

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7604423号
(P7604423)

(45)発行日 令和6年12月23日(2024.12.23)

(24)登録日 令和6年12月13日(2024.12.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088
請求項の数 32 (全159頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-108490(P2022-108490)	(73)特許権者	591003013
(22)出願日	令和4年7月5日(2022.7.5)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(62)分割の表示	特願2020-573180(P2020-573180)		F . HOFFMANN - LA ROCH
原出願日	令和1年7月3日(2019.7.3)		E AKTIENGESSELLSCHA
(65)公開番号	特開2022-141739(P2022-141739)		FT
A)			スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(43)公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)	(74)代理人	100099759
審査請求日	令和4年8月3日(2022.8.3)		弁理士 青木 篤
(31)優先権主張番号	62/693,851	(74)代理人	100123582
(32)優先日	平成30年7月3日(2018.7.3)		弁理士 三橋 真二
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100117019
(31)優先権主張番号	62/726,005		弁理士 渡辺 陽一
(32)優先日	平成30年8月31日(2018.8.31)	(74)代理人	100141977
	最終頁に続く		弁理士 中島 勝
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T A U発現調節用オリゴヌクレオチド

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 6 から 3 0 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って、配列番号 1 の 1 2 0 5 1 ~ 1 2 1 1 1 位、3 9 5 6 2 ~ 3 9 5 9 3 位、又は 7 2 8 3 7 ~ 7 2 9 4 0 位内の連続するヌクレオチドに対して、1 0 0 % の相補性である少なくとも 1 6 ヌクレオチド長の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。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 6 ~ 6 5 から成る群より選択される配列を含む、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号 1 の 1 2 0 6 0 ~ 1 2 0 7 8 位、3 9 5 7 3 ~ 3 9 5 9 2 位、又は 7 2 8 6 2 ~ 7 2 8 9 0 位内の連続するヌクレオチドに対して、1 0 0 % の相補性である、請求項 1 又は 2 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 9、1 1、4 9、5 3、5 6 及び 6 2 から成る群より選択される配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドは、T a u の発現を低減することができ、前記オリゴヌクレオチドは、R N a s e H を動員することができる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の

アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記連続ヌクレオチド配列が、1つ以上の2'糖修飾ヌクレオシドを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記1つ以上の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より独立して選択される、請求項6に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 8】

前記連続ヌクレオチド配列が、4～8個のLNAヌクレオシドを含む、請求項6又は7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記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80%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項1～8のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

前記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1～8個のヌクレオシドを含み、そのうち2～5個が2'糖修飾され、F及びF'領域の5'及び3'末端を規定し、そして、GがRNase Hを動員することができる6～16個のヌクレオシドの領域、例えば、6～16個のDNAヌクレオシドを含む領域である、請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 11】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、

【表 1】

CTTtAATttaatcactcAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__102
CTTTaattttaatcaCtCAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__104
CTTTaattttaatcaCTCA	配列番号 11 ; CMP 番号 11__1
TtaaCTCAaatcaaTtctCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__38
TtaActCAaatcaattCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__51
TTAactCaaatcaatTctCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__179
TTAActcaaatcaattCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__189
CAACacctttttaattcATTA	配列番号 53 ; CMP 番号 53__1
CTCATcaacacctttttaTT	配列番号 56 ; CMP 番号 56__1
TTAactcatcaacaCCTT	配列番号 62 ; CMP 番号 62__1

30

40

から成る群より選択される化合物であり、ここで、大文字が-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字がDNAヌクレオシドであり、全LNA-Cが5-メチルシトシンであり、全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、請求項1～10のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

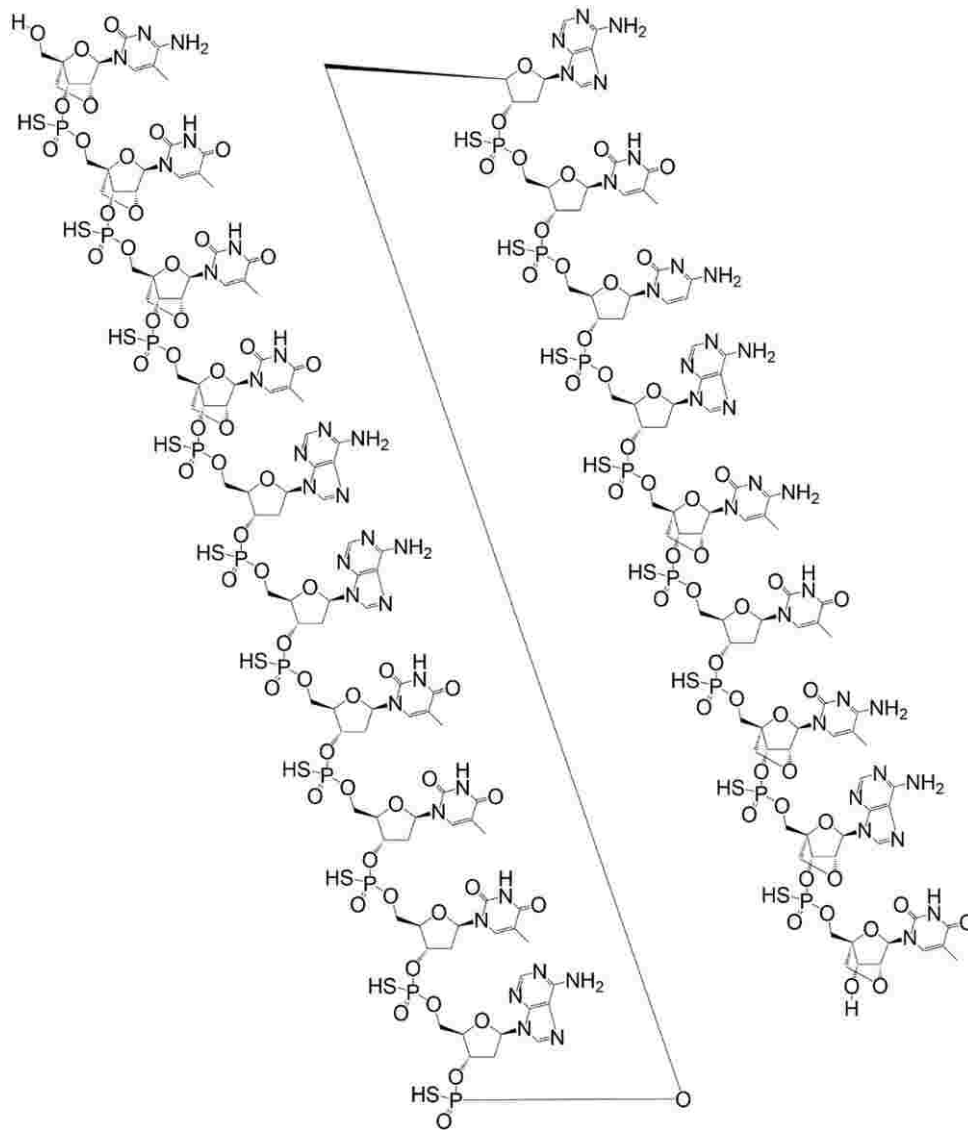
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CTTtAATttaatcactcAT (配列番号 9 ; CMP 番号 9__102)であり、ここで、大文字が-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字がDNAヌクレオシドであり、全LNA-Cが5-メチルシトシンであり、全ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項1～11のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

50

【請求項 13】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CMP番号9__104であり、以下の式：

【化1】



のものである、請求項1～11のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CMP番号11__1であり、以下の式：

10

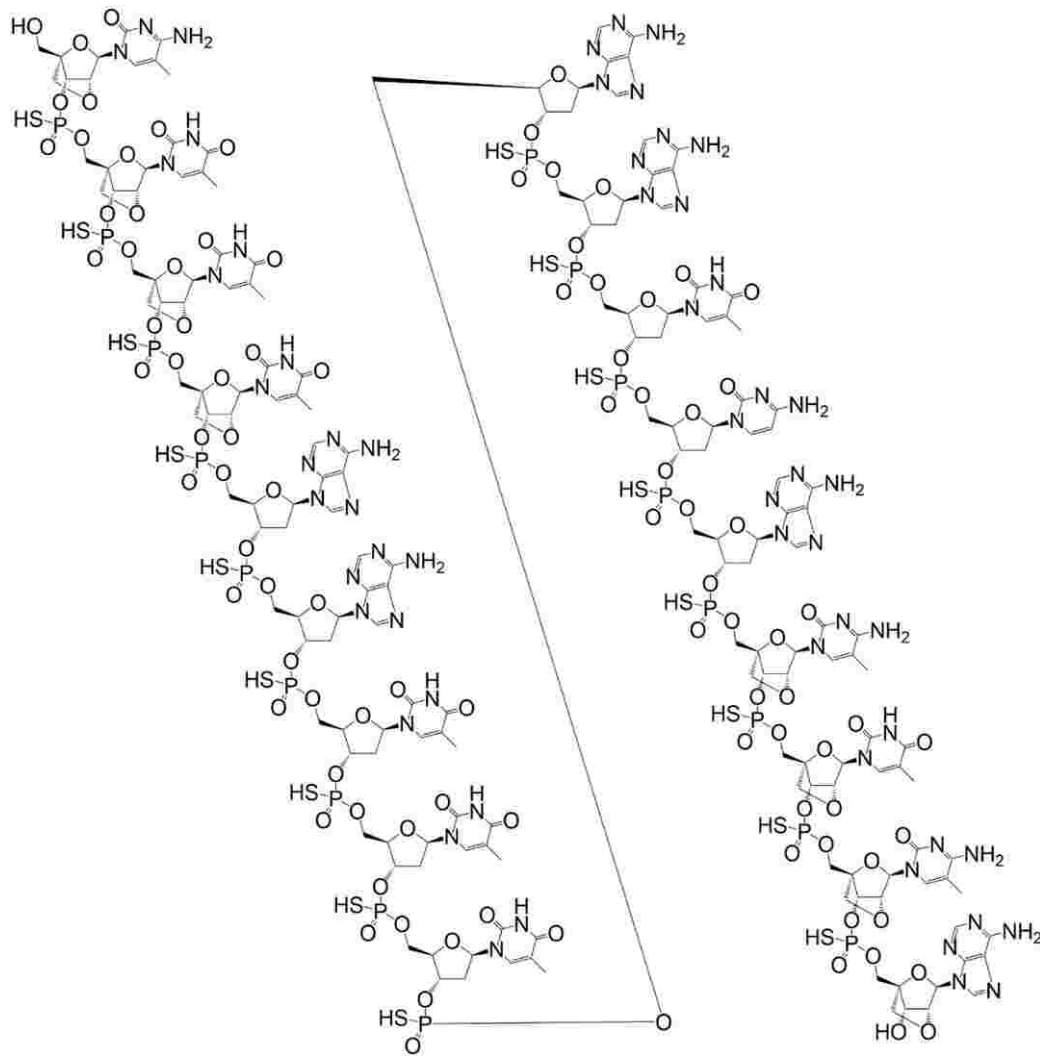
20

30

40

50

【化 2】



のものである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CMP 番号 49__38 であり、以下の式：

10

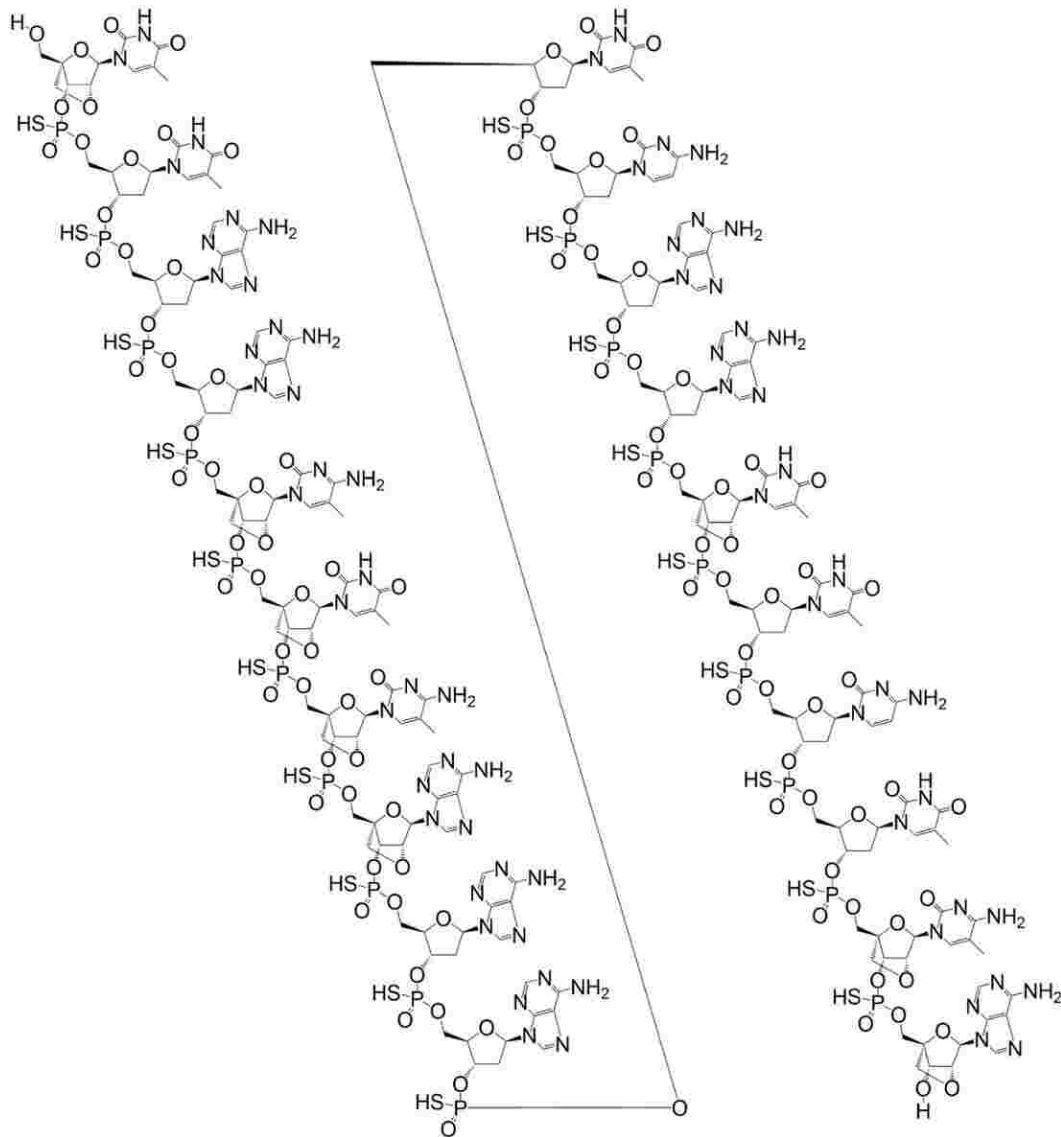
20

30

40

50

【化 3】



のものである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、TtaActCAaatcaattCTCA (配列番号 49 ; C M P 番号 49 __ 51) であり、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオシド であり、小文字が DNA ヌクレオシド であり、全 LNA C が 5 - メチルシトシン であり、全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、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、TTAactCaaatcaatTCtCA (配列番号 49 ; C M P 番号 49 __ 179) であり、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオシド であり、小文字が DNA ヌクレオシド であり、全 LNA C が 5 - メチルシトシン であり、全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、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、C M P 番号 49 __ 189 であり、以下の式：

10

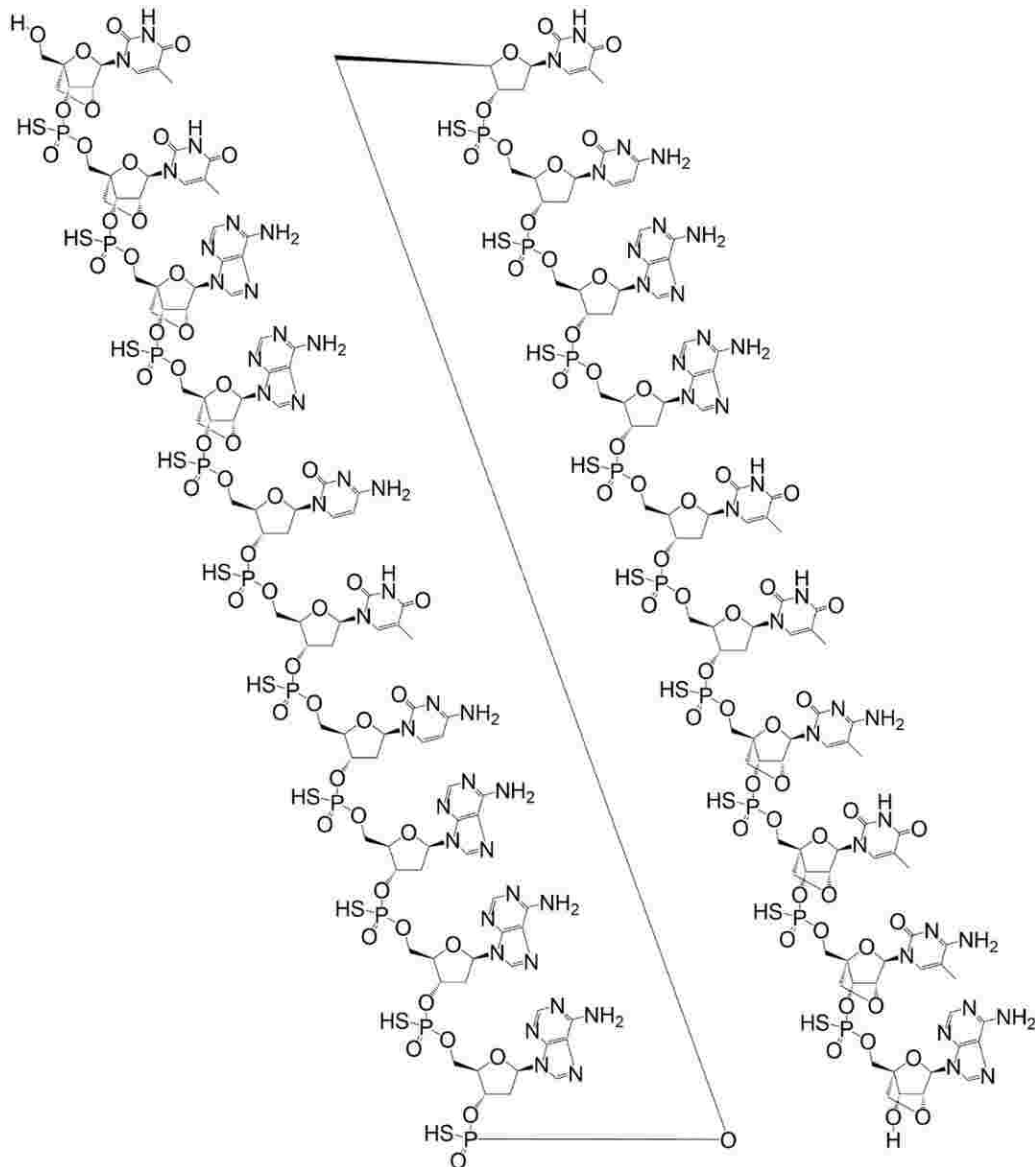
20

30

40

50

【化 4】



のものである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CAACaccttttaattcATTA (配列番号 53 ; C M P 番号 53 __ 1) であり、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字が DNA ヌクレオシドであり、全 LNA C が 5 - メチルシトシンであり、全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、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、CTCAtcaacacaccttttaaTT (配列番号 56 ; C M P 番号 56 __ 1) であり、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字が DNA ヌクレオシドであり、全 LNA C が 5 - メチルシトシンであり、全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、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、TTAactcatcaacaCCTT (配列番号 62 ; C M P 番号 62 __ 1) であり、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオシドであり、小文字が DNA ヌクレオシドであり、全 LNA C が 5 - メチルシトシンであり、全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、請求項 1 ~ 11 のい

10

20

30

40

50

ずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、前記オリゴヌクレオチドに共有結合した少なくとも 1 つのコンジュゲート部分を含むコンジュゲート。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲートの薬学的に許容される塩。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲート又は請求項 2 3 に記載の薬学的に許容される塩と、薬学的に許容される希釈剤、溶媒、担体、塩、及び / 又はアジュバンドを含む医薬組成物。

10

【請求項 2 5】

T a u を発現している標的細胞における T a u 発現を調節するためのインビトロ方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 4 に記載の医薬組成物を、有効量で前記細胞に投与することを含む方法。

【請求項 2 6】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 2 7】

アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、前頭側頭型認知症 (F T D)、又は 1 7 番染色体連鎖したパーキンソニズムを伴う F T D (F T D P - 1 7) から成る群より選択される疾患の治療又は予防に使用するための、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記疾患が、進行性核上性麻痺 (P S P) である、請求項 2 7 に記載の治療に使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はコンジュゲート、又は医薬組成物。

30

【請求項 2 9】

前記疾患が、アルツハイマ病 (A D) である、請求項 2 7 に記載の治療に使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、又はコンジュゲート、又は医薬組成物。

【請求項 3 0】

アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、前頭側頭型認知症 (F T D)、又は 1 7 番染色体連鎖したパーキンソニズムを伴う F T D (F T D P - 1 7) から成る群より選択される疾患の治療又は予防のための薬品を調製するための、請求項 1 ~ 2 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 2 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 4 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 1】

前記疾患が、進行性核上性麻痺 (P S P) である、請求項 3 0 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

40

【請求項 3 2】

前記疾患が、アルツハイマ病 (A D) である、請求項 3 0 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、微小管関連タンパク質 T a u (M A P T) 転写物に相補的であり、T a u の発現の低下をもたらすオリゴヌクレオチド (オリゴマー) に関する。M A P T 転写物及び

50

／又はTauタンパク質発現の低下は、タウオパチ、アルツハイマ (Alzheimer) 病、前頭側頭型認知症 (fronto-temporal dementia: FT D)、FTDP-17、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy: PSP)、慢性外傷性脳症 (chronic traumatic encephalopathy: CTE)、大脳皮質基底核変性症 (corticobasal ganglionic degeneration: CBD)、てんかん、ドラベ症候群、抑鬱、発作性障害、及び運動障害といった医的障害に有益である。

【背景技術】

【0002】

Tauはチューブリンと相互作用する微小管関連タンパク質 (microtubule-associated protein: MAP) であり、微小管の集合及び安定化に関与する。微小管は細胞骨格の重要な構造要素であり、有糸分裂、細胞質分裂、及び小胞輸送を含む様々な細胞過程に関与する。Tauタンパク質は複数の細胞及び組織型に存在するが、軸索輸送及び機能の調節に重要な役割を果たすニューロンに特に豊富に存在する。

【0003】

Tau発現レベル及び／又は機能の変化は、様々な神経変性障害の病態生理に寄与する。例えば、ミスフォールドした及び高リン酸化したTauの凝集体は、アルツハイマ病 (AD) と、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、慢性外傷性脳症 (CTE)、前頭側頭型認知症 (FTD) 及び17番染色体連鎖したパーキンソンズムを伴うFTD (FTD with parkinsonism linked to chromosome 17: FTDP-17)、ピック病 (Pick's disease: PiD)、嗜銀性顆粒病 (argyrophilic grain disease: AGD)、変化優位型老年認知症 (tangle-predominant senile dementia: TSPD)、原発性年齢関連タウオパチ (primary age-related Tauopathy: PART)、ダウン症候群、並びにリティコ-ボディグ病 (lytico-bodig disease) などの関連タウオパチと関連する神経原線維封入体に見出される。病理学的Tauのアップレギュレーションは、一側性巨脳症 (hemimegalencephaly: HME)、結節性硬化症、限局性皮質異形成2b型、及び神経節膠腫を含む小児タウオパチ (infantile Tauopathies) と関連する。加えて、異常なTau発現及び／又は機能は、脳内鉄沈着を伴う神経変性症1型 (neurodegeneration with brain iron accumulation type 1: NBIA1) としても知られるハラーホルデン・スパッツ症候群、神経節細胞腫、及び亜急性硬化性全脳炎のような他の疾患とも関連する可能性がある。Tauはまた、発作性障害 (例えば、てんかん)、ネットワーク機能障害 (例えば、抑鬱)、及び運動障害 (例えば、パーキンソン病) においても役割を果たし得る。

【0004】

アンチセンス分子及びsiRNA分子は、MAPTプレmRNA又はmRNA転写物を標的とすることによってTauタンパク質レベルを低減することができることが記載されている。例えば、De Vosら (2013年) 「Journal of Neuroscience」第33巻第12887頁、国際公開第WO2013/148260号、同第WO2014/153236号、同第WO2015/010135号、同第WO2016/126995号、同第WO2016/151523号、同第WO2017/09679号、及び同第WO2018/064593号を参照されたい。MAPT転写物のスプライス調節を誘導することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、Sudら (2014年) 「Mol Ther Nucl Acid」第3巻第e180頁及び国際公開第WO2016/019063号に記載されている。

