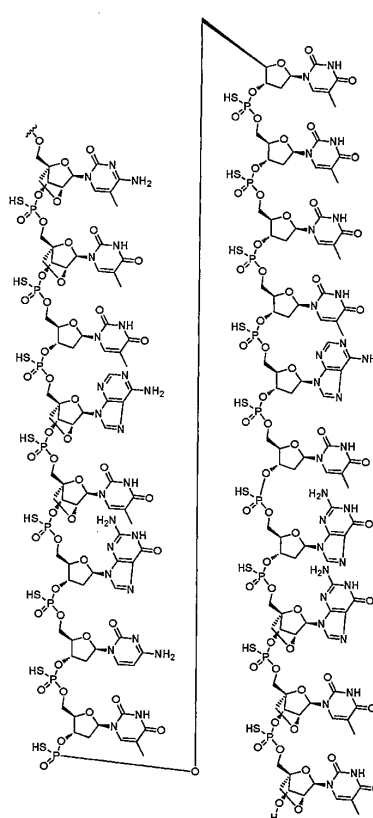
10

20

【図 10】



【図 10 A】

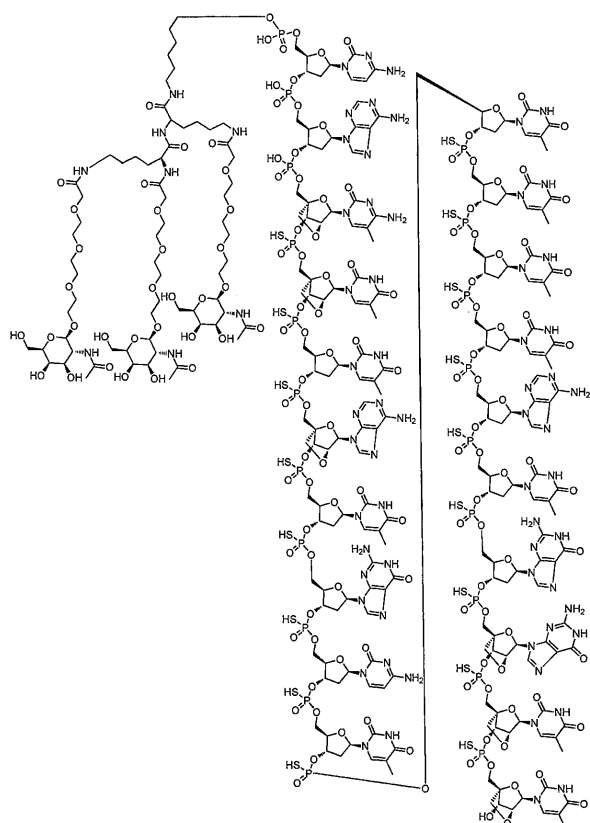


30

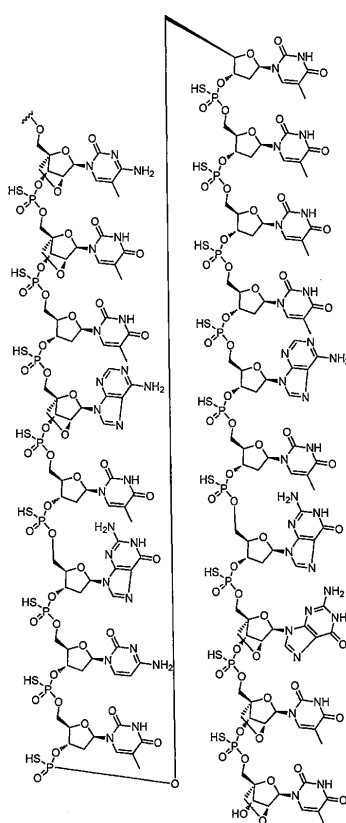
40

50

【図 1 1】



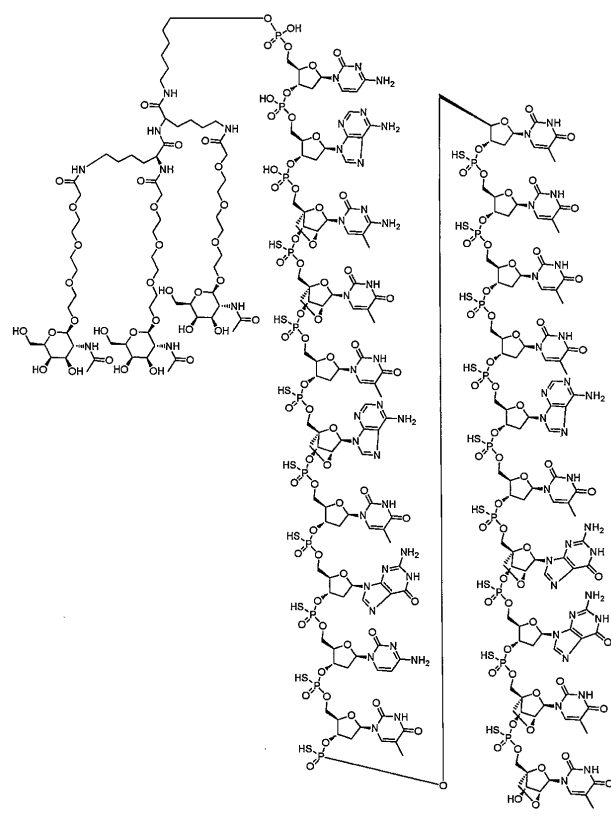
【図 1 1 A】



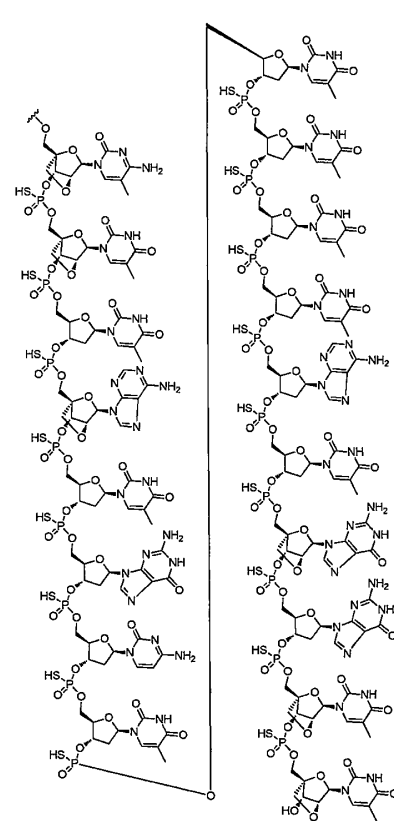
10

20

【図 1 2】



【図 1 2 A】

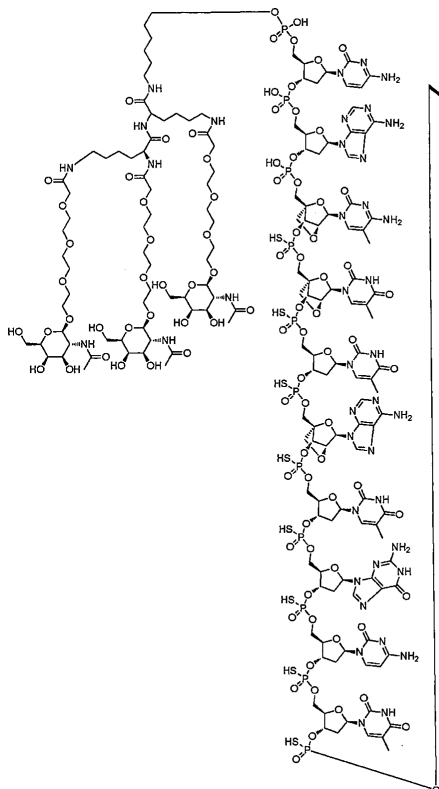


30

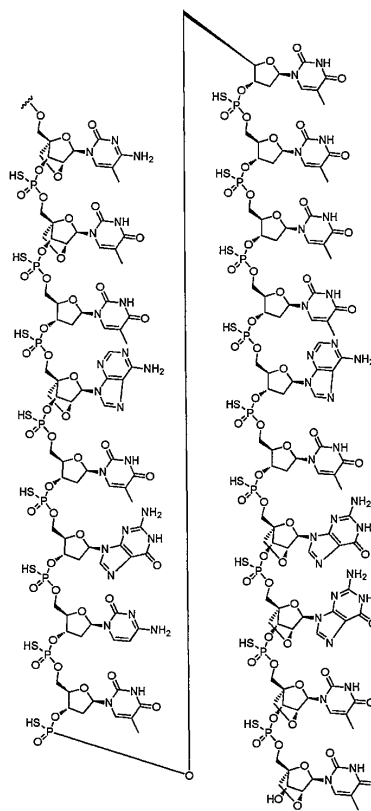
40

50

【図 13】



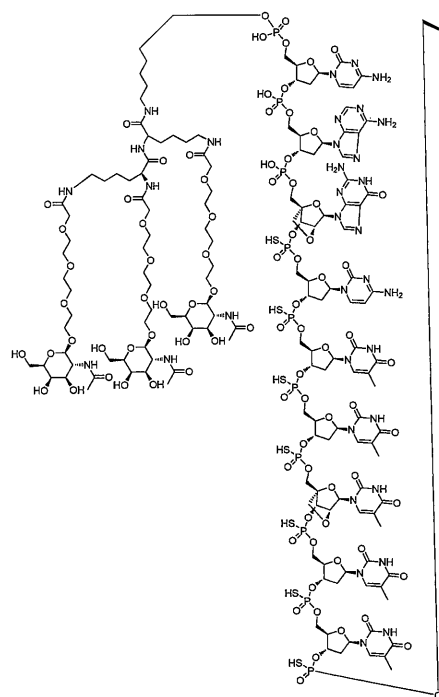
【図 13 A】



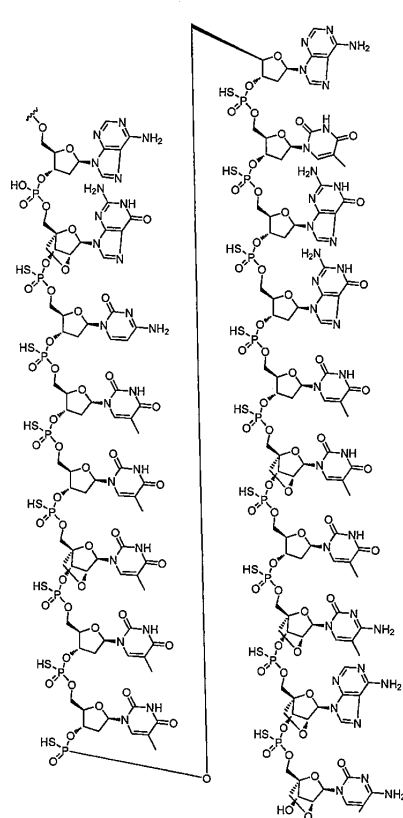
10

20

【図 14】



【図 14 A】

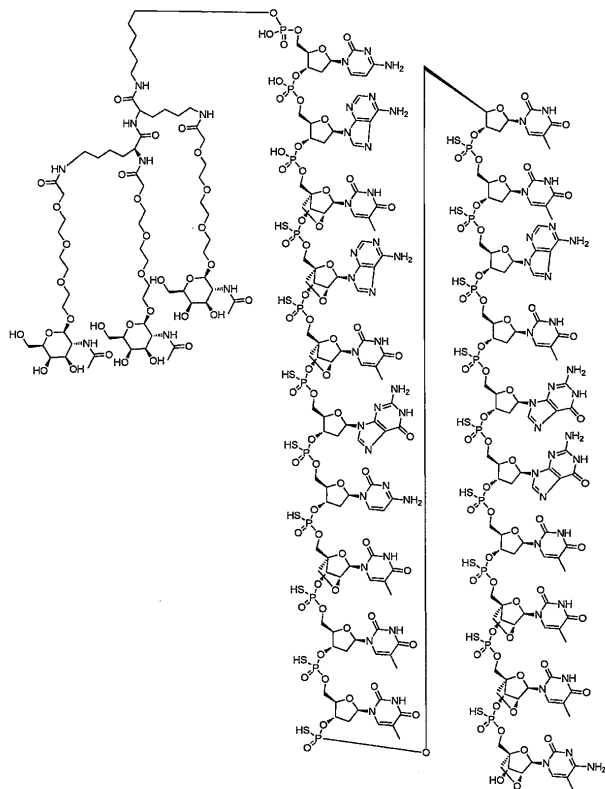


30