【0005】

ADのようなTau関連障害は、高齢者における認知症の最も一般的な原因であって、タウオパチ、発作性障害、及び運動障害を含む、AD及び関連神経変性疾患の治療のため

10

20

30

40

50

の強力かつ効果的な薬剤が、大いに必要とされている。

【 0 0 0 6 】

発明の目的

本発明は、インビボ及びインビトロの両方でT a uを低減するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明は、有効なT a u阻害を与えるためにアンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的化され得る、ヒトM A P T プレ m R N A のイントロン1又は2に位置するM A P T プレ m R N A における3つの特異的標的領域を同定した。特に、配列番号1の標的位置1 2 0 5 1 ~ 1 2 1 1 1、3 9 5 6 2 ~ 3 9 5 9 3、及び/又は7 2 8 3 7 ~ 7 2 9 4 0は、T a uを低減する点で有利である。本発明はまた、T a uを低減することができる有効なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列及び化合物、並びにタウオパチ

10

【発明の概要】

【 0 0 0 7 】

本発明は、T a uの発現を調節することができるT a uコード化核酸を標的とするオリゴヌクレオチドと、T a uの機能に関連した疾患を治療又は予防するためのオリゴヌクレオチドの使用と、に関する。

【 0 0 0 8 】

したがって、第1の態様では、本発明は、1 0 ~ 3 0ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであって、配列番号3、4、及び5で表されるM A P T の特定の領域に対して少なくとも9 0 %の相補性を有する少なくとも1 0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を提供する。

20

【 0 0 0 9 】

オリゴヌクレオチドは、好ましくはギャップマ設計を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の切断によりT a uの発現を阻害することができる。切断は、好ましくは、ヌクレアーゼ動員を介して達成される。

【 0 0 1 0 】

更なる態様では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、及び/又はアジュバントと、を含む医薬組成物を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

更なる態様では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド又は組成物を該細胞に有効量で投与することによる、T a uを発現している標的細胞におけるT a u発現調節用インビボ又はインビトロ方法のための方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明の更なる態様では、本発明は、治療的又は予防的に有効な量の本発明のオリゴヌクレオチドを、疾患、障害、又は機能障害に罹患する又は罹り易い対象に投与することを含む、T a uのインビボ活性に関連した疾患、障害、又は機能障害の治療又は予防方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

40

更なる態様では、本発明のオリゴヌクレオチド又は組成物は、アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、前頭側頭型認知症 (F T D)、又はF T D P - 1 7 の治療又は予防のために使用される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図1】スクリーニングは、M A P T 上の全イントロン領域をカバーするオリゴヌクレオチドライブラリ (実施例1) から得られる。各点はオリゴヌクレオチド化合物を表し、x軸はM A P T 転写物上のその位置を図示し、y軸は対照 (低値はM A P T の大幅な低下に相当する) と比較した場合に残るM A P T m R N A の量を示す。A、B、及びCは、更なるオリゴヌクレオチド化合物のための標的領域として選択されるM A P T 転写物上の3

50

つの領域を示す。

【図 2】化合物 9 __ 1 0 3 (核酸塩基の配列は配列番号 9 に示す)

【図 3】化合物 9 __ 1 0 4 (核酸塩基の配列は配列番号 9 に示す)

【図 4】化合物 1 1 __ 1 (核酸塩基の配列は配列番号 1 1 に示す)

【図 5】化合物 4 9 __ 3 8 (核酸塩基の配列は配列番号 4 9 に示す)

【図 6】化合物 4 9 __ 1 8 9 (核酸塩基の配列は配列番号 4 9 に示す)

【 0 0 1 5 】

図 2、3、4、5、及び 6 に図示する化合物はプロトン化形態で示されており、すなわちホスホロチオエート結合上の S 原子は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と、代替的なカチオン (例えば、オリゴヌクレオチドが塩形態である場合) の存在とに依存することが理解されるであろう。プロトン化されたホスホロチオエートは互変異性型として存在する。

【 0 0 1 6 】

定義

オリゴヌクレオチド

用語「オリゴヌクレオチド」とは、本明細書で使用される場合、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、核酸分子又はオリゴマーとも称され得る。オリゴヌクレオチドは、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内で作製される。オリゴヌクレオチド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。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工であって化学的に合成され、典型的には精製又は単離される。本発明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 つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含んでもよい。

【 0 0 1 7 】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、本明細書で使用される場合、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。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 s i R N A 又は s h R N A 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。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの全長にわたって内部 (i n t r a) 又は相互 (i n t e r) の自己相補性の程度が 5 0 % 未満である限り、ヘアピン又は分子間二重鎖構造 (同じオリゴヌクレオチドの 2 分子間の二重鎖) を形成できることが理解される。

【 0 0 1 8 】

有利には、本発明の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するため R N A ヌクレオシドを含まない。

【 0 0 1 9 】

有利には、本発明のアンチセンス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 つ以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含む。更に、修飾されていないヌクレオシドが D N A ヌクレオシドであることは有利である。

【 0 0 2 0 】

連続ヌクレオチド配列

用語「連続ヌクレオチド配列」とは、標的核酸又は標的配列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、本明細書で用語「連続核酸塩基配列」及び用語「オリゴヌクレオチドモチーフ配列」と互換的に使用される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの全ヌクレオチドは、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、オリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド配列、例えば F - G - F ' ギャップマ領域を含み、場合により更なるヌクレオチド、例えば、官能基を連続ヌクレオチド配列に結合するのに使用され得るヌクレオチドリンカ領域を含んでもよい。ヌクレオチドリンカ領域

10

20

30

40

50

は、標的核酸に相補的であっても相補的でなくてもよい。オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、それ自体としてオリゴヌクレオチドより長くなることはできないことと、オリゴヌクレオチドは連続ヌクレオチド配列より短くなることはできないことと、が理解される。

【0021】

ヌクレオチド

ヌクレオチドは、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天然に存在しないヌクレオチドの両方を含む。本来、DNA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つ以上のリン酸基（ヌクレオシドに存在しない）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。

10

【0022】

修飾ヌクレオシド

用語「修飾ヌクレオシド」又は「ヌクレオシド修飾」とは、本明細書で使用される場合、等価なDNA又はRNAヌクレオシドと比較して、糖部分又は（核酸）塩基部分の1つ以上の修飾の導入によっ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。用語修飾ヌクレオシドはまた、用語「ヌクレオシド類似体」又は修飾「単位」又は修飾「モノマー」と本明細書では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おける修飾を有するヌクレオシドは、それらがワトソン・クリック塩基対合が可能であれば、依然として一般にDNA又はRNAと称される。

20

【0023】

修飾ヌクレオシド間結合

用語「修飾ヌクレオシド間結合」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より一般的に理解されるように定義される。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。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の場合、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形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、本発明のオリゴヌクレオチドのDNA又はRNAヌクレオシドの領域、例えばギャップマ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。

30

【0024】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上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つ以上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り、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））を用いることにより決定することができ、これらの両方は当該技術分野で周知である。オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を向上させ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称される。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部が修飾されている。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドを例えばコンジュゲートなどの非ヌクレオチド官能基に結合す

40

50

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の全部は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合である。

【0025】

修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、ジホスホロチオエート、及びボラノホスフェートを含む群より選択され得る。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合は、本発明のオリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオエート、ジホスホロチオエート、又はボラノホスフェートのRNAase H動員と適合する。

【0026】

いくつかの実施形態では、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など硫黄(S)を備える。

10

【0027】

本発明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。

【0028】

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、及び製造の容易さのため特に有用である。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部は、ホスホロチオエートである。

20

【0029】

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、ホスホロチオエート結合(複数可)に加えて、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合と、2、3、又は4ホスホジエステル結合などの少なくとも1つのホスホジエステル結合との両方を含む。ギャップマオリゴヌクレオチドにおいて、ホスホジエステル結合は、存在する場合、ギャップ領域G内の連続DNAヌクレオシド間に好適には位置しない。

【0030】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の中性ヌクレオシド間結合、特にホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI、アミド-3、ホルマアセタール、又はチオホルマアセタールから選択されるヌクレオシド間結合を含む。

30

【0031】

更なるヌクレオシド間結合は国際公開第WO2009/124238号(参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。一実施形態では、ヌクレオシド間結合は、国際公開第WO2007/031091号(参照により本明細書に組み込まれる)に開示されるリンカから選択される。特に、ヌクレオシド間結合は、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O,S)-S-、-S-P(O)₂-S-、-O-PO(R^H)-O-、O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(NR^H)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-、-O-PO(BH₃)-O-、-O-PO(NHR^H)-O-、-O-P(O)₂-NR^H-、-NR^H-P(O)₂-O-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-から選択することができるか、及び/又はヌクレオシド間リンカは、以下：-O-CO-O-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-CO-NR^H-CH₂-、-CH₂-NR^HCO-、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH₂-O-、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-SO₂-CH₂-、-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-、-CH₂-NCH₃-O-CH₂-からなる群から選択されてもよく、ここで、R^H

40

50

は水素及び C 1 - 4 - アルキルから選択される。

【 0 0 3 2 】

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また、非ヌクレアーゼ動員領域及び / 又は親和性増強領域、例えばギャップマの領域 F 及び F ' においても有用であり得る。ギャップマ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 つ以上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。

10

【 0 0 3 3 】

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ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。

【 0 0 3 4 】

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り得るが、核酸ハイブリダイゼーション中に機能性であ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、天然に存在する核酸塩基、例えばアデニン、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と、天然に存在しないバリエーションとの両方を指す。そのようなバリエーションは、例えば、Hirao ら (2012 年) 「Accounts of Chemical Research」第 45 巻第 2055 頁、及び Bergstrom (2009 年) 「Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl .」第 37 巻第 1 . 4 . 1 頁に記載されている。

20

【 0 0 3 5 】

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プリン又はピリミジン、例えば置換プリン又は置換ピリミジン、例えばイソシトシン、シュードイソシトシン、5 - メチルシトシン、5 - チアゾロ - シトシン、5 - プロピニル - シトシン、5 - プロピニル - ウラシル、5 - プロモウラシル 5 - チアゾロ - ウラシル、2 - チオ - ウラシル、2 ' - チオ - チミン、イノシン、ジアミノプリン、6 - アミノプリン、2 - アミノプリン、2 , 6 - ジアミノプリン、及び 2 - クロロ - 6 - アミノプリンから選択される核酸塩基に変えることにより修飾される。

30

【 0 0 3 6 】

核酸塩基部分は、各々の対応する核酸塩基の文字コード、例えば A、T、G、C、又は U により示され、ここで、各文字は、等価な機能の修飾核酸塩基の場合により含み得る。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。場合により、LNA ギャップマについて、5 - メチルシトシン LNA ヌクレオシドが使用され得る。

40

【 0 0 3 7 】

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 つ以上の糖 - 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記述する。用語「キメラ」オリゴヌクレオチドとは、修飾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。

【 0 0 3 8 】

相補性

50

用語「相補性」とは、ヌクレオシド/ヌクレオチドのワトソン・クリック塩基対合の能力を説明する。ワトソン・クリック塩基対は、グアニン（G）- シトシン（C）及びアデニン（A）- 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シドを含んでもよく、例えば5 - メチルシトシンは度々シトシンの代わりに使用され、したがって相補性という用語は、非修飾及び修飾核酸塩基の間のワトソン・クリック塩基対合を包含することが理解されるであろう（例えば、平尾ら（2012年）「Accounts of Chemical Research」第45巻第2055頁及びBergstrom（2009年）「Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.」第37巻第1.4.1頁を参照されたい）。

10

【0039】

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' - 3'と3' - 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 - 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）。

20

【0040】

用語「完全に相補的な」とは、100%の相補性を指す。

【0041】

以下は、標的核酸に完全に相補的なオリゴヌクレオチドの例である。

【0042】

以下は、標的核酸（配列番号4）に完全に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号49）の例である。

30

【0043】

5' g a a g g t t g a a a t g a g a a t t g a t t t g a g t t a a a 3'（配列番号4）

3' a c t c t t a a c t a a a c t c a a t t 5'（配列番号49）

【0044】

同一性

用語「同一性」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、配列モチーフ）に同一である、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、同一性のパーセンテージ = （一致 × 100） / 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パーセンテージ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るであろう（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）。

40

【0045】

ハイブリダイゼーション

50

用語「ハイブリダイズしている」又は「ハイブリダイズする」とは、本明細書で 사용되는場合、2つの核酸鎖（例えば、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の間で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して理解するべきである。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、度々、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 ）によって記述される。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 G° は、結合親和性をより正確に表し、 $G^\circ = -RT \ln(K_d)$ によって反応の解離定数（ K_d ）に関連付けられ、ここで 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反応の非常に低い G° 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する。 G° は、水性濃度が1 M、pHが7、温度が37 °Cの反応に関連したエネルギーである。標的核酸に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは自発的反応であり、自発的反応の場合、 G° はゼロ未満である。 G° は、例えば、Hansenら（1965年）「*Chem. Comm.*」第36～38巻及びHoldgateら（2005年）「*Drug Discov Today*」に記載されているように、等温滴定量熱測定（*isothermal titration calorimetry: ITC*）法を用いて実験的に測定することができる。当業者は、 G° 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。 G° はまた、Santa Lucia（1998年）「*Proc Natl Acad Sci USA*」第95巻第1460～1465頁に記載されているように、杉本ら（1995年）「*Biochemistry*」第34巻第11211～11216頁及びMcTigueら（2004年）「*Biochemistry*」第43巻第5388～5405頁に記載されている、適切に誘導した熱力学パラメータを使用して、最近接モデル（*nearest neighbor model*）を用いることにより数値的に推定することもできる。ハイブリダイゼーションによってその意図された核酸標的を調節する可能性を有するために、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ついて -10 kcal 未満の推定 G° 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 G° 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ついて -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 G° 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では、オリゴヌクレオチドは、-10～-60 kcal、例えば -12～-40、例えば -15～-30 kcal、又は -16～-27 kcal、例えば -18～-25 kcal の推定 G° 値で標的核酸にハイブリダイズする。

【0046】

標的核酸

本発明によれば、標的核酸は、哺乳動物 *Tau* 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、*Tau* 標的核酸又はMAPT標的核酸と称され得、これらの用語は互換的に使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、哺乳動物MAPTの標的エクソン領域を標的とし得るか、又は例えばMAPTプレmRNAのイントロン領域を標的とし得る（表1参照）。

【0047】

10

20

30

40

【表 1】

ヒトMAPTEクソン及びイントロン

ヒトTauプレmRNAのエクソン領域 (配列番号2)			ヒトTauプレmRNAのイントロン領域 (配列番号2)		
番号	始まり	終わり	番号	始まり	終わり
e 1	1	303	i 1	304	67979
e 2	67980	68129	i 2	68130	77517
e 3	77518	77604	i 3	77605	80043
e 4	80044	80130	i 4	80131	84033
e 5	84034	84099	i 5	84100	88837
e 6	88838	89590	i 6	89591	92699
e 7	92700	92755	i 7	92756	95537
e 8	95538	95735	i 8	95736	97119
e 9	97120	97246	i 8	97247	102058
e 10	102059	102324	i 9	102325	115969
e 11	115970	116062	i 10	116063	119902
e 12	119903	119984	i 11	119985	124287
e 13	124288	124400	i 12	124401	129623
e 14	129624	134004			

10

20

【0048】

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

【0049】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、配列番号1及び2、又はその天然に存在するバリエーション（例えば、哺乳動物Tauタンパク質をコードする配列）からなる群より選択される。本発明のオリゴヌクレオチドを研究又は診断に使用する場合、標的核酸は、DNA又はRNAに由来するcDNA又は合成核酸であり得る。

30

【0050】

インビボ又はインビトロ適用のために、本発明のオリゴヌクレオチドは、典型的には、MAPT標的核酸を発現している細胞におけるTauタンパク質の発現を阻害することができる。本発明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わたって測定され、場合により1つ又は2つのミスマッチを除いて、また場合により、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領域、又は他の非相補的末端ヌクレオチド（例えば、D'又はD''）を除いて、MAPT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

【0051】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、ヒトTauなどの哺乳動物Tauタンパク質、例えば配列番号1として開示されているようなヒトMAPTプレmRNA配列をコードするRNA又はDNAである。例示的な標的核酸に関する更なる情報は、表2及び3に提供される。

【0052】

50

【表 2】

種	染色体	鎖	ゲノム座標		アセンブリ	mRNAに関するNCBI参照配列 *受入番号
			始まり	終わり		
ヒト	17	fwd	45894382	46028334	GRCh38.p12	NG_007398.1
カニクイザル	16	fwd	58257786	58390183	Macaca_fascicularis_5.0	NC_022287.1で58257786~58390183

【0053】

Fwd = 順鎖 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。

【0054】

* アメリカ国立生物工学情報センター参照配列データベースは、ゲノム、転写物、及びタンパク質を含む、包括的で統合された、冗長性のない、十分に注釈が付けられた参照配列のセットである。これはwww.ncbi.nlm.nih.gov/refseqで主催されている。

【0055】

【表 3】
種にわたる T a u / M A P T についての配列の詳細

種	R N A 型	長さ (n t)	配列番号
ヒト	プレ m R N A	1 3 4 0 0 4	1
サル	プレ m R N A	1 3 2 2 1 8	2

【 0 0 5 6 】

標的配列

用語「標的配列」とは、本明細書で使用される場合、標的核酸に存在するヌクレオチドの配列を指し、これは本発明のオリゴヌクレオチドに相補的な核酸塩基配列を含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、本発明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、例えば本発明の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。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、標的配列は、表 4 (R _ 1 - R _ 2 2 5 4) のいずれかの領域から選択される配列である。特に、標的配列は、R _ 2 2 3、R _ 7 3 8、又は R _ 1 2 9 8 からなる領域の群内の領域のうち 1 つから選択され得る。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

本発明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 (r e g .)									
領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)
		始まり	終わり			始まり	終わり		
R_1	32	4	35	R_752	23	40118	40140	R_1503	88
R_2	32	37	68	R_753	40	40209	40248	R_1504	20
R_3	32	70	101	R_754	24	40273	40296	R_1505	75
R_4	25	103	127	R_755	63	40301	40363	R_1506	35
R_5	187	156	342	R_756	35	40461	40495	R_1507	24
R_6	33	344	376	R_757	27	40497	40523	R_1508	24
R_7	37	385	421	R_758	33	40547	40579	R_1509	20
R_8	47	440	486	R_759	42	40587	40628	R_1510	41
R_9	22	488	509	R_760	41	40630	40670	R_1511	25
R_10	38	511	548	R_761	34	40697	40730	R_1512	23
R_11	63	580	642	R_762	57	40772	40828	R_1513	56
R_12	20	649	668	R_763	36	40831	40866	R_1514	71
R_13	32	710	741	R_764	60	40868	40927	R_1515	32
R_14	37	743	779	R_765	28	40941	40968	R_1516	54
R_15	27	792	818	R_766	29	40971	40999	R_1517	38
R_16	23	814	836	R_767	96	41031	41126	R_1518	31
R_17	115	839	953	R_768	43	41128	41170	R_1519	33
R_18	25	955	979	R_769	22	41218	41239	R_1520	36
R_19	80	981	1060	R_770	28	41266	41293	R_1521	20
R_20	23	1071	1093	R_771	25	41311	41335	R_1522	20
R_21	26	1095	1120	R_772	50	41356	41405	R_1523	29
R_22	32	1177	1208	R_773	55	41425	41479	R_1524	51
R_23	78	1239	1316	R_774	23	41483	41505	R_1525	48
R_24	34	1334	1367	R_775	47	41518	41564	R_1526	21

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_25	68	1401	1468	R_776	36	41586	41621	R_1527	46	87080	87125
R_26	82	1470	1551	R_777	77	41641	41717	R_1528	23	87140	87162
R_27	95	1566	1660	R_778	48	41762	41809	R_1529	24	87164	87187
R_28	43	1708	1750	R_779	42	41830	41871	R_1530	45	87209	87253
R_29	71	1762	1832	R_780	57	41888	41944	R_1531	21	87261	87281
R_30	37	1841	1877	R_781	25	41964	41988	R_1532	37	87297	87333
R_31	26	1878	1903	R_782	30	42005	42034	R_1533	61	87367	87427
R_32	21	1960	1980	R_783	31	42096	42126	R_1534	69	87595	87663
R_33	20	1982	2001	R_784	30	42141	42170	R_1535	29	87665	87693
R_34	27	2018	2044	R_785	32	42172	42203	R_1536	20	87679	87698
R_35	22	2061	2082	R_786	56	42279	42334	R_1537	20	87760	87779
R_36	24	2196	2219	R_787	63	42336	42398	R_1538	21	87915	87935
R_37	30	2237	2266	R_788	44	42439	42482	R_1539	21	87952	87972
R_38	27	2334	2360	R_789	29	42486	42514	R_1540	20	87962	87981
R_39	22	2362	2383	R_790	30	42518	42547	R_1541	47	88017	88063
R_40	22	2419	2440	R_791	24	42581	42604	R_1542	32	88099	88130
R_41	31	2472	2502	R_792	32	42631	42662	R_1543	33	88133	88165
R_42	21	2506	2526	R_793	24	42681	42704	R_1544	22	88176	88197
R_43	21	2541	2561	R_794	21	42712	42732	R_1545	36	88216	88251
R_44	31	2565	2595	R_795	49	42745	42793	R_1546	35	88279	88313
R_45	21	2598	2618	R_796	35	42841	42875	R_1547	30	88353	88382
R_46	28	2725	2752	R_797	45	42877	42921	R_1548	38	88384	88421
R_47	38	2769	2806	R_798	22	42937	42958	R_1549	37	88439	88475
R_48	59	2915	2973	R_799	20	42969	42988	R_1550	54	88493	88546
R_49	50	2978	3027	R_800	45	42976	43020	R_1551	29	88561	88589
R_50	21	3035	3055	R_801	20	43035	43054	R_1552	21	88594	88614

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_51	24	3072	3095	R_802	72	43047	43118	R_1553	23	88617	88639
R_52	22	3171	3192	R_803	23	43136	43158	R_1554	24	88648	88671
R_53	28	3207	3234	R_804	56	43188	43243	R_1555	30	88678	88707
R_54	25	3236	3260	R_805	20	43239	43258	R_1556	27	88715	88741
R_55	33	3262	3294	R_806	20	43279	43298	R_1557	24	88774	88797
R_56	58	3302	3359	R_807	27	43304	43330	R_1558	48	88820	88867
R_57	21	3364	3384	R_808	30	43346	43375	R_1559	35	88877	88911
R_58	36	3417	3452	R_809	64	43408	43471	R_1560	52	88919	88970
R_59	56	3476	3531	R_810	52	43481	43532	R_1561	26	88978	89003
R_60	20	3533	3552	R_811	22	43538	43559	R_1562	32	89011	89042
R_61	20	3554	3573	R_812	29	43561	43589	R_1563	26	89044	89069
R_62	22	3648	3669	R_813	37	43593	43629	R_1564	51	89100	89150
R_63	21	3681	3701	R_814	24	43637	43660	R_1565	34	89196	89229
R_64	20	3756	3775	R_815	21	43697	43717	R_1566	28	89231	89258
R_65	24	3808	3831	R_816	21	43719	43739	R_1567	24	89261	89284
R_66	35	3833	3867	R_817	34	43772	43805	R_1568	24	89286	89309
R_67	46	3869	3914	R_818	21	43818	43838	R_1569	42	89374	89415
R_68	27	3916	3942	R_819	72	43916	43987	R_1570	24	89430	89453
R_69	21	3956	3976	R_820	23	44002	44024	R_1571	48	89466	89513
R_70	41	4009	4049	R_821	26	44041	44066	R_1572	31	89528	89558
R_71	29	4069	4097	R_822	43	44103	44145	R_1573	46	89563	89608
R_72	37	4117	4153	R_823	44	44167	44210	R_1574	24	89610	89633
R_73	23	4160	4182	R_824	73	44216	44288	R_1575	28	89725	89752
R_74	38	4191	4228	R_825	23	44284	44306	R_1576	25	89754	89778
R_75	24	4263	4286	R_826	38	44298	44335	R_1577	21	89780	89800
R_76	75	4288	4362	R_827	56	44380	44435	R_1578	27	89802	89828

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_77	40	4388	4427	R_828	20	44449	44468	R_1579	38	89833	89870
R_78	46	4429	4474	R_829	50	44463	44512	R_1580	23	89882	89904
R_79	44	4525	4568	R_830	21	44530	44550	R_1581	20	89961	89980
R_80	28	4600	4627	R_831	25	44543	44567	R_1582	35	89982	90016
R_81	38	4646	4683	R_832	38	44552	44589	R_1583	44	90049	90092
R_82	26	4696	4721	R_833	28	44610	44637	R_1584	27	90129	90155
R_83	32	4732	4763	R_834	25	44629	44653	R_1585	21	90264	90284
R_84	35	4787	4821	R_835	45	44651	44695	R_1586	35	90287	90321
R_85	20	4837	4856	R_836	28	44763	44790	R_1587	40	90444	90483
R_86	36	4900	4935	R_837	21	44820	44840	R_1588	73	90558	90630
R_87	27	5033	5059	R_838	32	44857	44888	R_1589	20	90632	90651
R_88	28	5066	5093	R_839	47	44888	44934	R_1590	28	90702	90729
R_89	46	5098	5143	R_840	20	44994	45013	R_1591	35	90771	90805
R_90	24	5145	5168	R_841	21	45032	45052	R_1592	27	90794	90820
R_91	20	5184	5203	R_842	23	45054	45076	R_1593	24	90814	90837
R_92	40	5205	5244	R_843	22	45078	45099	R_1594	30	90827	90856
R_93	28	5246	5273	R_844	38	45129	45166	R_1595	21	90839	90859
R_94	20	5329	5348	R_845	21	45203	45223	R_1596	21	90876	90896
R_95	58	5366	5423	R_846	66	45238	45303	R_1597	26	90901	90926
R_96	41	5425	5465	R_847	33	45304	45336	R_1598	29	90972	91000
R_97	58	5524	5581	R_848	37	45338	45374	R_1599	24	91032	91055
R_98	20	5583	5602	R_849	35	45391	45425	R_1600	42	91057	91098
R_99	30	5635	5664	R_850	24	45526	45549	R_1601	30	91135	91164
R_100	51	5694	5744	R_851	25	45551	45575	R_1602	25	91189	91213
R_101	42	5775	5816	R_852	27	45673	45699	R_1603	26	91247	91272
R_102	53	5838	5890	R_853	69	45708	45776	R_1604	21	91274	91294

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_103	32	5892	5923	R_854	48	45821	45868	R_1605	29	91296	91324
R_104	53	5925	5977	R_855	37	45907	45943	R_1606	20	91396	91415
R_105	28	6001	6028	R_856	42	45987	46028	R_1607	31	91471	91501
R_106	21	6039	6059	R_857	37	46043	46079	R_1608	71	91521	91591
R_107	64	6106	6169	R_858	36	46104	46139	R_1609	48	91667	91714
R_108	65	6176	6240	R_859	30	46146	46175	R_1610	23	91755	91777
R_109	35	6242	6276	R_860	25	46178	46202	R_1611	29	91788	91816
R_110	29	6276	6304	R_861	21	46261	46281	R_1612	32	91858	91889
R_111	38	6306	6343	R_862	50	46304	46353	R_1613	28	91915	91942
R_112	22	6374	6395	R_863	40	46373	46412	R_1614	35	91965	91999
R_113	22	6422	6443	R_864	29	46435	46463	R_1615	29	92052	92080
R_114	28	6464	6491	R_865	27	46465	46491	R_1616	20	92131	92150
R_115	23	6524	6546	R_866	36	46522	46557	R_1617	20	92152	92171
R_116	23	6574	6596	R_867	37	46590	46626	R_1618	32	92181	92212
R_117	54	6615	6668	R_868	22	46663	46684	R_1619	43	92227	92269
R_118	28	6725	6752	R_869	60	46686	46745	R_1620	29	92271	92299
R_119	49	6738	6786	R_870	34	46811	46844	R_1621	98	92306	92403
R_120	25	6788	6812	R_871	28	46845	46872	R_1622	22	92420	92441
R_121	59	6819	6877	R_872	85	46896	46980	R_1623	31	92463	92493
R_122	22	6908	6929	R_873	23	47027	47049	R_1624	23	92495	92517
R_123	26	6931	6956	R_874	69	47051	47119	R_1625	27	92574	92600
R_124	24	6958	6981	R_875	62	47178	47239	R_1626	134	92643	92776
R_125	35	6984	7018	R_876	42	47430	47471	R_1627	57	92793	92849
R_126	32	7020	7051	R_877	20	47473	47492	R_1628	43	92866	92908
R_127	23	7097	7119	R_878	38	47519	47556	R_1629	45	92910	92954
R_128	83	7121	7203	R_879	33	47605	47637	R_1630	26	92956	92981

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_129	21	7205	7225	34	R_880	47652	47685	23	R_1631	92983	93005
R_130	32	7242	7273	33	R_881	47699	47731	46	R_1632	93007	93052
R_131	20	7289	7308	29	R_882	47733	47761	30	R_1633	93022	93051
R_132	21	7376	7396	36	R_883	47769	47804	22	R_1634	93094	93115
R_133	20	7397	7416	22	R_884	47806	47827	21	R_1635	93117	93137
R_134	23	7439	7461	28	R_885	47848	47875	39	R_1636	93139	93177
R_135	23	7463	7485	31	R_886	47999	48029	117	R_1637	93214	93330
R_136	28	7492	7519	36	R_887	48043	48078	37	R_1638	93359	93395
R_137	26	7569	7594	37	R_888	48080	48116	46	R_1639	93409	93454
R_138	38	7622	7659	42	R_889	48118	48159	32	R_1640	93508	93539
R_139	25	7705	7729	78	R_890	48195	48272	28	R_1641	93541	93568
R_140	20	7705	7724	70	R_891	48294	48363	33	R_1642	93570	93602
R_141	28	7774	7801	28	R_892	48377	48404	22	R_1643	93647	93668
R_142	20	7855	7874	20	R_893	48406	48425	26	R_1644	93674	93699
R_143	23	7885	7907	22	R_894	48438	48459	28	R_1645	93716	93743
R_144	35	7933	7967	20	R_895	48485	48504	72	R_1646	93770	93841
R_145	21	7937	7957	23	R_896	48532	48554	36	R_1647	93897	93932
R_146	20	7937	7956	32	R_897	48564	48595	25	R_1648	94007	94031
R_147	23	7948	7970	43	R_898	48627	48669	25	R_1649	94121	94145
R_148	26	7952	7977	32	R_899	48671	48702	20	R_1650	94227	94246
R_149	25	7953	7977	30	R_900	48744	48773	69	R_1651	94295	94363
R_150	30	8009	8038	24	R_901	48782	48805	49	R_1652	94371	94419
R_151	31	8043	8073	21	R_902	48797	48817	40	R_1653	94426	94465
R_152	20	8125	8144	22	R_903	48802	48823	73	R_1654	94478	94550
R_153	21	8146	8166	54	R_904	48808	48861	35	R_1655	94571	94605
R_154	36	8168	8203	38	R_905	48924	48961	63	R_1656	94607	94669

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_155	44	8245	8288	R_906	20	48966	48985	R_1657	41	94788	94828
R_156	29	8324	8352	R_907	25	49010	49034	R_1658	73	94844	94916
R_157	43	8355	8397	R_908	21	49067	49087	R_1659	21	94929	94949
R_158	23	8399	8421	R_909	61	49145	49205	R_1660	21	94979	94999
R_159	26	8457	8482	R_910	81	49207	49287	R_1661	31	95087	95117
R_160	54	8486	8539	R_911	35	49289	49323	R_1662	25	95173	95197
R_161	43	8541	8583	R_912	41	49325	49365	R_1663	23	95244	95266
R_162	26	8585	8610	R_913	99	49400	49498	R_1664	38	95278	95315
R_163	26	8637	8662	R_914	30	49507	49536	R_1665	28	95355	95382
R_164	37	8678	8714	R_915	24	49538	49561	R_1666	95	95390	95484
R_165	24	8742	8765	R_916	23	49563	49585	R_1667	159	95486	95644
R_166	37	8812	8848	R_917	27	49612	49638	R_1668	30	95646	95675
R_167	37	8868	8904	R_918	33	49654	49686	R_1669	101	95695	95795
R_168	21	9015	9035	R_919	37	49697	49733	R_1670	33	95807	95839
R_169	28	9065	9092	R_920	28	49751	49778	R_1671	24	95863	95886
R_170	20	9180	9199	R_921	20	49870	49889	R_1672	22	95888	95909
R_171	23	9191	9213	R_922	42	49890	49931	R_1673	31	95915	95945
R_172	24	9203	9226	R_923	38	49964	50001	R_1674	30	95951	95980
R_173	28	9215	9242	R_924	106	50003	50108	R_1675	28	96033	96060
R_174	21	9244	9264	R_925	29	50110	50138	R_1676	37	96057	96093
R_175	23	9260	9282	R_926	24	50394	50417	R_1677	28	96159	96186
R_176	25	9266	9290	R_927	42	50473	50514	R_1678	40	96287	96326
R_177	23	9266	9288	R_928	27	50578	50604	R_1679	43	96331	96373
R_178	24	9267	9290	R_929	42	50606	50647	R_1680	39	96450	96488
R_179	21	9267	9287	R_930	42	50692	50733	R_1681	30	96492	96521
R_180	22	9267	9288	R_931	20	50763	50782	R_1682	44	96523	96566

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり				始まり	終わり		始まり	終わり
R_181	23	9268	9290	34	R_932	34	50808	50841	22	96589	96610
R_182	21	9270	9290	48	R_933	48	50847	50894	22	96655	96676
R_183	23	9289	9311	55	R_934	55	50955	51009	52	96714	96765
R_184	20	9292	9311	21	R_935	21	51011	51031	23	96776	96798
R_185	22	9330	9351	58	R_936	58	51071	51128	25	96798	96822
R_186	20	9334	9353	85	R_937	85	51138	51222	36	96838	96873
R_187	22	10083	10104	22	R_938	22	51273	51294	44	96895	96938
R_188	23	10092	10114	40	R_939	40	51330	51369	21	96940	96960
R_189	38	10119	10156	20	R_940	20	51343	51362	24	96993	97016
R_190	20	10255	10274	71	R_941	71	51498	51568	24	97038	97061
R_191	21	10257	10277	35	R_942	35	51570	51604	22	97073	97094
R_192	28	10305	10332	20	R_943	20	51639	51658	25	97106	97130
R_193	63	10358	10420	31	R_944	31	51680	51710	20	97132	97151
R_194	28	10498	10525	75	R_945	75	51712	51786	23	97162	97184
R_195	27	10597	10623	57	R_946	57	51788	51844	38	97186	97223
R_196	24	10625	10648	57	R_947	57	51846	51902	32	97225	97256
R_197	56	10666	10721	33	R_948	33	51928	51960	41	97258	97298
R_198	27	10741	10767	33	R_949	33	51962	51994	34	97300	97333
R_199	21	10777	10797	20	R_950	20	52012	52031	20	97342	97361
R_200	38	10799	10836	52	R_951	52	52024	52075	21	97486	97506
R_201	30	10840	10869	20	R_952	20	52183	52202	24	97532	97555
R_202	24	10871	10894	31	R_953	31	52316	52346	20	97592	97611
R_203	30	10911	10940	54	R_954	54	52348	52401	21	97606	97626
R_204	49	10942	10990	24	R_955	24	52408	52431	20	97690	97709
R_205	21	10992	11012	25	R_956	25	52433	52457	43	97694	97736
R_206	69	11018	11086	68	R_957	68	52452	52519	26	97740	97765

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_207	30	11089	11118	R_958	42	52521	52562	R_1709	28	97767	97794
R_208	42	11127	11168	R_959	41	52569	52609	R_1710	64	97820	97883
R_209	25	11193	11217	R_960	21	52626	52646	R_1711	32	97928	97959
R_210	68	11279	11346	R_961	21	52676	52696	R_1712	40	98008	98047
R_211	42	11367	11408	R_962	71	52704	52774	R_1713	49	98103	98151
R_212	43	11410	11452	R_963	31	52784	52814	R_1714	33	98166	98198
R_213	54	11458	11511	R_964	22	52826	52847	R_1715	26	98200	98225
R_214	79	11556	11634	R_965	25	52874	52898	R_1716	32	98324	98355
R_215	37	11648	11684	R_966	80	52915	52994	R_1717	21	98333	98353
R_216	31	11691	11721	R_967	21	53027	53047	R_1718	21	98467	98487
R_217	28	11724	11751	R_968	44	53130	53173	R_1719	22	98506	98527
R_218	81	11800	11880	R_969	21	53175	53195	R_1720	31	98577	98607
R_219	20	11905	11924	R_970	24	53181	53204	R_1721	32	98681	98712
R_220	21	11928	11948	R_971	22	53233	53254	R_1722	23	98751	98773
R_221	50	11950	11999	R_972	20	53262	53281	R_1723	37	98789	98825
R_222	20	12030	12049	R_973	22	53315	53336	R_1724	37	98930	98966
R_223	61	12051	12111	R_974	20	53352	53371	R_1725	40	98969	99008
R_224	23	12147	12169	R_975	72	53390	53461	R_1726	21	99015	99035
R_225	25	12171	12195	R_976	42	53473	53514	R_1727	45	99231	99275
R_226	23	12197	12219	R_977	25	53534	53558	R_1728	38	99345	99382
R_227	45	12221	12265	R_978	30	53560	53589	R_1729	46	99387	99432
R_228	43	12304	12346	R_979	23	53600	53622	R_1730	25	99434	99458
R_229	51	12353	12403	R_980	28	53637	53664	R_1731	21	99515	99535
R_230	23	12405	12427	R_981	24	53696	53719	R_1732	23	99565	99587
R_231	62	12475	12536	R_982	21	53738	53758	R_1733	21	99658	99678
R_232	28	12538	12565	R_983	22	53753	53774	R_1734	43	99718	99760

10

20

30

40

50

【表 4 - 10】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_233	28	12587	12614	R_984	23	53759	53781	R_1735	30	99762	99791
R_234	21	12615	12635	R_985	30	53793	53822	R_1736	62	99820	99881
R_235	29	12637	12665	R_986	23	53895	53917	R_1737	21	99933	99953
R_236	38	12684	12721	R_987	25	53910	53934	R_1738	26	99986	100011
R_237	34	12746	12779	R_988	21	53979	53999	R_1739	29	100013	100041
R_238	20	12799	12818	R_989	20	53996	54015	R_1740	71	100063	100133
R_239	33	12822	12854	R_990	21	54027	54047	R_1741	32	100169	100200
R_240	37	12856	12892	R_991	28	54049	54076	R_1742	21	100248	100268
R_241	20	12894	12913	R_992	40	54162	54201	R_1743	30	100263	100292
R_242	23	12933	12955	R_993	20	54218	54237	R_1744	38	100296	100333
R_243	50	13057	13106	R_994	77	54239	54315	R_1745	22	100359	100380
R_244	37	13133	13169	R_995	50	54317	54366	R_1746	23	100375	100397
R_245	51	13227	13277	R_996	21	54368	54388	R_1747	23	100384	100406
R_246	22	13348	13369	R_997	32	54406	54437	R_1748	24	100639	100662
R_247	29	13380	13408	R_998	33	54439	54471	R_1749	24	100645	100668
R_248	41	13410	13450	R_999	20	54507	54526	R_1750	20	100666	100685
R_249	32	13452	13483	R_1000	55	54528	54582	R_1751	23	100695	100717
R_250	45	13483	13527	R_1001	21	54584	54604	R_1752	20	100746	100765
R_251	32	13529	13560	R_1002	42	54606	54647	R_1753	34	100771	100804
R_252	21	13569	13589	R_1003	118	54651	54768	R_1754	21	100801	100821
R_253	50	13591	13640	R_1004	23	54833	54855	R_1755	26	100823	100848
R_254	88	13770	13857	R_1005	28	54857	54884	R_1756	20	100857	100876
R_255	20	13861	13880	R_1006	57	54887	54943	R_1757	34	100899	100932
R_256	32	13882	13913	R_1007	29	54973	55001	R_1758	21	100965	100985
R_257	55	13936	13990	R_1008	21	55014	55034	R_1759	32	101017	101048
R_258	39	13992	14030	R_1009	28	55074	55101	R_1760	21	101085	101105

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_259	34	14033	14066	R_1010	21	55134	55154	R_1761	26	101195	101220
R_260	35	14068	14102	R_1011	38	55171	55208	R_1762	23	101227	101249
R_261	27	14104	14130	R_1012	31	55210	55240	R_1763	30	101324	101353
R_262	20	14140	14159	R_1013	80	55248	55327	R_1764	20	101357	101376
R_263	51	14180	14230	R_1014	25	55329	55353	R_1765	21	101415	101435
R_264	20	14232	14251	R_1015	23	55365	55387	R_1766	20	101444	101463
R_265	107	14253	14359	R_1016	43	55424	55466	R_1767	37	101465	101501
R_266	72	14367	14438	R_1017	51	55539	55589	R_1768	25	101497	101521
R_267	69	14503	14571	R_1018	27	55591	55617	R_1769	42	101523	101564
R_268	27	14595	14621	R_1019	29	55619	55647	R_1770	26	101576	101601
R_269	35	14629	14663	R_1020	30	55653	55682	R_1771	34	101620	101653
R_270	58	14732	14789	R_1021	29	55724	55752	R_1772	36	101679	101714
R_271	25	14805	14829	R_1022	33	55778	55810	R_1773	39	101734	101772
R_272	56	14851	14906	R_1023	76	55848	55923	R_1774	24	101779	101802
R_273	53	14954	15006	R_1024	33	55992	56024	R_1775	71	101817	101887
R_274	39	15026	15064	R_1025	29	56026	56054	R_1776	67	101913	101979
R_275	21	15066	15086	R_1026	59	56080	56138	R_1777	28	101989	102016
R_276	22	15138	15159	R_1027	26	56155	56180	R_1778	28	102025	102052
R_277	107	15157	15263	R_1028	22	56196	56217	R_1779	33	102054	102086
R_278	24	15249	15272	R_1029	21	56225	56245	R_1780	23	102088	102110
R_279	22	15277	15298	R_1030	31	56274	56304	R_1781	44	102112	102155
R_280	38	15300	15337	R_1031	24	56338	56361	R_1782	22	102161	102182
R_281	24	15414	15437	R_1032	22	56410	56431	R_1783	65	102202	102266
R_282	21	15476	15496	R_1033	36	56433	56468	R_1784	23	102268	102290
R_283	23	15617	15639	R_1034	22	56521	56542	R_1785	35	102292	102326
R_284	58	15671	15728	R_1035	30	56567	56596	R_1786	32	102352	102383

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_285	36	15730	15765	R_1036	55	56641	56695	R_1787	29	102385	102413
R_286	29	15840	15868	R_1037	44	56697	56740	R_1788	29	102526	102554
R_287	27	15870	15896	R_1038	43	56761	56803	R_1789	77	102579	102655
R_288	50	15926	15975	R_1039	72	56805	56876	R_1790	39	102744	102782
R_289	27	16008	16034	R_1040	30	56885	56914	R_1791	32	102841	102872
R_290	46	16109	16154	R_1041	44	56916	56959	R_1792	22	103017	103038
R_291	27	16159	16185	R_1042	67	56961	57027	R_1793	20	103118	103137
R_292	30	16245	16274	R_1043	30	57033	57062	R_1794	20	103196	103215
R_293	44	16296	16339	R_1044	20	57167	57186	R_1795	23	103346	103368
R_294	20	16316	16335	R_1045	49	57211	57259	R_1796	24	103400	103423
R_295	48	16371	16418	R_1046	24	57348	57371	R_1797	27	103456	103482
R_296	36	16447	16482	R_1047	43	57434	57476	R_1798	54	103494	103547
R_297	36	16485	16520	R_1048	73	57536	57608	R_1799	21	103557	103577
R_298	26	16532	16557	R_1049	86	57641	57726	R_1800	34	103637	103670
R_299	21	16582	16602	R_1050	27	57754	57780	R_1801	58	103683	103740
R_300	83	16604	16686	R_1051	20	57786	57805	R_1802	25	103782	103806
R_301	63	16688	16750	R_1052	21	57807	57827	R_1803	20	103851	103870
R_302	75	16766	16840	R_1053	27	57829	57855	R_1804	26	103876	103901
R_303	24	16918	16941	R_1054	41	57857	57897	R_1805	21	103997	104017
R_304	32	16947	16978	R_1055	51	57899	57949	R_1806	49	104093	104141
R_305	31	17007	17037	R_1056	26	57981	58006	R_1807	61	104143	104203
R_306	45	17039	17083	R_1057	48	58008	58055	R_1808	28	104263	104290
R_307	25	17085	17109	R_1058	26	58057	58082	R_1809	22	104331	104352
R_308	30	17111	17140	R_1059	32	58097	58128	R_1810	24	104354	104377
R_309	29	17179	17207	R_1060	40	58138	58177	R_1811	36	104379	104414
R_310	34	17292	17325	R_1061	38	58192	58229	R_1812	72	104416	104487

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_311	28	17292	17319	R_1062	26	58235	58260	R_1813	23	104504	104526
R_312	28	17309	17336	R_1063	57	58375	58431	R_1814	54	104544	104597
R_313	21	17316	17336	R_1064	25	58444	58468	R_1815	20	104599	104618
R_314	21	17319	17339	R_1065	55	58484	58538	R_1816	22	104632	104653
R_315	22	17326	17347	R_1066	26	58555	58580	R_1817	25	104710	104734
R_316	52	17349	17400	R_1067	20	58582	58601	R_1818	22	104738	104759
R_317	20	17416	17435	R_1068	23	58604	58626	R_1819	40	104783	104822
R_318	39	17445	17483	R_1069	32	58650	58681	R_1820	42	104824	104865
R_319	43	17485	17527	R_1070	70	58740	58809	R_1821	21	104919	104939
R_320	74	17587	17660	R_1071	32	58889	58920	R_1822	23	105014	105036
R_321	38	17667	17704	R_1072	25	58927	58951	R_1823	58	105040	105097
R_322	25	17706	17730	R_1073	22	58953	58974	R_1824	25	105111	105135
R_323	45	17796	17840	R_1074	35	58993	59027	R_1825	50	105137	105186
R_324	53	17855	17907	R_1075	48	59029	59076	R_1826	22	105188	105209
R_325	44	17909	17952	R_1076	45	59079	59123	R_1827	40	105283	105322
R_326	20	17954	17973	R_1077	31	59125	59155	R_1828	31	105393	105423
R_327	34	17975	18008	R_1078	31	59183	59213	R_1829	29	105427	105455
R_328	20	18010	18029	R_1079	20	59243	59262	R_1830	72	105457	105528
R_329	46	18031	18076	R_1080	35	59264	59298	R_1831	30	105544	105573
R_330	26	18078	18103	R_1081	24	59303	59326	R_1832	39	105683	105721
R_331	29	18136	18164	R_1082	39	59328	59366	R_1833	36	105732	105767
R_332	33	18208	18240	R_1083	31	59380	59410	R_1834	23	106011	106033
R_333	54	18261	18314	R_1084	20	59490	59509	R_1835	45	106334	106378
R_334	22	18333	18354	R_1085	39	59551	59589	R_1836	21	106380	106400
R_335	34	18410	18443	R_1086	76	59591	59666	R_1837	23	106407	106429
R_336	27	18446	18472	R_1087	46	59713	59758	R_1838	23	106475	106497

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_337	86	18474	18559	R_1088	26	59837	59862	R_1839	47	106562	106608
R_338	25	18590	18614	R_1089	40	59878	59917	R_1840	42	106645	106686
R_339	21	18627	18647	R_1090	23	59957	59979	R_1841	44	106677	106720
R_340	37	18650	18686	R_1091	37	59998	60034	R_1842	29	106677	106705
R_341	33	18688	18720	R_1092	63	60133	60195	R_1843	22	106728	106749
R_342	30	18742	18771	R_1093	22	60201	60222	R_1844	40	106783	106822
R_343	20	18773	18792	R_1094	23	60281	60303	R_1845	22	106824	106845
R_344	32	18782	18813	R_1095	37	60291	60327	R_1846	31	106847	106877
R_345	20	18843	18862	R_1096	27	60360	60386	R_1847	31	106879	106909
R_346	24	18864	18887	R_1097	23	60429	60451	R_1848	64	106923	106986
R_347	24	18900	18923	R_1098	52	60536	60587	R_1849	35	106988	107022
R_348	35	18935	18969	R_1099	24	60605	60628	R_1850	35	107046	107080
R_349	38	18971	19008	R_1100	28	60656	60683	R_1851	26	107085	107110
R_350	23	19080	19102	R_1101	90	60703	60792	R_1852	25	107122	107146
R_351	51	19106	19156	R_1102	48	60794	60841	R_1853	40	107239	107278
R_352	21	19158	19178	R_1103	49	60841	60889	R_1854	57	107338	107394
R_353	25	19262	19286	R_1104	31	60921	60951	R_1855	36	107405	107440
R_354	22	19310	19331	R_1105	21	60953	60973	R_1856	22	107442	107463
R_355	28	19333	19360	R_1106	30	60979	61008	R_1857	22	107465	107486
R_356	24	19362	19385	R_1107	23	61040	61062	R_1858	22	107506	107527
R_357	44	19394	19437	R_1108	20	61117	61136	R_1859	28	107553	107580
R_358	47	19493	19539	R_1109	22	61148	61169	R_1860	53	107582	107634
R_359	26	19569	19594	R_1110	106	61165	61270	R_1861	37	107639	107675
R_360	34	19624	19657	R_1111	21	61274	61294	R_1862	34	107679	107712
R_361	38	19659	19696	R_1112	25	61392	61416	R_1863	36	107775	107810
R_362	32	19713	19744	R_1113	22	61447	61468	R_1864	25	107868	107892