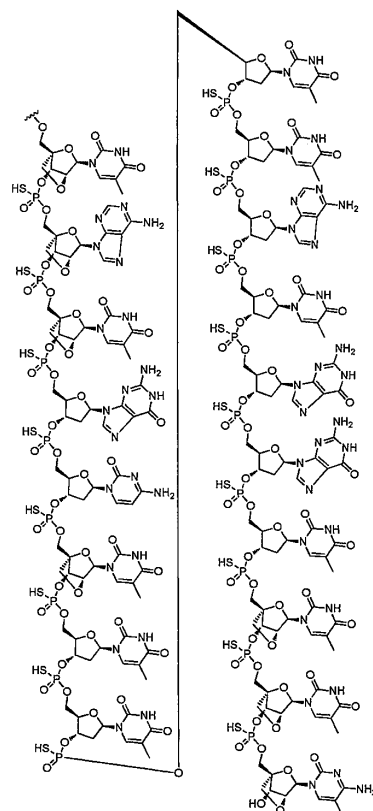
40

50

【図 15】



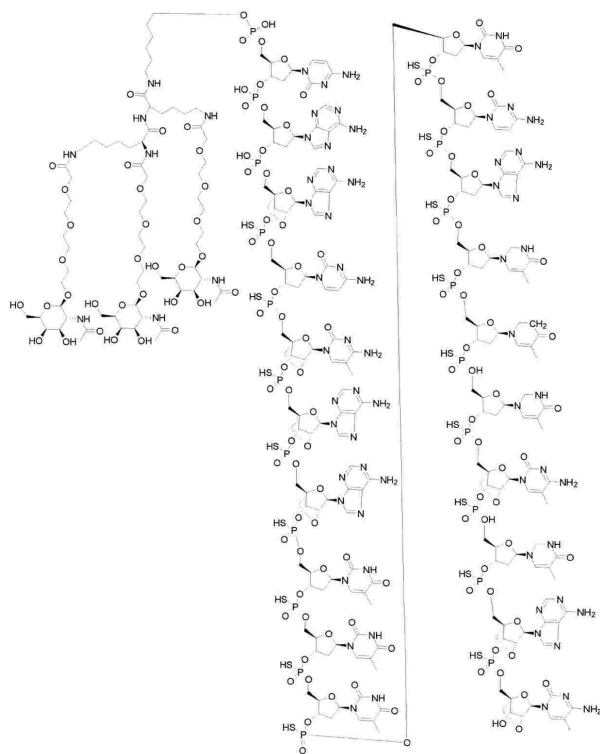
【図 15 A】



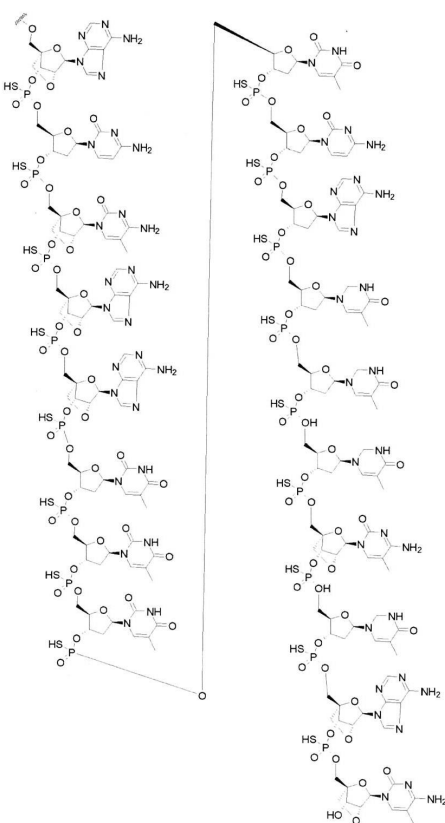
10

20

【図 16】



【図 16 A】

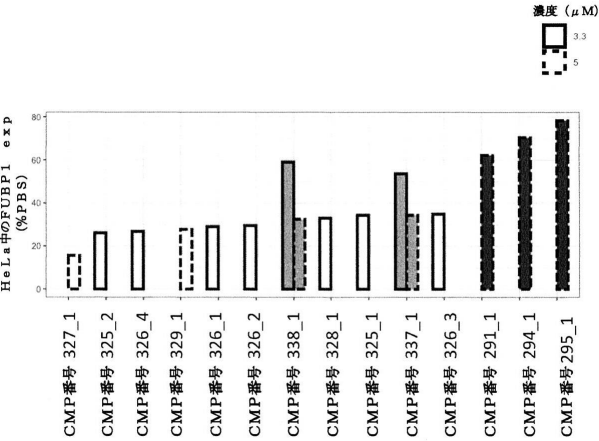


30

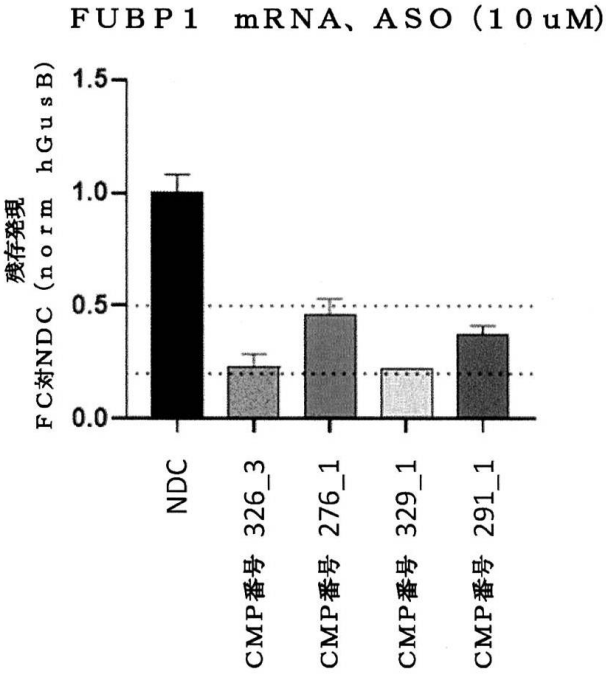
40

50

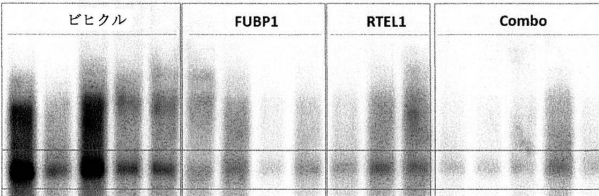
【図 1 7】



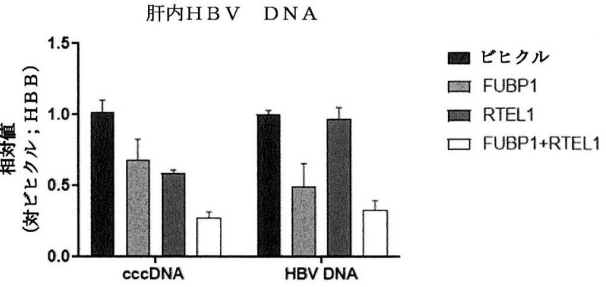
【図 1 8】



【図 1 9】



【図 2 0】



10

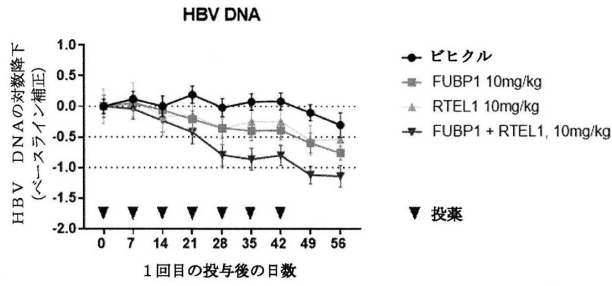
20

30

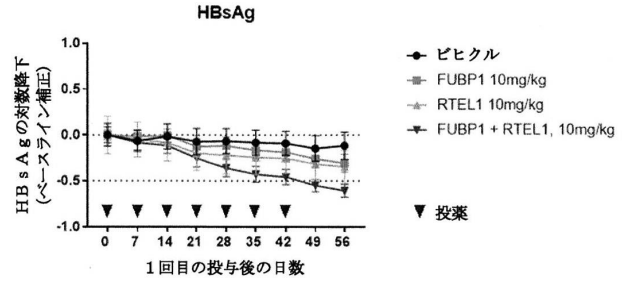
40

50

【図 2 1】

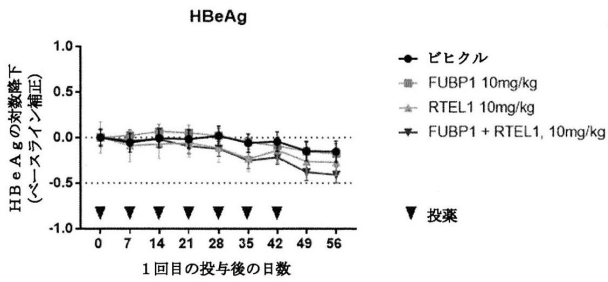


【図 2 2】

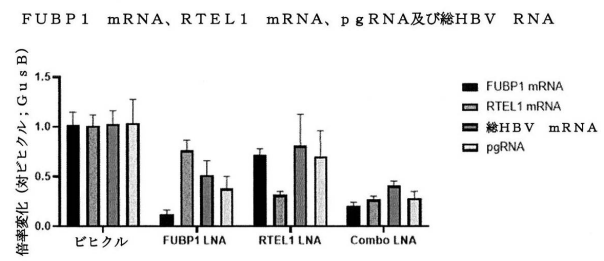