10

20

30

40

50

【表 4 - 15】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_363	56	19746	19801	R_1114	25	61486	61510	R_1865	24	107893	107916
R_364	43	19839	19881	R_1115	23	61495	61517	R_1866	24	108016	108039
R_365	24	19894	19917	R_1116	27	61518	61544	R_1867	42	108071	108112
R_366	24	19960	19983	R_1117	23	61586	61608	R_1868	21	108176	108196
R_367	21	19985	20005	R_1118	32	61646	61677	R_1869	30	108213	108242
R_368	30	20006	20035	R_1119	34	61784	61817	R_1870	72	108263	108334
R_369	21	20037	20057	R_1120	23	61870	61892	R_1871	32	108390	108421
R_370	20	20069	20088	R_1121	43	61904	61946	R_1872	27	108441	108467
R_371	20	20151	20170	R_1122	22	61948	61969	R_1873	31	108479	108509
R_372	25	20182	20206	R_1123	33	61997	62029	R_1874	21	108524	108544
R_373	22	20237	20258	R_1124	21	62076	62096	R_1875	58	108546	108603
R_374	22	20267	20288	R_1125	22	62103	62124	R_1876	33	108669	108701
R_375	27	20363	20389	R_1126	20	62133	62152	R_1877	26	108721	108746
R_376	25	20375	20399	R_1127	26	62162	62187	R_1878	30	108822	108851
R_377	21	20482	20502	R_1128	20	62239	62258	R_1879	32	108859	108890
R_378	27	20485	20511	R_1129	24	62243	62266	R_1880	30	108909	108938
R_379	22	20497	20518	R_1130	20	62266	62285	R_1881	41	108996	109036
R_380	24	20566	20589	R_1131	24	62307	62330	R_1882	43	109038	109080
R_381	22	20591	20612	R_1132	27	62332	62358	R_1883	22	109104	109125
R_382	20	20610	20629	R_1133	22	62433	62454	R_1884	41	109145	109185
R_383	22	20679	20700	R_1134	22	62561	62582	R_1885	25	109237	109261
R_384	28	20702	20729	R_1135	50	62600	62649	R_1886	41	109263	109303
R_385	35	20741	20775	R_1136	29	62678	62706	R_1887	34	109306	109339
R_386	43	20790	20832	R_1137	32	62708	62739	R_1888	48	109355	109402
R_387	35	20880	20914	R_1138	20	62846	62865	R_1889	20	109404	109423
R_388	22	20892	20913	R_1139	46	62871	62916	R_1890	28	109425	109452

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 6】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_389	21	21011	21031	R_1140	23	62945	62967	R_1891	31	109454	109484
R_390	26	21138	21163	R_1141	52	62978	63029	R_1892	20	109494	109513
R_391	20	21158	21177	R_1142	43	63043	63085	R_1893	25	109519	109543
R_392	24	21248	21271	R_1143	31	63087	63117	R_1894	60	109554	109613
R_393	26	21324	21349	R_1144	35	63119	63153	R_1895	34	109631	109664
R_394	35	21351	21385	R_1145	31	63155	63185	R_1896	26	109666	109691
R_395	29	21441	21469	R_1146	54	63193	63246	R_1897	22	109693	109714
R_396	53	21557	21609	R_1147	23	63249	63271	R_1898	23	109757	109779
R_397	31	21611	21641	R_1148	29	63362	63390	R_1899	34	109822	109855
R_398	38	21645	21682	R_1149	33	63404	63436	R_1900	23	109866	109888
R_399	40	21743	21782	R_1150	33	63462	63494	R_1901	140	109935	110074
R_400	59	21819	21877	R_1151	27	63501	63527	R_1902	20	110077	110096
R_401	20	21949	21968	R_1152	29	63569	63597	R_1903	29	110137	110165
R_402	27	22001	22027	R_1153	36	63599	63634	R_1904	29	110216	110244
R_403	63	22041	22103	R_1154	20	63634	63653	R_1905	32	110254	110285
R_404	53	22125	22177	R_1155	46	63769	63814	R_1906	33	110294	110326
R_405	48	22179	22226	R_1156	20	63826	63845	R_1907	31	110328	110358
R_406	20	22247	22266	R_1157	24	63848	63871	R_1908	44	110383	110426
R_407	48	22277	22324	R_1158	54	63873	63926	R_1909	24	110421	110444
R_408	31	22334	22364	R_1159	48	63941	63988	R_1910	20	110563	110582
R_409	105	22370	22474	R_1160	45	63990	64034	R_1911	32	110584	110615
R_410	37	22475	22511	R_1161	20	64059	64078	R_1912	28	110598	110625
R_411	32	22644	22675	R_1162	20	64322	64341	R_1913	54	110612	110665
R_412	34	22686	22719	R_1163	20	64382	64401	R_1914	29	110781	110809
R_413	28	22763	22790	R_1164	24	64487	64510	R_1915	51	110823	110873
R_414	34	22792	22825	R_1165	34	64532	64565	R_1916	22	110875	110896

10

20

30

40

50

【表 4 - 17】

領域	長さ (n t)	配列番号1における位置		領域	長さ (n t)	配列番号1における位置		領域	長さ (n t)	配列番号1における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_415	22	22844	22865	R_1166	27	64550	64576	R_1917	27	110899	110925
R_416	23	22875	22897	R_1167	24	65195	65218	R_1918	25	110992	111016
R_417	27	22959	22985	R_1168	20	65195	65214	R_1919	38	111036	111073
R_418	22	22990	23011	R_1169	28	65736	65763	R_1920	26	111108	111133
R_419	23	23019	23041	R_1170	30	65810	65839	R_1921	20	111141	111160
R_420	49	23066	23114	R_1171	26	65850	65875	R_1922	21	111162	111182
R_421	35	23131	23165	R_1172	32	65877	65908	R_1923	35	111184	111218
R_422	22	23168	23189	R_1173	29	65917	65945	R_1924	22	111234	111255
R_423	46	23191	23236	R_1174	55	66048	66102	R_1925	20	111298	111317
R_424	45	23238	23282	R_1175	41	66123	66163	R_1926	26	111319	111344
R_425	23	23318	23340	R_1176	37	66165	66201	R_1927	61	111403	111463
R_426	21	23497	23517	R_1177	66	66203	66268	R_1928	57	111467	111523
R_427	24	23518	23541	R_1178	49	66291	66339	R_1929	23	111525	111547
R_428	22	23562	23583	R_1179	34	66392	66425	R_1930	24	111567	111590
R_429	26	23585	23610	R_1180	45	66469	66513	R_1931	26	111592	111617
R_430	46	23626	23671	R_1181	23	66545	66567	R_1932	24	111631	111654
R_431	34	23637	23670	R_1182	27	66591	66617	R_1933	22	111666	111687
R_432	21	23650	23670	R_1183	24	66635	66658	R_1934	21	111692	111712
R_433	28	23718	23745	R_1184	22	66660	66681	R_1935	49	111732	111780
R_434	87	23748	23834	R_1185	49	66690	66738	R_1936	31	111815	111845
R_435	41	23836	23876	R_1186	29	66755	66783	R_1937	21	111908	111928
R_436	30	23889	23918	R_1187	36	66789	66824	R_1938	39	111934	111972
R_437	83	23975	24057	R_1188	23	66792	66814	R_1939	26	111974	111999
R_438	99	24059	24157	R_1189	23	66865	66887	R_1940	58	112001	112058
R_439	37	24219	24255	R_1190	27	66889	66915	R_1941	28	112064	112091
R_440	33	24319	24351	R_1191	48	66991	67038	R_1942	24	112066	112089

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 8】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_441	20	24342	24361	R_1192	24	67116	67139	R_1943	21	112122	112142
R_442	71	24354	24424	R_1193	24	67155	67178	R_1944	24	112157	112180
R_443	28	24447	24474	R_1194	27	67185	67211	R_1945	21	112221	112241
R_444	21	24515	24535	R_1195	35	67231	67265	R_1946	26	112253	112278
R_445	31	24536	24566	R_1196	20	67316	67335	R_1947	23	112428	112450
R_446	20	24552	24571	R_1197	23	67337	67359	R_1948	26	112444	112469
R_447	26	24592	24617	R_1198	31	67361	67391	R_1949	30	112501	112530
R_448	26	24656	24681	R_1199	37	67467	67503	R_1950	20	112511	112530
R_449	25	24716	24740	R_1200	27	67498	67524	R_1951	69	112757	112825
R_450	20	24721	24740	R_1201	23	67499	67521	R_1952	20	112884	112903
R_451	57	24817	24873	R_1202	37	67517	67553	R_1953	44	112905	112948
R_452	41	24903	24943	R_1203	26	67604	67629	R_1954	28	112979	113006
R_453	26	24958	24983	R_1204	25	67624	67648	R_1955	62	113062	113123
R_454	20	24985	25004	R_1205	26	67708	67733	R_1956	36	113141	113176
R_455	48	25014	25061	R_1206	21	67806	67826	R_1957	23	113172	113194
R_456	55	25122	25176	R_1207	27	67877	67903	R_1958	26	113203	113228
R_457	29	25178	25206	R_1208	43	67905	67947	R_1959	37	113277	113313
R_458	25	25249	25273	R_1209	36	67987	68022	R_1960	32	113364	113395
R_459	30	25279	25308	R_1210	50	68024	68073	R_1961	43	113397	113439
R_460	40	25310	25349	R_1211	92	68092	68183	R_1962	118	113452	113569
R_461	53	25369	25421	R_1212	24	68216	68239	R_1963	46	113572	113617
R_462	52	25427	25478	R_1213	52	68257	68308	R_1964	21	113628	113648
R_463	66	25514	25579	R_1214	32	68390	68421	R_1965	21	113662	113682
R_464	21	25618	25638	R_1215	48	68442	68489	R_1966	36	113690	113725
R_465	51	25679	25729	R_1216	20	68486	68505	R_1967	32	113729	113760
R_466	39	25731	25769	R_1217	21	68546	68566	R_1968	28	113782	113809

10

20

30

40

50

【表 4 - 19】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_467	28	25825	25852	R_1218	25	68556	68580	R_1969	21	113997	114017
R_468	72	25881	25952	R_1219	20	68561	68580	R_1970	22	114007	114028
R_469	23	25964	25986	R_1220	23	68610	68632	R_1971	57	114039	114095
R_470	59	25988	26046	R_1221	25	68679	68703	R_1972	32	114174	114205
R_471	25	26061	26085	R_1222	35	68736	68770	R_1973	28	114235	114262
R_472	34	26088	26121	R_1223	62	68806	68867	R_1974	21	114349	114369
R_473	24	26162	26185	R_1224	22	68885	68906	R_1975	38	114395	114432
R_474	30	26194	26223	R_1225	22	68908	68929	R_1976	31	114434	114464
R_475	28	26233	26260	R_1226	20	68931	68950	R_1977	20	114529	114548
R_476	38	26335	26372	R_1227	29	68950	68978	R_1978	34	114624	114657
R_477	24	26395	26418	R_1228	34	69017	69050	R_1979	65	114711	114775
R_478	24	26455	26478	R_1229	25	69053	69077	R_1980	22	114904	114925
R_479	27	26480	26506	R_1230	20	69083	69102	R_1981	42	114930	114971
R_480	42	26521	26562	R_1231	27	69123	69149	R_1982	22	114982	115003
R_481	67	26684	26750	R_1232	30	69160	69189	R_1983	20	115005	115024
R_482	24	26752	26775	R_1233	35	69210	69244	R_1984	42	115026	115067
R_483	35	26822	26856	R_1234	53	69248	69300	R_1985	28	115092	115119
R_484	22	26937	26958	R_1235	23	69304	69326	R_1986	57	115121	115177
R_485	38	26984	27021	R_1236	34	69393	69426	R_1987	28	115179	115206
R_486	24	27022	27045	R_1237	29	69428	69456	R_1988	31	115228	115258
R_487	54	27053	27106	R_1238	45	69458	69502	R_1989	24	115263	115286
R_488	91	27154	27244	R_1239	43	69547	69589	R_1990	37	115306	115342
R_489	35	27283	27317	R_1240	20	69601	69620	R_1991	44	115361	115404
R_490	25	27339	27363	R_1241	20	69633	69652	R_1992	20	115467	115486
R_491	75	27386	27460	R_1242	29	69656	69684	R_1993	30	115628	115657
R_492	41	27493	27533	R_1243	39	69705	69743	R_1994	26	115665	115690

10

20

30

40

50

【表 4 - 20】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_493	22	27602	27623	R_1244	42	69769	69810	R_1995	34	115687	115720
R_494	33	27631	27663	R_1245	22	69829	69850	R_1996	28	115804	115831
R_495	23	27691	27713	R_1246	28	69912	69939	R_1997	26	115833	115858
R_496	33	27736	27768	R_1247	32	69941	69972	R_1998	27	115937	115963
R_497	24	27752	27775	R_1248	31	70029	70059	R_1999	119	115965	116083
R_498	26	27777	27802	R_1249	41	70065	70105	R_2000	23	116085	116107
R_499	20	27777	27796	R_1250	27	70162	70188	R_2001	42	116121	116162
R_500	23	27778	27800	R_1251	43	70200	70242	R_2002	33	116193	116225
R_501	30	27859	27888	R_1252	20	70217	70236	R_2003	24	116276	116299
R_502	38	27909	27946	R_1253	20	70345	70364	R_2004	26	116356	116381
R_503	49	27956	28004	R_1254	35	70366	70400	R_2005	29	116405	116433
R_504	45	28071	28115	R_1255	57	70433	70489	R_2006	46	116441	116486
R_505	33	28124	28156	R_1256	21	70515	70535	R_2007	29	116488	116516
R_506	20	28152	28171	R_1257	26	70537	70562	R_2008	40	116518	116557
R_507	24	28181	28204	R_1258	40	70583	70622	R_2009	46	116653	116698
R_508	25	28251	28275	R_1259	20	70657	70676	R_2010	28	116700	116727
R_509	33	28295	28327	R_1260	22	70688	70709	R_2011	46	116729	116774
R_510	28	28345	28372	R_1261	34	70723	70756	R_2012	43	116927	116969
R_511	51	28383	28433	R_1262	23	70758	70780	R_2013	32	116997	117028
R_512	38	28441	28478	R_1263	21	70782	70802	R_2014	23	117043	117065
R_513	24	28553	28576	R_1264	21	70808	70828	R_2015	35	117068	117102
R_514	37	28598	28634	R_1265	26	70818	70843	R_2016	28	117148	117175
R_515	35	28669	28703	R_1266	31	70912	70942	R_2017	36	117195	117230
R_516	23	28733	28755	R_1267	22	71039	71060	R_2018	20	117243	117262
R_517	31	28758	28788	R_1268	25	71104	71128	R_2019	37	117273	117309
R_518	21	28857	28877	R_1269	24	71195	71218	R_2020	32	117329	117360

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 1】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_519	38	28922	28959	R_1270	43	71467	71509	R_2021	59	117432	117490
R_520	58	29019	29076	R_1271	36	71519	71554	R_2022	21	117509	117529
R_521	22	29115	29136	R_1272	24	71560	71583	R_2023	23	117557	117579
R_522	66	29198	29263	R_1273	30	71606	71635	R_2024	65	117580	117644
R_523	24	29297	29320	R_1274	21	71637	71657	R_2025	27	117646	117672
R_524	41	29335	29375	R_1275	22	71672	71693	R_2026	22	117708	117729
R_525	21	29386	29406	R_1276	56	71744	71799	R_2027	47	117730	117776
R_526	22	29433	29454	R_1277	35	71827	71861	R_2028	37	117778	117814
R_527	40	29473	29512	R_1278	21	71863	71883	R_2029	24	117881	117904
R_528	29	29531	29559	R_1279	32	71913	71944	R_2030	40	117904	117943
R_529	41	29586	29626	R_1280	25	71946	71970	R_2031	30	117945	117974
R_530	29	29635	29663	R_1281	23	72022	72044	R_2032	28	117993	118020
R_531	36	29665	29700	R_1282	28	72092	72119	R_2033	48	118064	118111
R_532	93	29750	29842	R_1283	22	72095	72116	R_2034	27	118113	118139
R_533	35	29853	29887	R_1284	21	72121	72141	R_2035	27	118141	118167
R_534	22	29907	29928	R_1285	50	72147	72196	R_2036	29	118169	118197
R_535	77	29964	30040	R_1286	31	72204	72234	R_2037	33	118210	118242
R_536	38	30093	30130	R_1287	23	72230	72252	R_2038	45	118386	118430
R_537	30	30169	30198	R_1288	36	72236	72271	R_2039	48	118446	118493
R_538	32	30210	30241	R_1289	31	72285	72315	R_2040	24	118532	118555
R_539	20	30243	30262	R_1290	85	72314	72398	R_2041	46	118634	118679
R_540	20	30303	30322	R_1291	52	72400	72451	R_2042	44	118774	118817
R_541	23	30324	30346	R_1292	37	72443	72479	R_2043	54	118841	118894
R_542	27	30362	30388	R_1293	31	72482	72512	R_2044	20	118912	118931
R_543	30	30390	30419	R_1294	40	72566	72605	R_2045	21	118999	119019
R_544	31	30462	30492	R_1295	49	72607	72655	R_2046	44	119283	119326

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 2】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_545	22	30534	30555	86	R_1296	72657	72742	33	R_2047	119353	119385
R_546	28	30557	30584	63	R_1297	72752	72814	39	R_2048	119392	119430
R_547	24	30596	30619	125	R_1298	72816	72940	65	R_2049	119441	119505
R_548	30	30626	30655	31	R_1299	72955	72985	21	R_2050	119566	119586
R_549	41	30675	30715	20	R_1300	72987	73006	55	R_2051	119604	119658
R_550	33	30726	30758	40	R_1301	73008	73047	24	R_2052	119660	119683
R_551	29	30787	30815	24	R_1302	73049	73072	42	R_2053	119685	119726
R_552	62	30819	30880	37	R_1303	73118	73154	33	R_2054	119736	119768
R_553	79	30972	31050	26	R_1304	73163	73188	32	R_2055	119770	119801
R_554	67	31053	31119	29	R_1305	73212	73240	34	R_2056	119804	119837
R_555	56	31121	31176	22	R_1306	73279	73300	116	R_2057	119885	120000
R_556	22	31178	31199	22	R_1307	73315	73336	59	R_2058	120128	120186
R_557	22	31207	31228	30	R_1308	73338	73367	34	R_2059	120317	120350
R_558	27	31227	31253	23	R_1309	73387	73409	24	R_2060	120530	120553
R_559	27	31255	31281	52	R_1310	73411	73462	22	R_2061	120571	120592
R_560	58	31310	31367	26	R_1311	73498	73523	35	R_2062	120611	120645
R_561	26	31383	31408	24	R_1312	73525	73548	98	R_2063	120663	120760
R_562	20	31419	31438	83	R_1313	73562	73644	20	R_2064	120924	120943
R_563	36	31440	31475	36	R_1314	73646	73681	22	R_2065	121093	121114
R_564	26	31503	31528	20	R_1315	73703	73722	29	R_2066	121117	121145
R_565	34	31530	31563	27	R_1316	73725	73751	39	R_2067	121244	121282
R_566	23	31585	31607	62	R_1317	73776	73837	48	R_2068	121365	121412
R_567	21	31611	31631	20	R_1318	73845	73864	37	R_2069	121414	121450
R_568	21	31614	31634	61	R_1319	73894	73954	25	R_2070	121649	121673
R_569	32	31675	31706	91	R_1320	73955	74045	40	R_2071	121687	121726
R_570	23	31708	31730	32	R_1321	74079	74110	45	R_2072	121728	121772

10

20

30

40

50

【表 4 - 23】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり		始まり	終わり
R_571	39	31737	31775	R_1322	R_1322	74115	74142	R_2073	22	121795
R_572	68	31763	31830	R_1323	R_1323	74144	74205	R_2074	24	121939
R_573	27	31763	31789	R_1324	R_1324	74214	74240	R_2075	28	122038
R_574	20	31803	31822	R_1325	R_1325	74244	74305	R_2076	30	122218
R_575	23	31832	31854	R_1326	R_1326	74320	74347	R_2077	27	122273
R_576	50	31952	32001	R_1327	R_1327	74350	74373	R_2078	21	122301
R_577	22	32110	32131	R_1328	R_1328	74386	74431	R_2079	30	122318
R_578	20	32114	32133	R_1329	R_1329	74433	74455	R_2080	32	122356
R_579	35	32143	32177	R_1330	R_1330	74463	74493	R_2081	21	122428
R_580	45	32179	32223	R_1331	R_1331	74497	74544	R_2082	21	122432
R_581	26	32208	32233	R_1332	R_1332	74546	74585	R_2083	24	123020
R_582	49	32225	32273	R_1333	R_1333	74604	74623	R_2084	30	123038
R_583	27	32289	32315	R_1334	R_1334	74648	74712	R_2085	26	123052
R_584	34	32317	32350	R_1335	R_1335	74725	74753	R_2086	22	123258
R_585	32	32352	32383	R_1336	R_1336	74764	74798	R_2087	28	123291
R_586	25	32390	32414	R_1337	R_1337	74805	74861	R_2088	22	123402
R_587	46	32416	32461	R_1338	R_1338	74863	74918	R_2089	27	123644
R_588	37	32497	32533	R_1339	R_1339	74936	74972	R_2090	20	123819
R_589	37	32691	32727	R_1340	R_1340	74974	75001	R_2091	26	123841
R_590	23	32753	32775	R_1341	R_1341	75003	75055	R_2092	25	123965
R_591	38	32794	32831	R_1342	R_1342	75019	75040	R_2093	24	123997
R_592	24	32835	32858	R_1343	R_1343	75097	75126	R_2094	35	124034
R_593	55	32890	32944	R_1344	R_1344	75126	75176	R_2095	44	124075
R_594	52	32959	33010	R_1345	R_1345	75362	75389	R_2096	50	124156
R_595	37	33025	33061	R_1346	R_1346	75417	75445	R_2097	75	124247
R_596	23	33063	33085	R_1347	R_1347	75482	75535	R_2098	23	124353

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 4】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり		始まり	終わり
R_597	62	33087	33148	R_1348	R_1348	75552	75578	34	124377	124410
R_598	23	33160	33182	R_1349	R_1349	75580	75606	84	124472	124555
R_599	21	33190	33210	R_1350	R_1350	75593	75618	20	124557	124576
R_600	24	33222	33245	R_1351	R_1351	75815	75855	32	124648	124679
R_601	56	33258	33313	R_1352	R_1352	75919	75948	22	124688	124709
R_602	26	33317	33342	R_1353	R_1353	75944	75963	20	124700	124719
R_603	25	33344	33368	R_1354	R_1354	75964	76000	35	124712	124746
R_604	20	33379	33398	R_1355	R_1355	76123	76142	70	124748	124817
R_605	22	33395	33416	R_1356	R_1356	76156	76185	21	124824	124844
R_606	20	33395	33414	R_1357	R_1357	76199	76278	23	124859	124881
R_607	22	33400	33421	R_1358	R_1358	76296	76318	35	124883	124917
R_608	22	33457	33478	R_1359	R_1359	76327	76347	20	124919	124938
R_609	22	33512	33533	R_1360	R_1360	76341	76364	57	124940	124996
R_610	23	33532	33554	R_1361	R_1361	76366	76426	38	125015	125052
R_611	24	33532	33555	R_1362	R_1362	76467	76492	21	125032	125052
R_612	28	33535	33562	R_1363	R_1363	76520	76554	29	125064	125092
R_613	21	33547	33567	R_1364	R_1364	76571	76628	37	125107	125143
R_614	20	33548	33567	R_1365	R_1365	76697	76753	42	125198	125239
R_615	23	33582	33604	R_1366	R_1366	76755	76776	50	125241	125290
R_616	20	33588	33607	R_1367	R_1367	76822	76844	42	125292	125333
R_617	24	33618	33641	R_1368	R_1368	76863	76904	31	125346	125376
R_618	26	33675	33700	R_1369	R_1369	76906	76931	22	125378	125399
R_619	29	33726	33754	R_1370	R_1370	76944	76994	46	125401	125446
R_620	47	33775	33821	R_1371	R_1371	77037	77105	33	125700	125732
R_621	20	33835	33854	R_1372	R_1372	77153	77178	32	125734	125765
R_622	49	33856	33904	R_1373	R_1373	77180	77264	48	125803	125850

10

20

30

40

50

【表 4 - 25】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	領域	配列番号 1 における位置		長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり		始まり	終わり
R_623	64	33948	34011	35	R_1374	77271	77305	35	R_2125	125946
R_624	20	34025	34044	41	R_1375	77307	77347	45	R_2126	125992
R_625	20	34072	34091	27	R_1376	77433	77459	73	R_2127	126084
R_626	31	34139	34169	24	R_1377	77462	77485	60	R_2128	126146
R_627	78	34179	34256	30	R_1378	77508	77537	32	R_2129	126372
R_628	49	34258	34306	36	R_1379	77561	77596	22	R_2130	126395
R_629	29	34379	34407	39	R_1380	77615	77653	25	R_2131	126412
R_630	21	34417	34437	50	R_1381	77655	77704	20	R_2132	126492
R_631	27	34449	34475	20	R_1382	77719	77738	22	R_2133	126505
R_632	24	34495	34518	26	R_1383	77762	77787	24	R_2134	126683
R_633	21	34516	34536	29	R_1384	77807	77835	23	R_2135	126713
R_634	21	34562	34582	23	R_1385	77837	77859	34	R_2136	126748
R_635	21	34572	34592	26	R_1386	77861	77886	22	R_2137	126843
R_636	22	34576	34597	22	R_1387	77910	77931	20	R_2138	126904
R_637	32	34612	34643	45	R_1388	77933	77977	38	R_2139	127091
R_638	24	34646	34669	36	R_1389	78017	78052	40	R_2140	127150
R_639	65	34681	34745	24	R_1390	78074	78097	30	R_2141	127230
R_640	139	34765	34903	47	R_1391	78136	78182	21	R_2142	127252
R_641	60	34943	35002	93	R_1392	78184	78276	76	R_2143	127333
R_642	52	35012	35063	24	R_1393	78282	78305	59	R_2144	127417
R_643	83	35065	35147	99	R_1394	78319	78417	33	R_2145	127451
R_644	21	35160	35180	42	R_1395	78420	78461	52	R_2146	127618
R_645	29	35188	35216	23	R_1396	78478	78500	38	R_2147	127657
R_646	21	35218	35238	21	R_1397	78647	78667	49	R_2148	127704
R_647	59	35269	35327	34	R_1398	78736	78769	37	R_2149	127742
R_648	26	35330	35355	20	R_1399	78891	78910	60	R_2150	127820