10

【図 2 3】

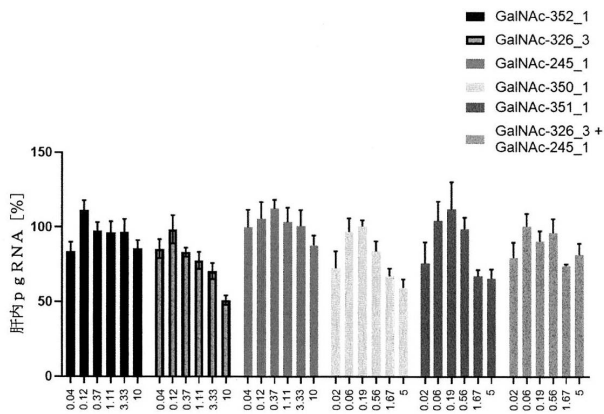


【図 2 4】

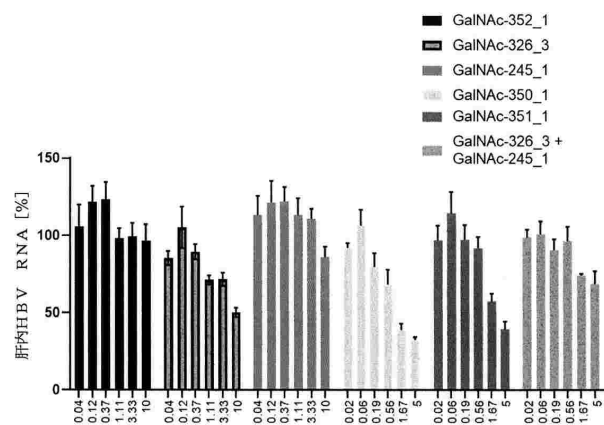


20

【図 2 5】



【図 2 6】

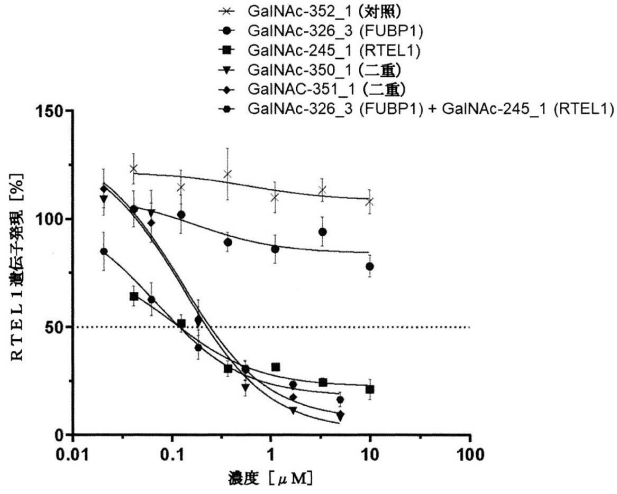


30

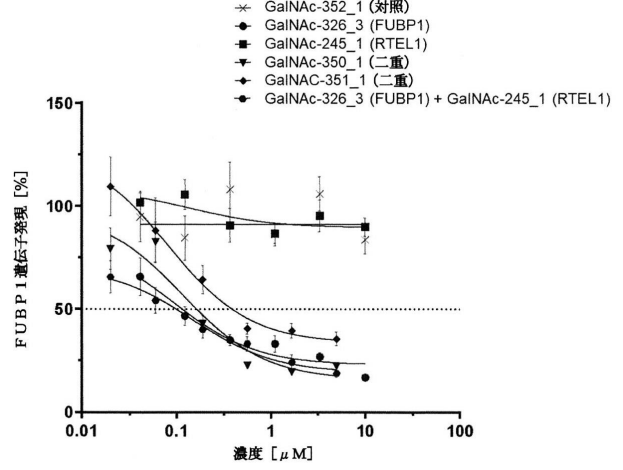
40

50

【図 27】



【図 28】



10

【配列表】

2024546993000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/086212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P31/20 A61K31/713 C12N15/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/011902 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 16 January 2020 (2020-01-16) example 1 -----	1-15
A	WO 2019/193165 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US] ET AL.) 10 October 2019 (2019-10-10) example 2 -----	1-15
A	WO 2021/122735 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 24 June 2021 (2021-06-24) the whole document ----- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2023

Date of mailing of the international search report

30/03/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Dolce, Luca

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		
		International application No PCT/EP2022/086212
C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/216390 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 21 December 2017 (2017-12-21) the whole document -----	1-15
A	WO 2021/122869 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 24 June 2021 (2021-06-24) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/086212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020011902 A1	16-01-2020	AU 2019300324 A1	21-01-2021
		BR 112021000538 A2	06-04-2021
		CA 3106288 A1	16-01-2020
		CL 2021000018 A1	09-07-2021
		CN 112534055 A	19-03-2021
		CR 20210015 A	22-03-2021
		EP 3821013 A1	19-05-2021
		IL 279929 A	01-03-2021
		JP 2021524277 A	13-09-2021
		KR 20210033004 A	25-03-2021
		PE 20211306 A1	20-07-2021
		SG 112021003488 A	25-02-2021
		TW 202020152 A	01-06-2020
		US 2021147850 A1	20-05-2021
		WO 2020011902 A1	16-01-2020
WO 2019193165 A1	10-10-2019	AU 2019247645 A1	15-10-2020
		BR 112020020220 A2	19-01-2021
		CA 3097544 A1	10-10-2019
		CL 2020002563 A1	07-05-2021
		CN 112055749 A	08-12-2020
		CR 20200453 A	02-03-2021
		EP 3775208 A1	17-02-2021
		IL 277745 A	30-11-2020
		JP 2021520387 A	19-08-2021
		KR 20200140853 A	16-12-2020
		MA 52661 A	17-02-2021
		PE 20211912 A1	28-09-2021
		RU 2020135289 A	05-05-2022
		SG 11202009680X A	29-10-2020
		TW 202006138 A	01-02-2020
WO 2021122735 A1	24-06-2021	CN 114901821 A	12-08-2022
		EP 4077667 A1	26-10-2022
		JP 2023506546 A	16-02-2023
		WO 2021122735 A1	24-06-2021
WO 2017216390 A1	21-12-2017	AU 2017285350 A1	20-12-2018
		AU 2017285351 A1	13-12-2018
		BR 112018075682 A2	02-04-2019
		BR 112018075960 A2	01-10-2019
		CA 3027305 A1	21-12-2017
		CA 3027811 A1	21-12-2017
		CL 2018003561 A1	15-03-2019
		CL 2020003329 A1	04-06-2021
		CL 2020003330 A1	04-06-2021
		CN 109328237 A	12-02-2019
		CN 109414448 A	01-03-2019
		CR 20180590 A	05-03-2019
		EP 3472346 A1	24-04-2019
		EP 3472362 A1	24-04-2019
		IL 263552 A	31-01-2019
		IL 263558 A	31-01-2019
		JP 7007304 B2	10-02-2022
		JP 2019518037 A	27-06-2019
		JP 2019523649 A	29-08-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/086212

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2022019747 A	27-01-2022
		JP 2022036182 A	04-03-2022
		KR 20190018515 A	22-02-2019
		KR 20190019164 A	26-02-2019
		KR 20220056252 A	04-05-2022
		MA 45496 A	24-04-2019
		MX 367541 B	22-08-2019
		MX 367543 B	22-08-2019
		PE 20190443 A1	29-03-2019
		RU 2019100094 A	17-07-2020
		SG 11201810594R A	28-12-2018
		US 2019194768 A1	27-06-2019
		US 2019216846 A1	18-07-2019
		US 2022096527 A1	31-03-2022
		WO 2017216390 A1	21-12-2017
		WO 2017216391 A1	21-12-2017

WO 2021122869 A1	24-06-2021	CN 114829599 A	29-07-2022
		EP 4077668 A1	26-10-2022
		JP 2023506540 A	16-02-2023
		WO 2021122869 A1	24-06-2021

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブライヒャー, コンラート

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

(72)発明者 フェルバー, ヨゼフィーネ

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

(72)発明者 ファンダー, イーレク

デンマーク国 2970 ヘルスホルム, フレムティズバイ 3, ロシュ・イノベーション・センタ
ー・コペンハーゲン・アクティーゼルスカベト

(72)発明者 ルアンサイ, スーファローネ

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

(72)発明者 ニルソン, トビアス

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

(72)発明者 オトスン, セーアン

デンマーク国 2970 ヘルスホルム, フレムティズバイ 3, ロシュ・イノベーション・センタ
ー・コペンハーゲン・アクティーゼルスカベト

(72)発明者 ポーズ・ビセンテ, ヨハンナ・マリエ

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

(72)発明者 テリングフィゼン, ティモシー

スイス国 4070 バーゼル, グレンツァッハーシュトラッセ 124, エフ. ホフマンーラ ロ
シュ アーゲー

F ターム (参考) 4C084 AA13 AA20 MA02 NA14 ZB33

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA14 ZB33