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 6】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_649	44	35372	35415	R_1400	26	78926	78951	R_2151	26	127953	127977
R_650	20	35417	35436	R_1401	21	78953	78973	R_2152	30	128097	128126
R_651	43	35442	35484	R_1402	69	78997	79065	R_2153	40	128187	128226
R_652	22	35482	35503	R_1403	21	79067	79087	R_2154	58	128237	128294
R_653	74	35505	35578	R_1404	25	79091	79115	R_2155	20	128323	128342
R_654	20	35599	35618	R_1405	21	79122	79142	R_2156	32	128408	128439
R_655	25	35620	35644	R_1406	24	79160	79183	R_2157	37	128425	128461
R_656	39	35654	35692	R_1407	31	79187	79217	R_2158	22	128463	128484
R_657	26	35697	35722	R_1408	75	79219	79293	R_2159	56	128500	128555
R_658	30	35724	35753	R_1409	27	79308	79334	R_2160	21	128565	128585
R_659	23	35756	35778	R_1410	71	79366	79436	R_2161	29	128586	128614
R_660	22	35777	35798	R_1411	34	79469	79502	R_2162	53	128631	128683
R_661	40	35838	35877	R_1412	41	79534	79574	R_2163	59	128685	128743
R_662	24	35879	35902	R_1413	28	79576	79603	R_2164	99	128738	128836
R_663	20	35887	35906	R_1414	23	79605	79627	R_2165	23	128850	128872
R_664	21	35894	35914	R_1415	24	79712	79735	R_2166	20	128896	128915
R_665	62	35928	35989	R_1416	35	79738	79772	R_2167	63	128922	128984
R_666	27	36002	36028	R_1417	37	79793	79829	R_2168	26	129031	129056
R_667	20	36025	36044	R_1418	38	79847	79884	R_2169	28	129071	129098
R_668	21	36030	36050	R_1419	48	79924	79971	R_2170	69	129104	129172
R_669	64	36099	36162	R_1420	31	80108	80138	R_2171	27	129196	129222
R_670	30	36171	36200	R_1421	34	80140	80173	R_2172	38	129235	129272
R_671	39	36202	36240	R_1422	77	80211	80287	R_2173	30	129330	129359
R_672	56	36242	36297	R_1423	55	80307	80361	R_2174	33	129345	129377
R_673	47	36307	36353	R_1424	26	80366	80391	R_2175	40	129401	129440
R_674	34	36404	36437	R_1425	38	80419	80456	R_2176	24	129427	129450

10

20

30

40

50

【表 4 - 27】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_675	22	36439	36460	R_1426	20	80472	80491	R_2177	22	129443	129464
R_676	20	36493	36512	R_1427	21	80505	80525	R_2178	34	129488	129521
R_677	24	36514	36537	R_1428	40	80527	80566	R_2179	79	129540	129618
R_678	20	36568	36587	R_1429	37	80571	80607	R_2180	69	129617	129685
R_679	32	36589	36620	R_1430	40	80618	80657	R_2181	29	129705	129733
R_680	25	36622	36646	R_1431	29	80671	80699	R_2182	65	129735	129799
R_681	22	36654	36675	R_1432	36	80732	80767	R_2183	48	129801	129848
R_682	26	36678	36703	R_1433	39	80791	80829	R_2184	37	129884	129920
R_683	28	36728	36755	R_1434	37	80830	80866	R_2185	42	129918	129959
R_684	41	36790	36830	R_1435	53	80868	80920	R_2186	38	129988	130025
R_685	60	36862	36921	R_1436	30	80996	81025	R_2187	26	130084	130109
R_686	37	36940	36976	R_1437	25	81027	81051	R_2188	24	130125	130148
R_687	55	37002	37056	R_1438	55	81053	81107	R_2189	36	130150	130185
R_688	44	37124	37167	R_1439	68	81109	81176	R_2190	21	130247	130267
R_689	29	37169	37197	R_1440	24	81225	81248	R_2191	80	130269	130348
R_690	25	37232	37256	R_1441	68	81264	81331	R_2192	30	130384	130413
R_691	21	37258	37278	R_1442	23	81344	81366	R_2193	21	130424	130444
R_692	75	37280	37354	R_1443	64	81377	81440	R_2194	37	130564	130600
R_693	93	37399	37491	R_1444	26	81481	81506	R_2195	21	130663	130683
R_694	22	37465	37486	R_1445	31	81571	81601	R_2196	43	130690	130732
R_695	21	37491	37511	R_1446	44	81608	81651	R_2197	61	130735	130795
R_696	20	37543	37562	R_1447	47	81694	81740	R_2198	109	130797	130905
R_697	23	37582	37604	R_1448	27	81757	81783	R_2199	51	130941	130991
R_698	31	37608	37638	R_1449	36	81780	81815	R_2200	23	131025	131047
R_699	21	37660	37680	R_1450	25	81817	81841	R_2201	21	131064	131084
R_700	21	37720	37740	R_1451	46	81866	81911	R_2202	35	131119	131153

10

20

30

40

50

【表 4 - 28】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_701	35	37778	37812	R_1452	23	81916	81938	R_2203	62	131155	131216
R_702	72	37825	37896	R_1453	27	81946	81972	R_2204	39	131269	131307
R_703	35	37926	37960	R_1454	20	82028	82047	R_2205	22	131309	131330
R_704	42	37962	38003	R_1455	55	82049	82103	R_2206	32	131350	131381
R_705	20	38119	38138	R_1456	71	82122	82192	R_2207	52	131432	131483
R_706	28	38162	38189	R_1457	32	82216	82247	R_2208	43	131501	131543
R_707	23	38215	38237	R_1458	47	82278	82324	R_2209	20	131565	131584
R_708	22	38249	38270	R_1459	25	82498	82522	R_2210	90	131606	131695
R_709	79	38284	38362	R_1460	27	82549	82575	R_2211	79	131697	131775
R_710	30	38419	38448	R_1461	48	82606	82653	R_2212	69	131758	131826
R_711	25	38476	38500	R_1462	26	82655	82680	R_2213	20	131877	131896
R_712	21	38486	38506	R_1463	27	82699	82725	R_2214	21	131898	131918
R_713	22	38520	38541	R_1464	67	82735	82801	R_2215	23	131951	131973
R_714	47	38548	38594	R_1465	56	82833	82888	R_2216	37	131975	132011
R_715	22	38603	38624	R_1466	29	82898	82926	R_2217	25	132017	132041
R_716	27	38623	38649	R_1467	26	82928	82953	R_2218	29	132061	132089
R_717	22	38709	38730	R_1468	45	82990	83034	R_2219	22	132091	132112
R_718	21	38734	38754	R_1469	73	83083	83155	R_2220	32	132138	132169
R_719	46	38777	38822	R_1470	39	83180	83218	R_2221	36	132182	132217
R_720	33	38853	38885	R_1471	70	83255	83324	R_2222	26	132253	132278
R_721	27	38897	38923	R_1472	35	83346	83380	R_2223	48	132280	132327
R_722	23	38982	39004	R_1473	23	83409	83431	R_2224	33	132403	132435
R_723	26	39007	39032	R_1474	111	83433	83543	R_2225	58	132437	132494
R_724	23	39007	39029	R_1475	39	83553	83591	R_2226	33	132496	132528
R_725	20	39016	39035	R_1476	54	83628	83681	R_2227	60	132541	132600
R_726	21	39026	39046	R_1477	36	83710	83745	R_2228	22	132619	132640

10

20

30

40

50

【表 4 - 29】

領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置		領域	長さ (n t)	配列番号 1 における位置	
		始まり	終わり			始まり	終わり			始まり	終わり
R_727	30	39048	39077	R_1478	32	83776	83807	R_2229	23	132656	132678
R_728	31	39140	39170	R_1479	23	83809	83831	R_2230	21	132758	132778
R_729	24	39161	39184	R_1480	53	83854	83906	R_2231	39	132780	132818
R_730	36	39188	39223	R_1481	20	83960	83979	R_2232	47	132827	132873
R_731	28	39235	39262	R_1482	43	83995	84037	R_2233	27	132893	132919
R_732	39	39264	39302	R_1483	73	84051	84123	R_2234	65	132917	132981
R_733	52	39328	39379	R_1484	40	84142	84181	R_2235	20	132983	133002
R_734	59	39391	39449	R_1485	52	84217	84268	R_2236	67	133014	133080
R_735	30	39463	39492	R_1486	28	84270	84297	R_2237	46	133082	133127
R_736	20	39492	39511	R_1487	20	84354	84373	R_2238	39	133129	133167
R_737	20	39519	39538	R_1488	21	84440	84460	R_2239	31	133169	133199
R_738	37	39557	39593	R_1489	31	84488	84518	R_2240	34	133201	133234
R_739	34	39595	39628	R_1490	22	84653	84674	R_2241	27	133251	133277
R_740	34	39639	39672	R_1491	29	84727	84755	R_2242	20	133282	133301
R_741	26	39682	39707	R_1492	38	84851	84888	R_2243	37	133343	133379
R_742	20	39709	39728	R_1493	21	84887	84907	R_2244	30	133404	133433
R_743	23	39746	39768	R_1494	58	84932	84989	R_2245	77	133435	133511
R_744	23	39753	39775	R_1495	35	84991	85025	R_2246	48	133528	133575
R_745	20	39777	39796	R_1496	24	85109	85132	R_2247	22	133676	133697
R_746	20	39798	39817	R_1497	60	85135	85194	R_2248	54	133710	133763
R_747	41	39833	39873	R_1498	27	85206	85232	R_2249	20	133765	133784
R_748	20	39876	39895	R_1499	26	85239	85264	R_2250	29	133786	133814
R_749	36	39907	39942	R_1500	32	85327	85358	R_2251	40	133816	133855
R_750	47	39990	40036	R_1501	24	85390	85413	R_2252	42	133857	133898
R_751	36	40074	40109	R_1502	24	85520	85543	R_2253	63	133900	133962
								R_2254	40	133964	134003

【0059】

いくつかの実施形態では、標的配列は、T a u ヒト m R N A イントロン 1 又は 2 などのヒト M A P T m R N A イントロンから選択される配列である（上記の表 1 を参照）。

【0060】

本発明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。

【0061】

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 ~ 100 ヌ

10

20

30

40

50

クレオチド、例えば 1 2 ~ 6 0、例えば 1 3 ~ 5 0、例えば 1 4 ~ 3 0、例えば 1 5 ~ 2 5、例えば 1 6 ~ 2 0 連続ヌクレオチドである。

【 0 0 6 2 】

本発明の一実施形態では、標的配列は、領域 A に対応する配列番号 3 である。ある特定の実施形態では、標的配列は、配列番号 1 の 1 2 0 5 1 ~ 1 2 1 1 1 位、例えば配列番号 1 の 1 2 0 5 1 ~ 1 2 0 7 9 位、1 2 0 8 5 ~ 1 2 1 1 1 位、又は 1 2 0 6 0 ~ 1 2 0 7 8 位から選択される。

【 0 0 6 3 】

本発明の一実施形態では、標的配列は、領域 B に対応する配列番号 4 である。ある特定の実施形態では、標的配列は、配列番号 1 の 3 9 5 6 2 ~ 3 9 5 9 3 位、例えば配列番号 1 の 3 9 5 7 3 ~ 3 9 5 9 2 位から選択される。

10

【 0 0 6 4 】

本発明の一実施形態では、標的配列は、領域 C に対応する配列番号 5 である。ある特定の実施形態では、標的配列は、配列番号 1 の 7 2 8 3 7 ~ 7 2 9 4 0 位、例えば配列番号 1 の 7 2 8 6 1 ~ 7 2 8 9 1 位又は 7 2 8 6 2 ~ 7 2 8 9 0 位から選択される。

【 0 0 6 5 】

標的細胞

用語「標的細胞」とは、本明細書で使用される場合、標的核酸を発現している細胞を指す。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、又は霊長類細胞、例えばサル細胞若しくはヒト細胞である。

20

【 0 0 6 6 】

好ましい実施形態では、標的細胞は、T a u プレ m R N A 又は T a u 成熟 m R N A などの T a u m R N A を発現する。T a u m R N A 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無視される。

【 0 0 6 7 】

天然に存在するバリエーション

用語「天然に存在するバリエーション」とは、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、又はプレ m R N A の選択的スプライシング若しくは例えば一塩基多型 (s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m : S N P) などの多型の存在に起因して異なり得る、M A P T 遺伝子又は転写物のバリエーションと、対立遺伝子バリエーションとを指す。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。

30

【 0 0 6 8 】

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 M A P T 標的核酸、例えば配列番号 1 及び 2 からなる群より選択される標的核酸に対して少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % 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、配列番号 1 のヒト M A P T 標的核酸に対して少なくとも 9 9 % 相同性を有する。

40

【 0 0 6 9 】

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 T a u の量と比較した場合、T a u 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理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) で処理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。

【 0 0 7 0 】

調節の 1 つのタイプは、例えば m R N A の分解又は転写の遮断による、T a u の発現を

50

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、Tau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。

【0071】

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、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 ~ +1.2、より好ましくは +1.5 ~ +1.0、最も好ましくは +3 ~ +8 の融解温度の上昇をもたらす。多数の高親和性修飾ヌクレオシドが当該技術分野にて既知であり、例えば、多くの2'置換ヌクレオシド及びロックス核酸 (LNA) が含まれる (例えば、Freier & Altmann, 「Nucleic Acid Res.」 (1997年) 第25巻第4429 ~ 4443頁及びUhlmann, 「Curr. Opinion in Drug Development」 (2000年) 第3巻第2号第293 ~ 213頁を参照されたい)。

10

【0072】

糖修飾

本発明のオリゴマーは、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つ以上のヌクレオシドを含み得る。

20

【0073】

リボース糖部分の修飾を有する多数のヌクレオシドが、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特定の特性を改善することを主な目的として作製されている。

【0074】

そのような修飾には、例えばヘキソース環 (HNA) 若しくは二環式環 (典型的には、リボース環 (LNA) のC2及びC4炭素の間にバイラジカル架橋を有する)、又は非結合リボース環 (典型的には、C2及びC3炭素の間の結合を欠く (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、例えばピシクロヘキソース核酸 (国際公開第WO2011/017521号) 又は三環式核酸 (国際公開第WO2013/154798号) が含まれる。修飾ヌクレオシドにはまた、例えばペプチド核酸 (PNA) の場合には、糖部分が非糖部分で置き換えられているヌクレオシド、又はモルホリノ核酸も含まれる。

30

【0075】

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ヌクレオシドに天然に存在する2'-OH基に変更することによる修飾も含まれる。置換基は、例えば2'、3'、4'、又は5'位で導入され得る。

【0076】

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以外の置換基を有し (2'置換ヌクレオシド)、又は2'炭素とリボース環の第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) である。

40

【0077】

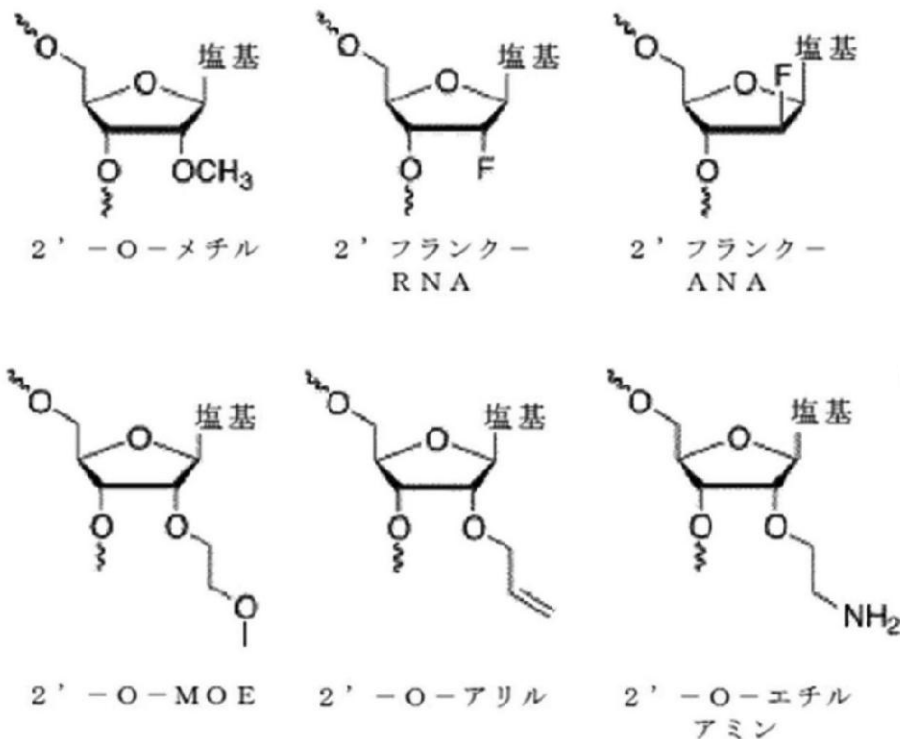
実際、2'糖置換ヌクレオシドの開発には多くの注目が集まっており、数多くの2'置換ヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドに組み込まれた際に有益な特性を有することが見出されている。例えば、2'修飾糖は、向上された結合親和性、及び/又は増大されたヌクレアーゼ耐性をオリゴヌクレオチドに提供することができる。2'置換修飾ヌクレオシドの例は、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA (MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-R

50

NA、及び2'-F-ANAヌクレオシドである。更なる例については、例えばFreier & Altmann; 「Nucl. Acid Res.」(1997年)第25巻第4429~4443頁及びUhlmann; 「Curr. Opinion in Drug Development」(2000年)第3巻第2号第293~213頁、及びDelevey及びDamha、 「Chemistry and Biology」(2012年)第19巻第937頁を参照されたい。以下は、いくつかの2'置換修飾ヌクレオシドの説明である。

【0078】

【化1】



【0079】

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。

【0080】

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(二重鎖安定化)に関連している。これはオリゴヌクレオチド/補完二重鎖の融解温度を測定することにより日常的に決定され得る。

【0081】

非限定的に、例示的なLNAヌクレオシドは、国際公開第WO99/014226号、国際公開第WO00/66604号、国際公開第WO98/039352号、国際公開第WO2004/046160号、国際公開第WO00/047599号、国際公開第WO2007/134181号、国際公開第WO2010/077578号、国際公開第WO2010/036698号、国際公開第WO2007/090071号、国際公開第WO2009/006478号、国際公開第WO2011/156202号、国際公開第WO

2008/154401号、国際公開第WO2009/067647号、国際公開第WO2008/150729号、Moritaら、「Bioorganic & Med. Chem. Lett.」第12巻第73～76頁；Sethら、「J. Org. Chem.」(2010年)第75巻第5号第1569～81頁；Mitsuokaら、「Nucleic Acids Research」(2009年)第37巻第4号第1225～1238頁；並びに、Wan及びSeth、「J. Medical Chemistry」(2016年)第59巻第9645～9667頁に開示されている。

【0082】

2' - 4' 架橋は、2～4個の架橋原子を含み、特に式 - X - Y - で表され、式中、
Xは、酸素、硫黄、 $-CR^aR^b-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(=CR^aR^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-O-NR^a-$ 、 $-NR^a-O-$ 、 $-C(=J)-$ 、Se、 $-O-NR^a-$ 、 $-NR^a-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)-O-$ 、又は $-O-CR^aR^b-$ であり；

10

Yは、酸素、硫黄、 $-(CR^aR^b)_n-$ 、 $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(=J)-$ 、Se、 $-O-NR^a-$ 、 $-NR^a-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)-O-$ 、又は $-O-CR^aR^b-$ であるが；

ただし、 $-X-Y-$ は、 $-O-O-$ 、 $Si(R^a)_2-Si(R^a)_2-$ 、 $-SO_2-SO_2-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=N-C(R^a)=N-$ 、 $-C(R^a)=N-C(R^a)=C(R^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^b)-C(R^a)=N-$ 、又は $-Se-Se-$ ではなく；

20

Jは、酸素、硫黄、 $=CH_2$ 、又は $=N(R^a)$ であり；

R^a 及び R^b は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、シアノ、チオヒドロキシル、アルキル、置換アルキル、アルケニル、置換アルケニル、アルキニル、置換アルキニル、アルコキシ、置換アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、アリアル、ヘテロシクリル、アミノ、アルキルアミノ、カルバモイル、アルキルアミノカルボニル、アミノアルキルアミノカルボニル、アルキルアミノアルキルアミノカルボニル、アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アルカノイルオキシ、スルホニル、アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、チオヒドロキシルスルフィドアルキルスルファニル、アリアルオキシカルボニル、アリアルオキシ、アリアルカルボニル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルオキシカルボニル、ヘテロアリアルオキシ、ヘテロアリアルカルボニル、 $-OC(=X^a)R^c$ 、 $-OC(=X^a)NR^cR^d$ 、及び $-NR^eC(=X^a)NR^cR^d$ から独立して選択され；

30

又は、2つのジェミナルな R^a 及び R^b は、一緒になって、任意に置換されたメチレンを形成し；

又は、2つのジェミナルな R^a 及び R^b は、結合している炭素原子と共にシクロアルキル又はハロシクロアルキルを形成し、 $-X-Y-$ の炭素原子は1個だけであり；

ここで、置換アルキル、置換アルケニル、置換アルキニル、置換アルコキシ、及び置換メチレンは、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、ヘテロシリル、アリアル、及びヘテロアリアルから独立して選択される1～3個の置換基で置換されたアルキル、アルケニル、アルキニル、及びメチレンであり；

40

X^a は、酸素、硫黄、又は $-NR^c$ であり；

R^c 、 R^d 、及び R^e は、水素及びアルキルから独立して選択され；並びに、

nは、1、2、又は3である。

【0083】

本発明の更に特定の実施形態では、Xは、酸素、硫黄、 $-NR^a-$ 、 $-CR^aR^b-$ 、又は $-C(=CR^aR^b)-$ 、特に酸素、硫黄、 $-NH-$ 、 $-CH_2-$ 、又は $-C(=CH_2)-$ 、特に酸素である。

50

【0084】

本発明の別の特定の実施形態では、Yは、 $-CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-CR^aR^b-$ 、又は $-CR^aR^b-CR^aR^b-CR^aR^b-$ 、特に $-CH_2-CHCH_3-$ 、 $-CHCH_3-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、又は $-CH_2-CH_2-CH_2-$ である。

【0085】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-(CR^aR^b)_n-$ 、 $-S-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-CR^aR^b-$ 、 $-O-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、 $-C(=CR^aR^b)-CR^aR^b-$ 、 $-N(R^a)CR^aR^b-$ 、 $-O-N(R^a)-CR^aR^b-$ 、又は $-N(R^a)-O-CR^aR^b-$ である。

10

【0086】

本発明の具体的な実施形態では、 R^a 及び R^b は、水素、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、及びアルコキシアルキル、特に水素、ハロゲン、アルキル、及びアルコキシアルキルからなる群より独立して選択される。

【0087】

本発明の一実施形態では、 R^a 及び R^b は、水素、フルオロ、ヒドロキシル、メチル、及び $-CH_2-O-CH_3$ 、特に水素、フルオロ、メチル、及び $-CH_2-O-CH_3$ からなる群より独立して選択される。

【0088】

有利には、 $-X-Y-$ の R^a 及び R^b の一方は上記に定義された通りであり、他方は全て同時に水素である。

20

【0089】

本発明の更に特定の実施形態では、 R^a は、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。

【0090】

本発明の別の特定の実施形態では、 R^b は、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。

【0091】

本発明の具体的な実施形態では、 R^a 及び R^b の一方又は両方は、水素である。

【0092】

本発明の具体的な実施形態では、 R^a 及び R^b の一方のみが、水素である。

30

【0093】

本発明の特定の一実施形態では、 R^a 及び R^b の一方はメチルであり、他方は水素である。

【0094】

本発明の具体的な実施形態では、 R^a 及び R^b は、両方とも同時にメチルである。

【0095】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$ 、 $-S-CH(CH_3)-$ 、 $-NH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_2-O-CH_3)-$ 、 $-O-CH(CH_2CH_3)-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、 $-O-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-CH_2-$ 、 $-C(=CH_2)CH_2-$ 、 $-C(=CH_2)CH(CH_3)-$ 、 $-N(OCH_3)CH_2-$ 、又は $-N(CH_3)CH_2-$ である。

40

【0096】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CR^aR^b-$ であり、式中、 R^a 及び R^b は、水素、アルキル、及びアルコキシアルキル、特に水素、メチル、及び $-CH_2-O-CH_3$ からなる群より独立して選択される。

【0097】

具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH_2-$ 又は $-O-CH(CH_3)-$ 、特に $-O-CH_2-$ である。

50

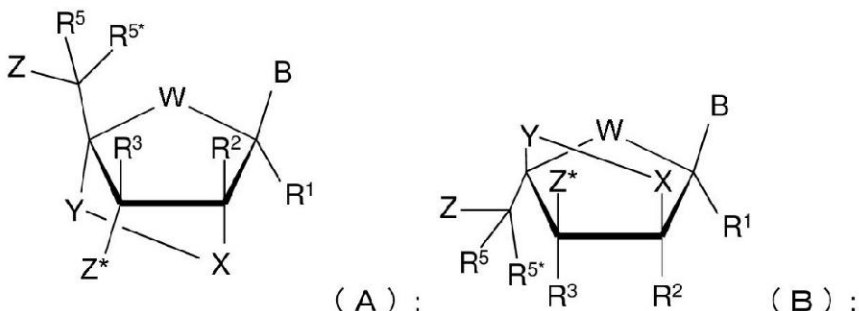
【 0 0 9 8 】

2' - 4' 架橋は、それぞれ式 (A) 及び式 (B) に図示するように、リボース環の平面の下 (- D - 立体配置) 又は環の平面の上 (- L - 立体配置) のいずれかに位置し得る。

【 0 0 9 9 】

本発明に係る LNAヌクレオシドは、特に、式 (A) 又は式 (B) であり、

【 化 2 】



10

式中、

Wは、酸素、硫黄、 - N (R^a) - 又は - C R^a R^b - 、特に酸素であり；

Bは、核酸塩基又は修飾核酸塩基であり；

20

Zは、隣接するヌクレオシド又は5'末端基へのヌクレオシド間結合であり；

Z*は、隣接するヌクレオシド又は3'末端基へのヌクレオシド間結合であり；

R¹、R²、R³、R⁵、及びR^{5*}は、水素、ハロゲン、アルキル、ハロアルキル、アルケニル、アルキニル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルコキシアルキル、アジド、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、ホルミル、及びアリールから独立して選択され；並びに、

X、Y、R^a、及びR^bは、上で定義した通りである。

【 0 1 0 0 】

具体的な実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^aは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。別の具体的な実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^bは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。更なる具体的な実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^a及びR^bの一方又は両方は、水素である。具体的な実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^a及びR^bの一方のみが、水素である。特定の一実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^a及びR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。具体的な実施形態では、 - X - Y - の定義において、R^a及びR^bは、両方とも同時にメチルである。

30

【 0 1 0 1 】

更なる具体的な実施形態では、Xの定義において、R^aは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。別の具体的な実施形態では、Xの定義において、R^bは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。具体的な実施形態では、Xの定義において、R^a及びR^bの一方又は両方は、水素である。具体的な実施形態では、Xの定義において、R^a及びR^bの一方のみが、水素である。特定の一実施形態では、Xの定義において、R^a及びR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。具体的な実施形態では、Xの定義において、R^a及びR^bは、両方とも同時にメチルである。

40

【 0 1 0 2 】

更なる具体的な実施形態では、Yの定義において、R^aは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。別の具体的な実施形態では、Yの定義において、R^bは、水素又はアルキル、特に水素又はメチルである。具体的な実施形態では、Yの定義において、R^a及びR^bの一方又は両方は、水素である。具体的な実施形態では、Yの定義において、R^a及びR^bの一方のみが、水素である。特定の一実施形態では、Yの定義において、R^a及

50

び R^b の一方はメチルであり、他方は水素である。具体的な実施形態では、 Y の定義において、 R^a 及び R^b は、両方とも同時にメチルである。

【0103】

本発明の特定の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、水素及びアルキル、特に水素及びメチルから独立して選択される。

【0104】

本発明の更に特定の有利な実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。

【0105】

本発明の別の特定の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 は全て同時に水素であり、 R^5 及び R^{5*} の一方は水素であり、他方は上記で定義した通り、特にアルキル、より具体的にはメチルである。

10

【0106】

本発明の具体的な実施形態では、 R^5 及び R^{5*} は、水素、ハロゲン、アルキル、アルコキシアルキル、及びアジド、特に水素、フルオロ、メチル、メトキシエチル、及びアジドから独立して選択される。本発明の特定の有利な実施形態では、 R^5 及び R^{5*} の一方は水素であり、他方はアルキル、特にメチル、ハロゲン、特にフルオロ、アルコキシアルキル、特にメトキシエチル若しくはアジドであるか、又は R^5 及び R^{5*} は、同時に水素若しくはハロゲン、特に同時にフルオロの水素である。そのような特定の実施形態では、 W は有利には酸素であり得、 $-X-Y-$ 有利には $-O-CH_2-$ であり得る。

20

【0107】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CH_2-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような LNA ヌクレオシドは、国際公開第 $WO99/014226$ 号、同第 $WO00/66604$ 号、同第 $WO98/039352$ 号、及び同第 $WO2004/046160$ 号に開示され、これらは全て参照により本明細書に組み込まれており、 $-D-$ オキシ LNA 及び $-L-$ オキシ LNA ヌクレオシドとして当該技術分野で一般的に知られているものを含む。

【0108】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-S-CH_2-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような $ThioLNA$ ヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれている国際公開第 $WO99/014226$ 号及び同第 $WO2004/046160$ 号に開示されている。

30

【0109】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-NH-CH_2-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような $AminoLNA$ ヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれている国際公開第 $WO99/014226$ 号及び同第 $WO2004/046160$ 号に開示されている。

【0110】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CH_2CH_2-$ 又は $-OCH_2CH_2CH_2CH_2-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような LNA ヌクレオシドは、国際公開第 $WO00/047599$ 号、及び *Morita* ら、「*Bioorganic & Med. Chem. Lett.*」第 12 巻第 73 ~ 76 頁に開示され、これらは参照により本明細書に組み入れられており、 $2'-O-4'C$ -エチレン架橋核酸 (ENA) として当該技術分野で一般に知られているものを含む。

40

【0111】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CH_2-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 は全て同時に水素であり、 R^5 及び R^{5*} の一方は水素であり、他方はアルキル、例えばメチルなどの水素ではない。そのような $5'$ 置換 LNA ヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 $WO2007/134181$ 号に開示さ

50

れている。

【0112】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CR^aR^b-$ であり、ここで、 R^a 及び R^b の一方又は両方は水素、特にメチルなどのアルキルではなく、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 は全て同時に水素であり、 R^5 及び R^{5*} の一方は水素であり、他方は水素、特に例えばメチルなどのアルキルではない。このようなビス修飾 LNA ヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 WO 2010/077578 号に開示されている。

【0113】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CHR^a-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような 6' 置換 LNA ヌクレオシドは、国際公開第 WO 2010/036698 号及び同第 WO 2007/090071 号に開示されており、これらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。そのような 6' - 置換 LNA ヌクレオシドにおいて、 R^a は、特に、メチルなどの C_1-C_6 アルキルである。

10

【0114】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH(CH_2-O-CH_3)-$ ($2'$ O - メトキシエチル二環式核酸)、Sethra、*J. Org. Chem.* (2010 年) 第 75 巻第 5 号第 1569 ~ 81 頁) である。

【0115】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH(CH_2CH_3)-$ ($2'$ O - エチル二環式核酸)、Sethra、*J. Org. Chem.* (2010 年) 第 75 巻第 5 号第 1569 ~ 81 頁) である。

20

【0116】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CH(CH_2-O-CH_3)-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。このような LNA ヌクレオシドは、当該技術分野では環状 MOE (cMOE) としても知られており、国際公開第 WO 2007/090071 号に開示されている。

【0117】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH(CH_3)-$ である。

30

【0118】

本発明の別の特定の実施形態では、本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CH_2-O-CH_2-$ である (Sethra、*J. Org. Chem.* (2010 年)、前掲)。

【0119】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CH(CH_3)-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は全て同時に水素である。このような 6' - メチル LNA ヌクレオシドは、当該技術分野では cET ヌクレオシドとしても知られており、両方とも参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 WO 2007/090071 号 ($-D$) 及び国際公開第 WO 2010/036698 号 ($-L$) に開示されているように、(S) - cET 又は (R) - cET ジアステレオ異性体のいずれかであり得る。

40

【0120】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-O-CR^aR^b-$ であり、ここで、 R^a も R^b も水素ではなく、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は全て同時に水素である。具体的な実施形態では、 R^a 及び R^b は両方とも同時にアルキル、特に両方とも同時にメチルである。そのような 6' - ジ - 置換 LNA ヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 WO 2009/006478 号に開示されている。

【0121】

本発明の別の特定の実施形態では、 $-X-Y-$ は $-S-CHR^a-$ であり、 W は酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような 6' 置換

50

チオLNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第WO2011/156202号に開示されている。このような6'置換チオLNAの特定の実施形態では、 R^a は、アルキル、特にメチルである。

【0122】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-C(=CH_2)C(R^aR^b)-$ 、 $-C(=CHF)C(R^aR^b)-$ 、又は $-C(=CF_2)C(R^aR^b)-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は全て同時に水素である。 R^a 及び R^b は、有利には、水素、ハロゲン、アルキル、及びアルコキシアルキル、特に水素、メチル、フルオロ、及びメトキシメチルから独立して選択される。 R^a 及び R^b は特に同時に水素又はメチルの両方であるか、又は R^a と R^b の一方が水素であり、他方がメチルである。そのようなビニルカルボLNAヌクレオシドは、国際公開第WO2008/154401号及び同第WO2009/067647号に開示されており、これらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。

【0123】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は $-N(OR^a)-CH_2-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は全て同時に水素である。具体的な実施形態では、 R^a は、メチルなどのアルキルである。そのようなLNAヌクレオシドはまた、N置換LNAとしても知られており、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第WO2008/150729号に開示されている。

【0124】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ 、 $-O-N(R^a)-$ 、 $-N(R^a)-O-$ 、 $-NR^a-CR^aR^b-CR^aR^b-$ 、又は $-NR^a-CR^aR^b-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は全て同時に水素である。 R^a 及び R^b は、有利には、水素、ハロゲン、アルキル、及びアルコキシアルキル、特に水素、メチル、フルオロ、及びメトキシメチルから独立して選択される。具体的な実施形態では、 R^a はアルキル、例えばメチルであり、 R^b は水素又はメチル、特に水素である。(Sethら、「J. Org. Chem.」(2010年)、前掲)。

【0125】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-N(CH_3)-$ である(Sethら、「J. Org. Chem.」(2010年)、前掲)。

【0126】

本発明の具体的な実施形態では、 R^5 及び R^{5*} は、両方とも同時に水素である。本発明の別の特定の実施形態では、 R^5 及び R^{5*} の一方は水素であり、他方はメチルなどのアルキルである。そのような実施形態では、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は、特に水素であり得、 $-X-Y-$ は、特に $-O-CH_2-$ 又は $-O-CHC(R^a)_3-$ 、例えば $-O-CH(CH_3)-$ などであり得る。

【0127】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、例えば $-CH_2-O-CH_2-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。そのような特定の実施形態では、 R^a は、特にアルキル、例えばメチルであり、 R^b は、水素又はメチル、特に水素であり得る。そのようなLNAヌクレオシドはまた、立体配座制限ヌクレオチド(conformationally restricted nucleotides: CRN)としても知られており、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第WO2013/036868号に開示されている。

【0128】

本発明の具体的な実施形態では、 $-X-Y-$ は、 $-O-CR^aR^b-O-CR^aR^b-$ 、例えば $-O-CH_2-O-CH_2-$ であり、Wは酸素であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、及び R^{5*} は、全て同時に水素である。 R^a 及び R^b は、有利には、水素、ハロゲン、アルキル、及びアルコキシアルキル、特に水素、メチル、フルオロ、及びメトキシメチルから独立して選択される。そのような特定の実施形態では、 R^a は、特にアルキル、例えばメチ

ルであり得、 R^b は、水素又はメチル、特に水素であり得る。そのようなLNAヌクレオシドはまた、COCヌクレオチドとしても知られており、参照により本明細書に組み込まれるMitsuokaら、「Nucleic Acids Research」(2009年)第37巻第4号第1225~1238頁に開示されている。

【0129】

特に指定しない限り、LNAヌクレオシドは -D又は -Lステレオアイソフォーム (stereoisomer) であり得ると認識される。

【0130】

本発明のLNAヌクレオシドの特定の例をスキーム1に示す(式中、Bは上で定義した通りである)。

【0131】

スキーム1

【化3】



【0132】

特定のLNAヌクレオシドは、 -D-オキシ-LNA、6'-メチル- -D-オキシ

LNA、例えば(S)-6'-メチル- -D-オキシ-LNA (ScET) 及びENAである。

【0133】

本発明の出発物質又は化合物が、1つ以上の反応工程の反応条件下で安定でないか又は反応性である1つ以上の官能基を含む場合、適切な保護基(例えば、「Protective Groups in Organic Chemistry」、T.W.Green及びP.G.M.Wuts、第3版(1999年)、Wiley、ニューヨークに記載)を、当技術分野で周知の重要な工程適用方法の前に導入することができる。そのような保護基は、文献に記載の標準的な方法を用いて、合成の後の段階で除去することができる。保護基の例は、tert-ブトキシカルボニル(Boc)、9-フルオレニルメチルカルバメート(Fmoc)、2-トリメチルシリルエチルカルバメート(Teoc)、カルボベンジルオキシ(Cbz)、及びp-メトキシベンジルオキシカルボニル(Moz)である。

10

【0134】

本明細書に記載される化合物は、数個の不斉中心を含むことができ、光学的に純粋な鏡像異性体、例えばラセミ体などの鏡像異性体の混合物、ジアステレオ異性体の混合物、ジアステレオ異性体ラセミ体、又はジアステレオ異性体ラセミ体の混合物として存在することができる。

【0135】

用語「不斉炭素原子」は、4つの異なる置換基を有する炭素原子を意味する。カーン・インゴルド・プレローグ順位則によれば、不斉炭素原子は、「R」又は「S」立体配置のものであり得る。

20

【0136】

化学基の定義

本明細書において、用語「アルキル」は、単独又は組合せで、1~8個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖アルキル基、特に1~6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖アルキル基、より具体的には1~4個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖アルキル基を意味する。直鎖及び分岐鎖C₁-C₈アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、異性体ペンチル、異性体ヘキシル、異性体ヘプチル、及び異性体オクチル、特にメチル、エチル、プロピル、ブチル、及びペンチルである。アルキルの特定の例は、メチル、エチル、及びプロピルである。

30

【0137】

用語「シクロアルキル」は、単独又は組合せで、3~8個の炭素原子を有するシクロアルキル環、特に3~6個の炭素原子を有するシクロアルキル環を意味する。シクロアルキルの例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、及びシクロオクチル、より具体的にはシクロプロピル及びシクロブチルである。「シクロアルキル」の特定の例は、シクロプロピルである。

【0138】

用語「アルコキシ」は、単独又は組合せで、式アルキル-O-の基を意味し、用語「アルキル」は、以前付与した意味、例えばメトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、及びtert-ブトキシを意味する。特定の「アルコキシ」は、メトキシ及びエトキシである。メトキシエトキシは、「アルコキシアルコキシ」の特定の例である。

40

【0139】

用語「オキシ」は、単独又は組合せで、-O-基を意味する。

【0140】

用語「アルケニル」は、単独又は組合せで、オレフィン結合と、最大8個まで、好ましくは最大6個まで、特に好ましくは最大4個までの炭素原子とを含む直鎖又は分岐鎖炭化水素残基を意味する。アルケニル基の例は、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、及びイソブテニルであ

50

る。

【 0 1 4 1 】

用語「アルキニル」は、単独又は組合せで、三重結合と、最大 8 個まで、好ましくは最大 6 個まで、特に好ましくは最大 4 個までの炭素原子とを含む直鎖又は分岐鎖炭化水素残基を意味する。

【 0 1 4 2 】

用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、単独又は組合せで、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素、特にフッ素、塩素、又は臭素、より具体的にはフッ素を意味する。用語「ハロ」は、別の基と組合わせて、少なくとも 1 つのハロゲン、特に 1 ~ 5 個のハロゲン、特に 1 ~ 4 個のハロゲン、すなわち 1 個、2 個、3 個、又は 4 個のハロゲンで置換された該基の置換を示す。

10

【 0 1 4 3 】

用語「ハロアルキル」は、単独又は組合せで、少なくとも 1 つのハロゲン、特に 1 ~ 5 個のハロゲン、特に 1 ~ 3 個のハロゲンで置換されたアルキル基を意味する。ハロアルキルの例には、モノフルオロ - 、ジフルオロ - 、又はトリフルオロ - メチル、- エチル、又は - プロピル、例えば 3 , 3 , 3 - トリフルオロプロピル、2 - フルオロエチル、2 , 2 , 2 - トリフルオロエチル、フルオロエチル、又はトリフルオロメチルが含まれる。フルオロメチル、ジフルオロメチル、及びトリフルオロメチルは、特定の「ハロアルキル」である。

【 0 1 4 4 】

20

用語「ハロシクロアルキル」は、単独又は組合せで、少なくとも 1 つのハロゲンで置換された、特に 1 ~ 5 個のハロゲン、特に 1 ~ 3 個のハロゲンで置換された、上記に定義したシクロアルキル基を意味する。「ハロシクロアルキル」の特定の例は、ハロシクロプロピル、特にフルオロシクロプロピル、ジフルオロシクロプロピル、及びトリフルオロシクロプロピルである。

【 0 1 4 5 】

用語「ヒドロキシル」及び「ヒドロキシ」は、単独又は組合せで、- OH 基を意味する。

【 0 1 4 6 】

用語「チオヒドロキシル」及び「チオヒドロキシ」は、単独又は組合せで、- SH 基を意味する。

30

【 0 1 4 7 】

用語「カルボニル」は、単独又は組合せで、- C (O) - 基を意味する。

【 0 1 4 8 】

用語「カルボキシ」又は「カルボキシル」は、単独又は組合せで、- C O O H 基を意味する。

【 0 1 4 9 】

用語「アミノ」は、単独又は組合せで、第一級アミノ基 (- N H ₂) 、第二級アミノ基 (- N H -) 、又は第三級アミノ基 (- N -) を意味する。

【 0 1 5 0 】

用語「アルキルアミノ」は、単独又は組合せで、1 個又は 2 個の上記に定義したアルキル基で置換された、上記に定義したアミノ基を意味する。

40

【 0 1 5 1 】

用語「スルホニル」は、単独又は組合せで、- S O ₂ 基を意味する。

【 0 1 5 2 】

用語「スルフィニル」は、単独又は組合せで、- S O - 基を意味する。

【 0 1 5 3 】

用語「スルファニル」は、単独又は組合せで、- S - 基を意味する。

【 0 1 5 4 】

用語「シアノ」は、単独又は組合せで、- C N 基を意味する。

【 0 1 5 5 】

50

用語「アジド」は、単独又は組合せで、 $-N_3$ 基を意味する。

【0156】

用語「ニトロ」は、単独又は組合せで、 NO_2 基を意味する。

【0157】

用語「ホルミル」は、単独又は組合せで、 $-C(O)H$ 基を意味する。

【0158】

用語「カルバモイル」は、単独又は組合せで、 $-C(O)NH_2$ 基を意味する。

【0159】

用語「カバミド」は、単独又は組合せで、 $-NH-C(O)-NH_2$ 基を意味する。

【0160】

用語「アリール」は、単独又は組合せで、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコシカルボニル、アルキルカルボニル、及びホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で場合により置換された、6～10個の炭素環原子を含む、一価芳香族炭素環式単環又は二環式環系を示す。アリールの例には、フェニル及びナフチル、特にフェニルが含まれる。

【0161】

用語「ヘテロアリール」は、単独又は組合せで、N、O、及びSから選択される1、2、3、又は4個のヘテロ原子を含み、残りの環原子は、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコシカルボニル、アルキルカルボニル及びホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で場合により置換された炭素である、5～12個の環原子の一価芳香族複素環式単環又は二環式環系を示す。ヘテロアリールの例には、ピロリル、フラニル、チエニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、トリアゾニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、トリアジニル、アゼピニル、ジアゼピニル、イソオキサゾリル、ベンゾフラニル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、インドリル、イソインドリル、イソベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾトリアゾリル、プリニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、カルバゾリル又はアクリジニルが含まれる。

【0162】

用語「ヘテロシクリル」は、単独又は組合せで、N、O、及びSから選択される1、2、3、又は4個の環ヘテロ原子を含み、残りの環原子は、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコシカルボニル、アルキルカルボニル、及びホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で場合により置換された炭素である、4～12、特に4～9個の環原子の一価飽和又は部分不飽和単環又は二環式環系を意味する。単環式飽和ヘテロシクリルの例には、アゼチジニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ピラゾリジニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリル、チアゾリジニル、ピペリジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、1,1-ジオキソ-チオモルホリン-4-イル、アゼパニル、ジアゼパニル、ホモピペラジニル、又はオキサゼパニルが含まれる。二環式飽和ヘテロシクロアルキルの例は、8-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクチル、キヌクリジニル、8-オキサ-3-アザ-ビシクロ[3.2.1]オクチル、9-アザ-ビシクロ[3.3.1]ノニル、3-オキサ-9-アザ-ビシクロ[3.3.1]ノニル、又は3-チア-9-アザ-ビシクロ[3.3.1]ノニルである。部分不飽和ヘテロシクロアルキルの例は、ジヒドロフリル、イミダゾリニル、ジヒドロ-オキサゾリル、テトラヒドロ-ピリジニル、又はジヒドロピラニルである。

【0163】

10

20

30

40

50

薬学的に許容される塩

用語「薬学的に許容される塩」は、生物学的に又は別様に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、及び酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、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、リシン、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

【0164】

保護基

用語「保護基」は、単独又は組合せで、化学反応が別の非保護の反応性部位で選択的に行われ得るように、多官能化合物の反応性部位を選択的に遮断する基を意味する。保護基は、除去することができる。例示的な保護基は、アミノ保護基、カルボキシ保護基、又はヒドロキシ保護基である。

20

【0165】

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。

【0166】

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RNase Hなどのエンドリボヌクレアーゼ(RNase)を動員することができる。ヌクレアーゼ媒介メカニズムを介して機能するオリゴヌクレオチド設計の例は、少なくとも5又は6の連続(conservative)DNAヌクレオシドの領域を典型的に含み、親和性増強ヌクレオシド、例えばギャップマ、ヘッドマ(headmer)、及びテイルマ(tailmer)が片側又は両側に隣接するオリゴヌクレオチドである。

30

【0167】

RNase H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分子と二重鎖を形成するときにRNase Hを動員するその能力を指す。国際公開第WO 01/23613号は、RNase H活性を決定するインビトロ法を提供し、これはRNase Hを動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は、相補的な標的核酸が提供された場合、pmol/L/分で測定して、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の全モノマー間にホスホロチオエート結合を有するDNAモノマーのみを含むオリゴヌクレオチドを使用し、そして国際公開第WO 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率の少なくとも5%、例えば少なくとも10%又は20%超を有する場合に、RNase Hを動員することができる。RNase H活性の決定に使用するために、組換えヒトRNase H1がLubio Science GmbH、Lucerne(スイス)から入手可能であ

40

50

る。

【0168】

ギャップマ

本発明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であってもよく、また、ギャップマオリゴヌクレオチド又はギャップマ設計とも称され得る。アンチセンスギャップマは、通常、RNase H 媒介分解を介して標的核酸を阻害するのに使用される。ギャップマオリゴヌクレオチドは、少なくとも3つの区別される構造領域、5'-フランク、ギャップ及び3'-フランク、F-G-F'を5'->3'配向で含む。「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(stretch)を含む。ギャップ領域は、1つ以上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'隣接領域(F)と、1つ以上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'隣接領域(F')とが隣接する。領域F及びF'の1つ以上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増強する(すなわち、これは親和性増強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つ以上の糖修飾ヌクレオシドは、2'糖修飾ヌクレオシド、例えばLNA及び2'-MOEから独立して選択される、例えば高親和性2'糖修飾である。

【0169】

ギャップマ設計において、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、各々、5'(F)又は3'(F')領域の糖修飾ヌクレオシドに隣接して位置する。フランクは更に、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してもよい。

【0170】

領域F-G-F'は、連続ヌクレオチド配列を形成する。本発明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'のギャップマ領域を含んでもよい。

【0171】

ギャップマ設計F-G-F'の全長は、例えば12~32ヌクレオシド、例えば13~24、例えば14~22ヌクレオシド、例えば14~17、例えば16~18ヌクレオシド、例えば16~20ヌクレオチド(nucleotide)であってもよい。

【0172】

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

$F_{1-8} - G_{6-16} - F'_{2-8}$ 、例えば

$F_{2-8} - G_{6-14} - F'_{2-8}$ 、例えば

$F_{3-8} - G_{6-14} - F'_{2-8}$

ただし、ギャップマ領域F-G-F'の全長は、少なくとも10、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。

【0173】

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1~8個のヌクレオシドを含むか又はそれらからなり、そのうち2~4個が2'糖修飾され、F及びF'領域の5'及び3'末端を規定し、GがRNase Hを動員することができる6~16個のヌクレオシドの領域である。

【0174】

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

【0175】

ギャップマ - 領域G

ギャップマの領域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酵素である。好適には、ギャップマは、少なくとも5又は6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ヌクレオシド、例えば8～12連続DNAヌクレオシド長のギャップ領域(G)を有し得る。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、又は16連続DNAヌクレオシドからなっているてもよい。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(^meC、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低減す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)。

【0176】

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、又は16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いるてもよい。いくつかの実施形態では、ギャップ内の全ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0177】

従来のギャップマはDNAギャップ領域を有するが、ギャップ領域内で使用される場合にRNase H動員を可能にする修飾ヌクレオシドの多数の例が存在する。ギャップ領域内に含まれる場合にRNase Hの動員が可能であるとして報告されている修飾ヌクレオシドには、例えば、-L-LNA、C4'-アルキル化DNA(国際出願第PCT/EP2009/050349号及びVesterら、「Bioorg. Med. Chem. Lett.」第18号(2008年)第2296～2300頁に記載されている通り、両方とも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ら(2003年)「J. AM. CHEM. SOC.」第125巻第654～661頁)、UNA(アンロックド核酸)(参照により本明細書に組み込まれるFluiterら、「Mol. Biosyst.」(2009年)第10巻第1039頁に記載されている通り)が含まれる。UNAは、典型的には、リボースのC2とC3の間の結合が除去され、アンロックド「糖」残基を形成しているアンロックド核酸である。そのようなギャップマ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際に2'エンド(endo)(DNA様)構造を採択する(すなわち、RNase H動員を可能にする修飾)ヌクレオシドであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるDNAギャップ領域(G)は、場合により、ギャップ領域内に導入された際に2'エンド(DNA様)構造を採択する1～3糖修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

【0178】

領域G-「ギャップブレーカ」

あるいは、いくつかのRNase H活性を保持しながら、ギャップマのギャップ領域に3'エンド立体配座を付与する修飾ヌクレオシドの挿入についての多くの報告が存在する。1つ以上の3'エンド修飾ヌクレオシドを含むギャップ領域を有するそのようなギャップマは、「ギャップブレーカ」又は「ギャップ破壊」ギャップマと称される。例えば、国際公開第WO2013/022984号を参照されたい。ギャップブレーカオリゴヌクレオチドは、RNase H動員を可能にするために、ギャップ領域内にDNAヌクレオシドの十分な領域を保持する。ギャップブレーカオリゴヌクレオチド設計がRNase Hを動員する能力は、典型的には、配列又は化合物固有である(Rukovら(2015年)「Nuc l. Acids Res.」第43巻第8476～8487頁を参照されたい)

。これは、いくつかの場合、標的RNAのより特異的な切断を提供するRNase Hを動員する「ギャップブレイカ」オリゴヌクレオチドを開示している。ギャップブレイカオリゴヌクレオチドのギャップ領域内で使用される修飾ヌクレオシドは、例えば、3'エンド確認(confirmation)を付与する修飾ヌクレオシド、例えば2'-O-メチル(OMe)若しくは2'-O-MOE(MOE)ヌクレオシド、又は-D LNAヌクレオシド(ヌクレオシドのリボース糖環のC2'とC4'との間の架橋が、立体配座である)、例えば-D-オキシLNA若しくはScETヌクレオシドであってもよい。

【0179】

上述した領域Gを含むギャップマと同様に、ギャップブレイカ又はギャップ破壊ギャップマのギャップ領域は、ギャップの5'末端に(領域Fの3'ヌクレオシドに隣接して)DNAヌクレオシドを有し、ギャップの3'末端に(領域Fの5'ヌクレオシドに隣接して)DNAヌクレオシドを有する。破壊ギャップを含むギャップマは、典型的には、ギャップ領域の5'末端又は3'末端のいずれかに少なくとも3又は4連続DNAヌクレオシドの領域を保持する。

【0180】

ギャップブレイカオリゴヌクレオチドの例示的な設計は、

$F_{1-8} - [D_{3-4} - E_1 - D_{3-4}] - F'_{1-8}$

$F_{1-8} - [D_{1-4} - E_1 - D_{3-4}] - F'_{1-8}$

$F_{1-8} - [D_{3-4} - E_1 - D_{1-4}] - F'_{1-8}$

を含み、領域Gは、 $[D_n - E_r - D_m]$ 内であり、DがDNAヌクレオシドの連続配列であり、Eが修飾ヌクレオシド(ギャップブレイカ又はギャップ破壊ヌクレオシド)であり、F及びF'が本明細書に定義した隣接領域であるが、ただし、ギャップマ領域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。

【0181】

いくつかの実施形態では、ギャップ破壊ギャップマの領域Gは、少なくとも6DNAヌクレオシド、例えば6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又は16DNAヌクレオシドを含む。上述したように、DNAヌクレオシドは連続であってもよいが、又は場合により1つ以上の修飾ヌクレオシドが散在してもよいが、ただし、ギャップ領域Gは、RNase H動員を媒介できることを条件とする。

【0182】

ギャップマ-隣接領域、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。

【0183】

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。

【0184】

領域Fは、1~8連続ヌクレオチド長、例えば2~6、例えば3~4連続ヌクレオチド長である。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では、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では、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では、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では、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。

【0185】

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。有利には、領域 F' の最も 3' の実施形態は、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 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では、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では、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では、領域 F' の 2 つの最も 3' 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では、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。

【0186】

10

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

【0187】

いくつかの実施形態では、領域 F 及び領域 F' は、独立して、糖修飾ヌクレオシドの連続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。

【0188】

20

いくつかの実施形態では、領域 F 及び領域 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)。

【0189】

いくつかの実施形態では、領域 F 及び領域 F' は、1 タイプのみの糖修飾ヌクレオシド、例えば MOE のみ、又は - D - オキシ LNA のみ、又は SET のみからなる。このような設計はまた、均一フランク又は均一ギャップマ設計とも称される。

【0190】

いくつかの実施形態では、領域 F 若しくは F' の全ヌクレオシド、又は F 及び F' は、例えば - D - オキシ LNA、ENA、又は SET ヌクレオシドから独立して選択される、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、例えば 2 ~ 4、例えば 3 ~ 4、例えば 1、2、3、4、又は 5 連続 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' の全ヌクレシドは、- D - オキシ LNA ヌクレオシドである。

30

【0191】

いくつかの実施形態では、領域 F 若しくは F' の全ヌクレシド、又は F 及び F' は、2' 置換ヌクレオシド、例えば OMe 又は MOE 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 連続 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、隣接領域の 1 つのみが、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) 隣接領域であり、一方で、3' (F') 隣接領域は、少なくとも 1 つの LNA ヌクレオシド、例えば - 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') 隣接領域であり、一方で、5' (F) 隣接領域は、少なくとも 1 つの LNA ヌクレオシド、例えば - D - オキシ LNA ヌクレオシド又は cET ヌクレオシドを含む。

40

【0192】

いくつかの実施形態では、領域 F 及び F' の全修飾ヌクレオシドが、例えば - D - オキシ LNA、ENA、又は SET 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、ここで、領域 F 若しくは F'、又は F 及び F' は、場合により DNA ヌクレオシドを含んでもよい (交互フランク、詳細にはこれらの定義を参照されたい)。いく

50

つかの実施形態では、領域 F 及び F' の全修飾ヌクレオシドは - D - オキシ L N A ヌクレオシドであり、ここで、領域 F 若しくは F'、又は F 及び F' は、場合により D N A ヌクレオシドを含んでもよい（交互フランク、詳細にはこれらの定義を参照されたい）。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態では、領域 F 及び F' の最も 5' 及び最も 3' のヌクレオシドは、L N A ヌクレオシド、例えば - D - オキシ L N A ヌクレオシド又は S c E T ヌクレオシドである。

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態では、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' 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。

【 0 1 9 5 】

L N A ギャップマ

L N A ギャップマは、領域 F 及び F' の一方又は両方のいずれかが、L N A ヌクレオシドを含むか又はそれらからなるギャップマである。- D - オキシギャップマは、領域 F 及び F' の一方又は両方のいずれかが、- D - オキシ L N A ヌクレオシドを含むか又はそれらからなるギャップマである。

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、L N A ギャップマは、式：[L N A]₁₋₅ - [領域 G] - [L N A]₁₋₅ のものであり、ここで、領域 G はギャップマ領域 G の定義に規定した通りである。

【 0 1 9 7 】

一実施形態では、L N A ギャップマは、式 [L N A]₄ - [領域 G]₁₀₋₁₂ - [L N A]₄ のものである。

【 0 1 9 8 】

M O E ギャップマ

M O E ギャップマは、領域 F 及び F' が M O E ヌクレオシドからなるギャップマである。いくつかの実施形態では、M O E ギャップマは、設計 [M O E]₁₋₈ - [領域 G]₅₋₁₆ - [M O E]₁₋₈、例えば [M O E]₂₋₇ - [了解 G]₆₋₁₄ - [M O E]₂₋₇、例えば [M O E]₃₋₆ - [領域 G]₈₋₁₂ - [M O E]₃₋₆ のものであり、ここで、領域 G はギャップマの定義に規定した通りである。5 - 10 - 5 設計 (M O E - D N A - M O E) を有する M O E ギャップマは、当該技術分野で広く使用されている。

【 0 1 9 9 】

混合ウイングギャップマ

混合ウイングギャップマは、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 - R N A 単位、2' - O - メチル - R N A、2' - アミノ - D N A 単位、2' - フルオロ - D N A 単位、2' - アルコキシ - R N A、M O E 単位、アラビノ核酸 (A N A) 単位、及び 2' - フルオロ - A N A 単位からなる群より独立して選択される 2' 置換ヌクレオシド、例えば M O E ヌクレオシドを含む L N A ギャップマである。いくつかの実施形態では、領域 F 及び F' の少なくとも一方、又は領域 F 及び F' の両方が、少なくとも 1 つの L N A ヌクレオシドを含み、領域 F 及び F' の残りのヌクレオシドは、M O E 及び L N A からなる群より独立して選択される。いくつかの実施形態では、領域 F 及び F' の少なくとも一方、又は領域 F 及び F' の両方が、少なくとも 2 つの L N A ヌクレオシドを含み、領域 F 及び F' の残りのヌクレオシドは、M O E 及び L N A からなる群より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 つ以上の D N A ヌクレオシドを更にも含む。

【 0 2 0 0 】

混合ウイングギャップマ設計は、国際公開第 W O 2 0 0 8 / 0 4 9 0 8 5 号及び国際公

10

20

30

40

50

開第WO2012/109395号(これらの両方は参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0201】

交互フランクギャップマ

隣接領域は、LNA及びDNAヌクレオシドの両方を含み得、それらがLNA-DNA-LNAヌクレオシドの交互モチーフを含むので、「交互フランク」と称される。このような交互フランクを含むギャップマは、「交互フランクギャップマ」と称される。「交互フランクギャップマ」はLNAギャップマオリゴヌクレオチドであり、フランクの少なくとも一方(F又はF')が、LNAヌクレオシド(複数可)に加えてDNAを含む。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及びF'の両方は、LNAヌクレオシド及びDNAヌクレオシドの両方を含む。そのような実施形態では、隣接領域F若しくはF'、又はF及びF'の両方は、少なくとも3つのヌクレオシドを含み、ここで、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。

10

【0202】

交互フランクLNAギャップマは、国際公開第WO2016/127002号に開示されている。

【0203】

交互フランク領域は、1~2個、又は1個、又は2個、又は3個の連続したDNAヌクレオシドといった最大3個の連続DNAヌクレオシドを含むことができる。

20

【0204】

交互フラック(f l a k)は、いくつかのLNAヌクレオシド(L)、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]1-4-[L]1-3

[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2を表す一連の整数として注解することができる。

【0205】

オリゴヌクレオチド設計においては、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におけるフランクの長さ(領域F及びF')は、独立して、3~10ヌクレオシド、例えば4~8ヌクレオシド、例えば5~6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。いくつかの実施形態では、ギャップマオリゴヌクレオチド中のフランクの一方のみが交互であるが、他方はLNAヌクレオチドから構成される。更なる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。一実施形態では、交互フランクギャップマ内のフランクは、全長5~8個のヌクレオシドを有し、そのうちの3~5個はLNAヌクレオシドである。交互フランクを有するオリゴヌクレオチドのいくつかの例は：

30

[L]1-5-[D]1-4-[L]1-3-[G]5-16-[L]2-6

[L]1-2-[D]2-3-[L]3-4-[G]5-7-[L]1-2-[D]2-3-[L]2-3

40

[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2-[D]1-2-[L]1-2-[G]5-16-[L]1-2-[D]1-3-[L]2-4

[L]1-5-[G]5-16-[L]-[D]-[L]-[D]-[L]2

[L]4-[G]6-10-[L]-[D]3-[L]2であるが、

ただし、ギャップマの全長は、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。

【0206】

オリゴヌクレオチドにおける領域D'又はD''

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、標的核酸に相補的なオリゴ

50

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 $F - G - F'$ 、並びに更に $5'$ 及び $3'$ ヌクレオシドを含むか又はそれからなり得る。更なる $5'$ 及び $3'$ ヌクレオシドは、標的核酸に完全に相補的であってもよく、又は完全に相補的でなくてもよい。このような更なる $5'$ 及び $3'$ ヌクレオシドは、本明細書で領域 D' 及び D'' と称され得る。

【0207】

領域 D' 又は D'' の追加は、連続ヌクレオチド配列、例えばギャップマなどをコンジュゲート部分又は別の官能基に連結することを目的として用いられ得る。連続ヌクレオチド配列をコンジュゲート部分に連結するのに使用される場合、生体切断可能なリンカ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 (exonuclease) 10 保護を提供するために、又は合成若しくは製造を容易にするために使用され得る。

【0208】

領域 D' 及び D'' は、各々、領域 F の $5'$ 末端又は領域 F' の $3'$ 末端に結合され得、以下の式 $D' - F - G - F'$ 、 $F - G - F' - D''$ 又は

【0209】

$D' - F - G - F' - D''$ 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部分であり、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。

【0210】

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 20 か又はそれからなり、これは標的核酸に相補的であっても、又は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、例えば、DNA若しくはRNA又はこれらの塩基修飾バージョンなどの糖修飾ヌクレオチドではない。 D' 及び D'' 領域は、ヌクレアーゼ感受性の生体切断可能なリンカとしての役割を果たし得る (リンカ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 $3'$ 末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で連結され、DNA又はRNAである。領域 D' 及び 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は、国際公開第WO2014/076195号に開示されており、これは例としてホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドを含む。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の使用は国際公開第WO 2015/113922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。 30

【0211】

一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、ギャップマを構成する連続ヌクレオチド配列に加えて、領域 D' 及び $3'$ ヌクレオシドを含む。

【0212】

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、以下の式により表すことができる：

$F - G - F'$; 特に、 $F_2 - 8 - G_{6-16} - F'_{2-8}$

$D' - F - G - F'$ 、特に $D'_{3-8} - F_{1-8} - G_{6-16} - F'_{2-8}$

$F - G - F' - D''$ 、特に $F_8 - G_{6-16} - F'_{2-8} - D''_{1'-3}$

$D' - F - G - F' - D''$ 、特に $D'_{3-8} - F_{2-8} - G_{6-16} - F'_{2-8} - D''_{1'-3}$ 40

【0213】

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。

【0214】

コンジュゲート

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

【0215】

1つ以上の非ヌクレオチド部分に対する本発明のオリゴヌクレオチド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、オリゴヌクレオチドの薬理学を改善することができる。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、それにより、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増強し得る。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低減するのに役立ち得る（例えば、非標的細胞型、組織、又は器官内のオフターゲット活性又は活性）。

10

【0216】

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、Manoharan、「Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications」、S.T. Crooke編、第16章、Marcel Dekker, Inc. (2001年)及びManoharan、「Antisense and Nucleic Acid Drug Development」(2002年)第12巻第103頁による包括的レビューにおいても報告されており、その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0217】

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（例えば、GalNAc）、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）、又はそれらの組合せからなる群より選択される。

20

【0218】

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WO2012/143379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。

【0219】

リンカ

結合又はリンカは、1つ以上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結合する、2つの原子間の接続である。コンジュゲート部分は、直接、又は結合部分（例えば、リンカ又はテザー）を介してオリゴヌクレオチドに付着させることができる。リンカは、例えばコンジュゲート部分などの第3の領域（領域C）を、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などの第1の領域（領域A）に共有結合的に連結するのに役立つ。

30

【0220】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明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、場合により、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又は第1の領域）の間に位置するリンカ領域（第2の領域又は領域B及び/又は領域Y）と、コンジュゲート部分（領域C又は第3の領域）とを含み得る。

40

【0221】

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を指す。生理学的に不安定なリンカが化学的変換（例えば、切断）を受ける条件には、pH、温度、酸化若しくは還元条件、又は薬剤などの化学条件、及び哺乳動物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また、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。一実施形態では、生体切断可能なリンカは、S1ヌクレアーゼ切断

50

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は、1～10のヌクレオシド、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のヌクレオシドを含み、より好ましくは2～6のヌクレオシドを含み、最も好ましくは2～4の連結されたヌクレオシドを含み、これは少なくとも3又は4又は5の連続したホスホジエステル結合といった少なくとも2つの連続ホスホジエステル結合を含む。好ましくは、ヌクレオシドはDNA又はRNAである。ホスホジエステルを含む生体切断可能なリンカは、国際公開第WO2014/076195号（参照により本明細書に組み込まれる）により詳細に記載されている。

【0222】

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を指す。領域Yリンカは、エチレングリコール、アミノ酸単位、又はアミノアルキル基などの反復単位の鎖構造又は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、以下の領域要素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（領域Y）は、例えばC2-C36アミノアルキル基などのアミノアルキルであり、例えば、C6-C12アミノアルキル基を含む。好ましい実施形態では、リンカ（領域Y）は、C6アミノアルキル基である。

【0223】

治療

用語「治療」とは、本明細書で使用される場合、既存の疾患（例えば、本明細書で言及される疾患又は障害）の治療、又は疾患の予防（prevention）、すなわち予防（prophylaxis）の両方を指す。したがって、本明細書で言及される治療は、いくつかの実施形態では、予防的であり得ることが認識されるであろう。

【0224】

いくつかの実施形態では、治療は、タウオパチ、アルツハイマ病（AD）、進行性核上性麻痺（PSP）、大脳皮質基底核変性症（CBD）、慢性外傷性脳症（CTE）、前頭側頭型認知症（FTD）及び17番染色体連鎖しパーキンソニズムを伴うFTD（FTDP-17）、ピック病（PiD）、嗜銀性顆粒病（AGD）、変化優位型老年認知症（TSPSD）、原発性年齢関連タウオパチ（PART）、ダウン症候群、並びにリティコ-ボディグ病を含む神経変性疾患からなる群より選択された神経学的障害などの、神経学的障害と診断されている患者に実施される。病理学的Tauのアップレギュレーションは、一側性巨脳症（hemimegalencephaly：HME）、結節性硬化症、限局性皮質異形成2b型、及び神経節膠腫を含む小児タウオパチ（infantile Tauopathies）と関連する。加えて、異常なTau発現及び/又は機能は、脳内鉄沈着を伴う神経変性症1型（neurodegeneration with brain iron accumulation type 1：NBIA1）としても知られるハラールホルデン・スパッツ症候群、神経節細胞腫、及び亜急性硬化性全脳炎のような他の疾患とも関連する可能性がある。Tauはまた、発作性障害（例えば、てんかん）、ネットワーク機能障害（例えば、抑鬱）、及び運動障害（例えば、パーキンソン病）においても役割を果たし得る。

【発明を実施するための形態】

【0225】

本発明のオリゴヌクレオチド

本発明は、Tauの発現を調節する、例えばTauを阻害（ダウンレギュレート）することができるオリゴヌクレオチドに関する。この調節は、Tauをコードする標的核酸にハイブリダイズすることによって達成される。標的核酸は、配列番号1及び2からなる群より選択される配列などの哺乳動物MAPT mRNA配列であり得る。

【0226】

本発明のオリゴヌクレオチドは、Tau発現の低下をもたらすMAPTを標的とするア

10

20

30

40

50

ンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0227】

いくつかの実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、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、本発明のオリゴヌクレオチドは、初代神経細胞への5 μ Mオリゴヌクレオチドの適用後、インビトロで少なくとも60%又は70%だけTau mRNAの発現レベルを阻害することができる。いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、初代神経細胞への0.5 μ Mオリゴヌクレオチドの適用後、インビトロで少なくとも50%だけTauタンパク質の発現レベルを阻害することができる。好適には、実施例は、Tau RNA又はタンパク質阻害を測定するために用いられ得るアッセイを提供する（例えば、実施例1及び実施例3）。標的調節は、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、本発明の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、Tau発現の所望の調節を示すのに更に十分であり得る。ミスマッチから生じる結合親和性の低下は、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。

【0228】

本発明の一態様は、配列番号3、4、又は5に対して少なくとも90%の相補性を有する10ヌクレオチド長の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に関する。

【0229】

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、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。

【0230】

本発明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。

【0231】

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の12051~12111位、39562~39593位、又は72837~72940位内の連続ヌクレオチドに完全に（又は100%）相補的であるなど、少なくとも90%相補的である、10~30ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1及び配列番号2に存在する対応する標的核酸領域に対して100%相補的である。

【0233】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、表4に列挙された領域の1つから選択される標的配列に相補的である場合に有利である。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の連続ヌクレオチド配列は、少なくとも90%相補的であり、例えば選択されたR1-R2254標的配列（表4）に対して完全に相補的である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド配列は、R__223、R__738、又はR__1298（表4参

10

20

30

40

50

照) に対して 100% 相補的である。

【0234】

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、標的核酸の領域に対して 90% 相補的、例えば完全に相補的である。ここで、該標的核酸領域は、配列番号 1 の 12051 ~ 12111 位、例えば配列番号 1 の 12051 ~ 12079 位、12085 ~ 12111 位、又は 12060 ~ 12078 位からなる群より選択される。

【0235】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に対して 90% 相補的、例えば完全に相補的である。ここで、該標的核酸領域は、配列番号 1 の 39562 ~ 39593 位、例えば配列番号 1 の 39573 ~ 39592 位からなる群より選択される。

10

【0236】

別の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に対して 90% 相補的、例えば完全に相補的である。ここで、該標的核酸領域は、配列番号 1 の 72837 - 72940 位、例えば配列番号 1 の 72861 ~ 72891 位又は 72862 ~ 72890 位からなる群より選択される。

【0237】

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 の 12060 ~ 12078 位、又は 39573 ~ 39592 位、又は 72862 ~ 72890 位内の連続ヌクレオチドに 100% 相補的な長さで 16 ~ 22 ヌクレオチド、例えば 16 ~ 20 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。

20

【0238】

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、10 ~ 35 ヌクレオチド長、例えば 10 ~ 30、例えば 11 ~ 25、例えば 12 ~ 22、例えば 14 ~ 20、又は 14 ~ 18 連続ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、16 ~ 22 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、16 ~ 20 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0239】

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 16、17、18、19、又は 20 のヌクレオチドを含むか又はそれからなる。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。

30

【0240】

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、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30 連続ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、16、17、18、19、又は 20 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

40

【0241】

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 5 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からなる (材料及び方法セクション)。

【0242】

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 6 ~ 65 (表 5 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% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0243】

50

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 9、11、49、53、56、及び 62（表 5 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% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0244】

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 6 ~ 37（表 5 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% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0245】

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 9 又は 11（表 5 に列挙したモチーフ配列を参照）の配列と少なくとも 90% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0246】

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 38 ~ 51（表 5 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% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0247】

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 49 又は 51（表 5 に列挙したモチーフ配列を参照）の配列と少なくとも 90% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0248】

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 52 ~ 65（表 5 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% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【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 56 又は 62（表 5 に列挙したモチーフ配列を参照）の配列と少なくとも 90% 同一性、好ましくは 100% 同一性である 10 ~ 30 ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0250】

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。

【0251】

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。

【0252】

本発明のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド及び DNA ヌクレオシ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。

【0253】

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」、及びロッキング核酸 (LNA) の「定義」セクションに記載されている。

【0254】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1 つ以上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、本発明の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より独立して選択される 1 つ以上の 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 つ以上がロッキング核酸 (LNA) である場合、有利である。

10

【0255】

更なる実施形態では、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。連続ヌクレオチド配列内の少なくとも 75 %、例えば 80 %、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又はボラノホスフェートヌクレオシド間結合である場合、有利である。いくつかの実施形態では、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。

【0256】

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、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における修飾ヌクレオシドの少なくとも 75 % は LNA ヌクレオシドであり、修飾ヌクレオシドの例えば 80 %、例えば 85 %、例えば 90 % は、LNA ヌクレオシド、特に - D - オキシ LNA 又は S c E T である。尚更なる実施形態では、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。更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、- D - オキシ - LNA と、以下の LNA ヌクレオシド： - D 又は - L 立体配置のいずれかのチオ - LNA、アミノ - LNA、オキシ - LNA、S c E T、及び / 又は ENA の 1 つ以上との両方、又はそれらの組合せを含んでもよい。更なる実施形態では、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。

20

30

【0257】

本発明の一実施形態では、本発明の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。

【0258】

本発明において、有利な構造設計は、例えば、「ギャップマ」、「LNA ギャップマ」、「MOE ギャップマ」、及び「混合ウイングギャップマ」、「交互フランクギャップマ」の「定義」セクションに記載されているギャップマ設計である。ギャップマ設計には、均一フランク、混合ウイングフランク、交互フランク、及びギャップブレーカ設計のギャップマが含まれる。本発明では、本発明のオリゴヌクレオチドは、F - G - F' 設計のギャップマ、特に式 5' - F - G - F' - 3' のギャップマである場合に有利であり、ここで、領域 F 及び F' は独立して 1 ~ 8 個のヌクレオシドを含み、そのうちの 2 ~ 5 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 を動員することができる 6 ~ 16 個のヌクレオシドの領域、例えば 6 ~ 16 個の DNA ヌクレオシドを含む領域である。

40

【0259】

いくつかの実施形態では、ギャップマは、LNA ギャップマである。

50

【 0 2 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態では、LNAギャップマは、以下の均一なフランク設計 4 - 1 0 - 4、3 - 1 1 - 4、4 - 1 1 - 4、4 - 1 2 - 4、又は 4 - 1 4 - 2 から選択される。

【 0 2 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態では、LNAギャップマは、以下の交互フランク設計 3 - 1 - 3 - 1 0 - 2、1 - 3 - 4 - 6 - 1 - 3 - 2、1 - 2 - 1 - 2 - 2 - 8 - 4、又は 3 - 3 - 1 - 8 - 2 - 1 - 2 から選択される。

【 0 2 6 2 】

表 5 (材料及び方法セクション) は、各モチーフ配列の好ましい設計を列挙する。

10

【 0 2 6 3 】

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'' を更に含み得る。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、ギャップマ領域の 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チド単位、例えば DNA 単位を有する。

【 0 2 6 4 】

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 6__1、7__1、8__1、9__1、9__2、9__3、9__4、9__5、9__6、9__7、9__8、9__9、9__10、9__11、9__12、9__13、9__14、9__15、9__16、9__17、9__18、9__19、9__20、9__21、9__22、9__23、9__24、9__25、9__26、9__27、9__28、9__29、9__30、9__31、9__32、9__33、9__34、9__35、9__36、9__37、9__38、9__39、9__40、9__41、9__42、9__43、9__44、9__45、9__46、9__47、9__48、9__49、9__50、9__51、9__52、9__53、9__54、9__55、9__56、9__57、9__58、9__59、9__60、9__61、9__62、9__63、9__64、9__65、9__66、9__67、9__68、9__69、9__70、9__71、9__72、9__73、9__74、9__75、9__76、9__77、9__78、9__79、9__80、9__81、9__82、9__83、9__84、9__85、9__86、9__87、9__88、9__89、9__90、9__91、9__92、9__93、9__94、9__95、9__96、9__97、9__98、9__99、9__100、9__101、9__102、9__103、9__104、9__105、9__106、10__1、10__2、10__3、10__4、10__5、10__6、10__7、10__8、10__9、10__10、10__11、10__12、10__13、10__14、10__15、10__16、10__17、10__18、10__19、10__20、10__21、10__22、10__23、10__24、10__25、10__26、10__27、10__28、10__29、10__30、10__31、10__32、10__33、10__34、10__35、10__36、10__37、10__38、10__39、10__40、10__41、10__42、10__43、10__44、10__45、10__46、10__47、10__48、10__49、10__50、10__51、10__52、10__53、10__54、10__55、10__56、10__57、10__58、10__59、10__60、10__61、10__62、10__63、10__64、10__65、10__66、10__67、10__68、10__69、10__70、10__71、10__72、10__73、10__74、10__75、10__76、10__77、10__78、10__79、10__80、10__81、10__82、10__83、10__84、10__85、10__86、10__87、10__88、10__89、11__1、12__1、13__1、14__1、15__1、16__1、17__1、18__1、19__1、20__1、21__1、22__1、23__1、24__1、24__2、24__3、24__4、24__5、24__6、24__7、24__8、24__9、24__10、24__11、24__12、24__13、24__14、24__15、24__16、24__17、24__18、24__19、24__20、24__21、24__22、24__23、24__24、24__25、24__26、24__27、24

20

30

40

50

_ 2 8、2 4 _ 2 9、2 4 _ 3 0、2 4 _ 3 1、2 4 _ 3 2、2 4 _ 3 3、2 4 _ 3 4、
 2 4 _ 3 5、2 4 _ 3 6、2 4 _ 3 7、2 4 _ 3 8、2 4 _ 3 9、2 4 _ 4 0、2 4 _ 4
 1、2 4 _ 4 2、2 4 _ 4 3、2 4 _ 4 4、2 4 _ 4 5、2 4 _ 4 6、2 4 _ 4 7、2 4
 _ 4 8、2 4 _ 4 9、2 4 _ 5 0、2 4 _ 5 1、2 4 _ 5 2、2 4 _ 5 3、2 4 _ 5 4、
 2 4 _ 5 5、2 4 _ 5 6、2 4 _ 5 7、2 4 _ 5 8、2 4 _ 5 9、2 4 _ 6 0、2 4 _ 6
 1、2 4 _ 6 2、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 5 _ 1 0、2 5 _ 1 1、2 5 _ 1 2、2 5 _ 1 3、2 5 _
 1 4、2 5 _ 1 5、2 5 _ 1 6、2 5 _ 1 7、2 5 _ 1 8、2 5 _ 1 9、2 5 _ 2 0、2
 5 _ 2 1、2 5 _ 2 2、2 5 _ 2 3、2 5 _ 2 4、2 5 _ 2 5、2 5 _ 2 6、2 5 _ 2 7
 、2 5 _ 2 8、2 5 _ 2 9、2 5 _ 3 0、2 5 _ 3 1、2 5 _ 3 2、2 5 _ 3 3、2 5 _
 3 4、2 5 _ 3 5、2 5 _ 3 6、2 5 _ 3 7、2 5 _ 3 8、2 5 _ 3 9、2 5 _ 4 0、2
 5 _ 4 1、2 5 _ 4 2、2 5 _ 4 3、2 6 _ 1、2 6 _ 2、2 6 _ 3、2 6 _ 4、2 6 _
 5、2 6 _ 6、2 6 _ 7、2 6 _ 8、2 6 _ 9、2 6 _ 1 0、2 6 _ 1 1、2 6 _ 1 2、
 2 6 _ 1 3、2 6 _ 1 4、2 6 _ 1 5、2 6 _ 1 6、2 6 _ 1 7、2 6 _ 1 8、2 6 _ 1
 9、2 6 _ 2 0、2 6 _ 2 1、2 6 _ 2 2、2 6 _ 2 3、2 6 _ 2 4、2 6 _ 2 5、2 6
 _ 2 6、2 6 _ 2 7、2 6 _ 2 8、2 6 _ 2 9、2 6 _ 3 0、2 6 _ 3 1、2 7 _ 1、2
 8 _ 1、2 8 _ 2、2 8 _ 3、2 8 _ 4、2 8 _ 5、2 8 _ 6、2 8 _ 7、2 8 _ 8、2
 8 _ 9、2 8 _ 1 0、2 8 _ 1 1、2 8 _ 1 2、2 8 _ 1 3、2 8 _ 1 4、2 8 _ 1 5、
 2 8 _ 1 6、2 8 _ 1 7、2 8 _ 1 8、2 8 _ 1 9、2 8 _ 2 0、2 8 _ 2 1、2 8 _ 2
 2、2 8 _ 2 3、2 8 _ 2 4、2 8 _ 2 5、2 8 _ 2 6、2 8 _ 2 7、2 8 _ 2 8、2 8
 _ 2 9、2 8 _ 3 0、2 8 _ 3 1、2 8 _ 3 2、2 8 _ 3 3、2 9 _ 1、2 9 _ 2、2 9
 _ 3、2 9 _ 4、2 9 _ 5、2 9 _ 6、2 9 _ 7、2 9 _ 8、2 9 _ 9、2 9 _ 1 0、2
 9 _ 1 1、2 9 _ 1 2、2 9 _ 1 3、2 9 _ 1 4、3 0 _ 1、3 0 _ 2、3 0 _ 3、3 0
 _ 4、3 0 _ 5、3 0 _ 6、3 0 _ 7、3 0 _ 8、3 0 _ 9、3 0 _ 1 0、3 0 _ 1 1、
 3 0 _ 1 2、3 0 _ 1 3、3 0 _ 1 4、3 0 _ 1 5、3 0 _ 1 6、3 0 _ 1 7、3 0 _ 1
 8、3 0 _ 1 9、3 0 _ 2 0、3 0 _ 2 1、3 0 _ 2 2、3 0 _ 2 3、3 0 _ 2 4、3 0
 _ 2 5、3 1 _ 1、3 1 _ 2、3 1 _ 3、3 2 _ 1、3 2 _ 2、3 2 _ 3、3 2 _ 4、3
 2 _ 5、3 2 _ 6、3 2 _ 7、3 2 _ 8、3 2 _ 9、3 2 _ 1 0、3 2 _ 1 1、3 2 _ 1
 2、3 2 _ 1 3、3 2 _ 1 4、3 2 _ 1 5、3 2 _ 1 6、3 2 _ 1 7、3 2 _ 1 8、3 2
 _ 1 9、3 2 _ 2 0、3 2 _ 2 1、3 2 _ 2 2、3 2 _ 2 3、3 2 _ 2 4、3 2 _ 2 5、
 3 2 _ 2 6、3 2 _ 2 7、3 2 _ 2 8、3 2 _ 2 9、3 2 _ 3 0、3 2 _ 3 1、3 2 _ 3
 2、3 2 _ 3 3、3 2 _ 3 4、3 2 _ 3 5、3 2 _ 3 6、3 2 _ 3 7、3 2 _ 3 8、3 2
 _ 3 9、3 2 _ 4 0、3 2 _ 4 1、3 2 _ 4 2、3 2 _ 4 3、3 2 _ 4 4、3 2 _ 4 5、
 3 2 _ 4 6、3 2 _ 4 7、3 2 _ 4 8、3 2 _ 4 9、3 2 _ 5 0、3 2 _ 5 1、3 3 _ 1
 、3 3 _ 2、3 3 _ 3、3 3 _ 4、3 3 _ 5、3 3 _ 6、3 3 _ 7、3 3 _ 8、3 3 _ 9
 、3 3 _ 1 0、3 3 _ 1 1、3 3 _ 1 2、3 3 _ 1 3、3 3 _ 1 4、3 3 _ 1 5、3 3 _
 1 6、3 3 _ 1 7、3 3 _ 1 8、3 3 _ 1 9、3 3 _ 2 0、3 3 _ 2 1、3 3 _ 2 2、3
 3 _ 2 3、3 3 _ 2 4、3 3 _ 2 5、3 3 _ 2 6、3 3 _ 2 7、3 3 _ 2 8、3 3 _ 2 9
 、3 3 _ 3 0、3 3 _ 3 1、3 3 _ 3 2、3 3 _ 3 3、3 4 _ 1、3 5 _ 1、3 5 _ 2、
 3 5 _ 3、3 6 _ 1、3 7 _ 1、3 8 _ 1、3 9 _ 1、4 0 _ 1、4 1 _ 1、4 2 _ 1、
 4 3 _ 1、4 4 _ 1、4 5 _ 1、4 6 _ 1、4 7 _ 1、4 8 _ 1、4 9 _ 1、4 9 _ 2、
 4 9 _ 3、4 9 _ 4、4 9 _ 5、4 9 _ 6、4 9 _ 7、4 9 _ 8、4 9 _ 9、4 9 _ 1 0
 、4 9 _ 1 1、4 9 _ 1 2、4 9 _ 1 3、4 9 _ 1 4、4 9 _ 1 5、4 9 _ 1 6、4 9 _
 1 7、4 9 _ 1 8、4 9 _ 1 9、4 9 _ 2 0、4 9 _ 2 1、4 9 _ 2 2、4 9 _ 2 3、4
 9 _ 2 4、4 9 _ 2 5、4 9 _ 2 6、4 9 _ 2 7、4 9 _ 2 8、4 9 _ 2 9、4 9 _ 3 0
 、4 9 _ 3 1、4 9 _ 3 2、4 9 _ 3 3、4 9 _ 3 4、4 9 _ 3 5、4 9 _ 3 6、4 9 _
 3 7、4 9 _ 3 8、4 9 _ 3 9、4 9 _ 4 0、4 9 _ 4 1、4 9 _ 4 2、4 9 _ 4 3、4
 9 _ 4 4、4 9 _ 4 5、4 9 _ 4 6、4 9 _ 4 7、4 9 _ 4 8、4 9 _ 4 9、4 9 _ 5 0
 、4 9 _ 5 1、4 9 _ 5 2、4 9 _ 5 3、4 9 _ 5 4、4 9 _ 5 5、4 9 _ 5 6、4 9 _
 5 7、4 9 _ 5 8、4 9 _ 5 9、4 9 _ 6 0、4 9 _ 6 1、4 9 _ 6 2、4 9 _ 6 3、4

10

20

30

40

50

9__64、49__65、49__66、49__67、49__68、49__69、49__70、
49__71、49__72、49__73、49__74、49__75、49__76、49__
77、49__78、49__79、49__80、49__81、49__82、49__83、4
9__84、49__85、49__86、49__87、49__88、49__89、49__90
、49__91、49__92、49__93、49__94、49__95、49__96、49__
97、49__98、49__99、49__100、49__101、49__102、49__1
03、49__104、49__105、49__106、49__107、49__108、49
__109、49__110、49__111、49__112、49__113、49__114、
49__115、49__116、49__117、49__118、49__119、49__12
0、49__121、49__122、49__123、49__124、49__125、49__
126、49__127、49__128、49__129、49__130、49__131、4
9__132、49__133、49__134、49__135、49__136、49__137
、49__138、49__139、49__140、49__141、49__142、49__1
43、49__144、49__145、49__146、49__147、49__148、49
__149、49__150、49__151、49__152、49__153、49__154、
49__155、49__156、49__157、49__158、49__159、49__16
0、49__161、49__162、49__163、49__164、49__165、49__
166、49__167、49__168、49__169、49__170、49__171、4
9__172、49__173、49__174、49__175、49__176、49__177
、49__178、49__179、49__180、49__181、49__182、49__1
83、49__184、49__185、49__186、49__187、49__188、49
__189、49__190、49__191、49__192、50__1、51__1、52__1
、53__1、54__1、55__1、56__1、57__1、58__1、59__1、60__1
、61__1、62__1、63__1、64__1、及び65__1を有するオリゴヌクレオチド
化合物の群から選択される。

10

20

【0265】

本発明のある特定の実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP番号9__102、
9__103、9__104、11__1、49__38、49__51、49__179、49__
189、53__1、56__1、及び62__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。

30

【0266】

本発明のある特定の実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP番号9__102
、9__103、9__104、及び11__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。

【0267】

本発明のある特定の実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP番号49__38
、49__51、49__179、及び49__189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。

【0268】

本発明のある特定の実施形態について、オリゴヌクレオチドは、CMP番号53__1、
56__1、及び62__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。
本発明の文脈における特定の有利なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

40

【化 4】

CTTtAATtttaatcactcAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__102
CTTTaattttaatcacTCAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__103
CTTTaattttaatcaCtCAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__104
CTTTaattttaatcaCTCA	配列番号 11 ; CMP 番号 11__1
TtaaCTCAaatcaatTtctCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__38
TtaActCAaatcaatTtCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__51
TTAactCaaatcaatTtCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__179
TTAActcaaatcaatTtCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__189
CAACacccittttaattcATTA	配列番号 53 ; CMP 番号 53__1
CTCAtcacacccittttaatt	配列番号 56 ; CMP 番号 56__1
TTAactcatcaacaCCTT	配列番号 62 ; CMP 番号 62__1

10

からなる群より選択されるオリゴヌクレオチド化合物である。

【0269】

ここで、大文字が - D - オキシ LNAヌクレオシドであり、小文字が DNAヌクレオシドであり、全 LNA C が 5 - メチルシトシンであり、全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。

【0270】

20

一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図 2 に示すように、CMP 番号 9__103 である。

【0271】

一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図 3 に示すように、CMP 番号 9__104 である。

【0272】

一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図 4 に示すように、CMP 番号 11__1 である。

【0273】

一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図 5 に示すように、CMP 番号 49__38 である。

30

【0274】

一実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、図 6 に示すように、CMP 番号 49__189 である。

【0275】

製造方法

更なる態様では、本発明は、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、本発明のオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供する。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）。更なる実施形態では、この方法は、連続ヌクレオチド配列を結合（conjugating）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更に含む。更なる態様では、本発明のオリゴヌクレオチド又は結合オリゴヌクレオチドを薬学的に許容される希釈剤、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、本発明の組成物を製造する方法が提供される。

40

【0276】

薬学的塩

本発明に係る化合物は、それらの薬学的に許容される塩の形態で存在し得る。用語「薬学的に許容される塩」とは、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

50

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水酸化物、例えばテトラメチルアンモニウム水酸化物から誘導されるものが含まれる。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、及び溶解性を向上させるために、薬剤師によく知られている手法である。これは例えば、Bastin、「Organic Process Research & Development」(2000年)第4巻第427～435頁、又はAnsel、「In: Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems」第6版(1995年)第196頁及び第1456～1457頁に記載されている。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る塩は、ナトリウム塩であり得る。

【0277】

更なる態様では、本発明は、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の薬学的に許容される塩を提供する。好ましい実施形態では、薬学的に許容される塩は、ナトリウム又はカリウム塩である。

【0278】

医薬組成物

更なる態様では、本発明は、前述のオリゴヌクレオチド及び/又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート又はその塩のいずれかと、薬学的に許容される希釈剤、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。薬学的に許容される希釈剤には、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline: PBS)が含まれ、薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩及びカリウム塩が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される希釈剤は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、50～300 µM 溶液の濃度で薬学的に許容される希釈剤中で使用される。

【0279】

本発明での使用に適した製剤は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Company(ペンシルベニア州フィラデルフィア)第17版(1985年)に見られる。薬物送達の方法の簡単なレビューについては、例えば、Langer(「Science」第249巻第1527～1533頁(1990年))を参照のこと。国際公開第WO2007/031091号は、薬学的に許容される希釈剤、担体及びアジュバントの更に適切で好ましい例を提供する(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、他の治療薬との組合せ、プロドラッグ製剤もまた、国際公開第WO2007/031091号に提供されている。

【0280】

本発明の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、医薬組成物又は製剤の調製のために、薬学的に許容される活性又は不活性物質と混合されてもよい。医薬組成物の処方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。

【0281】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌され得るか、又は滅菌してフィルタにかけられ得る。得られた水溶液は、そのまま使用するために包装するか、又は凍結乾燥することができ、凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌水性担体と組み合わせられる。調製物のpHは、典型的には3～11、より好ましくは5～9又は6～8、最も好ましくは7～8、例えば7～7.5であろう。得られた固体形態の組成物は、錠剤又はカプセルの密封パッケージなどのように、各々が上記の薬剤又は薬剤群の固定量を含む複数の単回用量

10

20

30

40

50

単位で包装することができる。固体形態の組成物はまた、局所適用可能なクリーム又は軟膏用に設計された絞り出し可能なチューブなどの柔軟な量の容器に包装することもできる。

【0282】

いくつかの実施形態では、本発明の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、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、コンジュゲート部分はオリゴヌクレオチドから切断される。

【0283】

用途

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、診断、治療及び予防のための研究試薬として利用され得る。

10

【0284】

研究では、そのようなオリゴヌクレオチドを使用して、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T a u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。

【0285】

本発明のオリゴヌクレオチドを研究又は診断に使用する場合、標的核酸は、DNA又はRNAに由来するcDNA又は合成核酸であり得る。

20

【0286】

本発明は、T a uを発現している標的細胞におけるT a u発現調節用インビボ又はインビトロ方法を提供し、該方法は、本発明のオリゴヌクレオチドを該細胞に有効量で投与することを含む。

【0287】

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、脳又は中枢神経系に存在する。特に、脳幹、小脳、大脳皮質（cerebral cortex）、前頭皮質、髄質／能橋及び中脳、並びに脊髄の細胞は、関連する標的領域である。進行性核上性麻痺（progressive supranuclear palsy：PSP）の治療には、脳領域の髄質／能橋及び中脳における標的縮小が有利である。アルツハイマーの治療には、能領域の大脳皮質、髄質／能橋、中脳領域の標的縮小が有利である。特にニューロンでは、神経細胞、神経細胞、軸索、及び基底核が重要な細胞型である。

30

【0288】

診断では、オリゴヌクレオチドを使用して、ノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、又は同様の技術により、細胞及び組織におけるMAPT発現を検出及び定量することができる。

【0289】

治療のために、オリゴヌクレオチドは、T a uの発現を調節することによって治療することができる疾患又は障害を有することが疑われる動物又はヒトに投与することができる。

40

【0290】

本発明は、治療的又は予防的に有効な量の本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物を、疾患に罹患する又は罹り易い対象に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法を提供する。

【0291】

本発明はまた、薬品として使用するための、本明細書で定義されるオリゴヌクレオチド、組成物、又はコンジュゲートに関する。

【0292】

50

本発明に係るオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物は、典型的には有効量で投与される。

【0293】

本発明はまた、本明細書で言及される障害の治療のための薬品の製造のため、又は本明細書で言及される障害の治療の方法のために記載される本発明の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の使用を提供する。

【0294】

本明細書で言及される疾患又は障害は、T a u の発現に関連している。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、T a u 遺伝子、又はそのタンパク質産物がT a u と関連するか又は相互作用する遺伝子における突然変異と関連し得る。したがって、いくつかの実施形態では、標的核酸はT a u 配列の変異形態であり、他の実施形態では、標的核酸はT a u 配列の調節因子である。

10

【0295】

本発明の方法は、好ましくは、T a u の異常なレベル及び/又は活性によって引き起こされる疾患の治療又は予防のために使用される。

【0296】

本発明は更に、T a u の異常なレベル及び/又は活性を治療するための薬品を製造するための、本明細書で定義されるオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物の使用に関する。

【0297】

20

一実施形態では、本発明は、以下から選択される疾患又は障害の治療に使用するためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物に関する。ここで、該疾患は、タウオパチ、アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、大脳皮質基底核変性症 (C B D)、慢性外傷性脳症 (C T E)、前頭側頭型認知症 (F T D)、F T D P - 17、ピック病 (P i D)、嗜銀性顆粒病 (A G D)、変化優位型老年認知症 (T P S D)、原発性年齢関連タウオパチ (P A R T)、ダウン症候群、リティコ - ボディグ病、小児タウオパチ (一側性巨脳症 (H M E)、結節性硬化症、限局性皮質異形成 2 b 型、神経節腫、ハラーホルデン・スパッツ症候群、脳内鉄沈着を伴う神経変性症 1 型 (N B I A 1)、神経節細胞腫、亜急性硬化性全脳炎、発作性障害 (例えば、てんかん)、ネットワーク機能障害 (例えば、抑鬱)、及び運動障害 (例えば、パーキンソン病) を含む) から選択される。

30

【0298】

ある特定の実施形態では、該疾患は、アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、前頭側頭型認知症 (F T D)、又は F T D P - 17 から選択される。

【0299】

投与

本発明のオリゴヌクレオチド又は医薬組成物は、非経口 (静脈内、皮下、筋肉内、脳内、脳室内、眼内、又は髄腔内投与など) を介して投与することができる。

【0300】

いくつかの実施形態では、投与は、髄腔内投与を介する。

40

【0301】

有利には、例えば神経学的障害の治療のために、本発明のオリゴヌクレオチド又は医薬組成物は、髄腔内又は頭蓋内に、例えば脳内又は脳室内投与を介して投与される。

【0302】

本発明はまた、皮下投与用の剤形である薬品の製造のための、本発明の薬学的塩又は組成物などのオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートの使用を提供する。

【0303】

本発明はまた、髄腔内投与用の剤形である薬品の製造のための、本発明の薬学的塩又は組成物などの、本発明のオリゴヌクレオチド又はそのコンジュゲートの使用を提供する。

【0304】

50

本発明はまた、髄腔内投与用の剤形である薬品の製造のために記載されるような本発明の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の使用を提供する。

【0305】

併用療法

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物は、別の治療薬との併用治療で使用するためのものである。治療薬は、例えば、上記の疾患又は障害の標準的な治療薬であり得る。

【0306】

実施形態

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て使用することができる。

10

【0307】

1. 10～50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って、表4(R__1～R__2254)のいずれかの標的配列に対して少なくとも90%相補性、例えば100%相補性を有する、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、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0308】

2. 該標的配列が、標的領域R__223、R__738、又はR__1298のいずれかから選択され、それぞれ配列番号3、4、又は5に対応する、実施形態1に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【0309】

3. 該連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の12051～12111位、39562～39593位、又は72837～72940位内の連続ヌクレオチドに100%相補的である、実施形態1又は2に記載のオリゴヌクレオチド。

【0310】

4. 該連続ヌクレオチド配列が、少なくとも16ヌクレオチドであり、配列番号1の12060～12078位、39573～39592位、又は72862～72890位内の連続するヌクレオチドに100%相補的である、実施形態1～3に記載のオリゴヌクレオチド。

【0311】

5. 該オリゴヌクレオチドが、配列番号6～65からなる群より選択される配列を備える、実施形態1～4に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【0312】

6. 該オリゴヌクレオチドが、配列番号9又は11の配列を備える、実施形態1～5に記載のオリゴヌクレオチド。

【0313】

7. 該オリゴヌクレオチドが、配列番号49の配列を備える、実施形態1～5に記載のオリゴヌクレオチド。

【0314】

8. 該オリゴヌクレオチドが、配列番号53、56、及び62からなる群より選択される配列を備える、実施形態1～5に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【0315】

9. 該連続ヌクレオチド配列が、それが相補的である該標的配列と比較して、0～3個のミスマッチを有する、実施形態1、2、又は5、又6に記載のオリゴヌクレオチド。

【0316】

10. 該連続ヌクレオチド配列が、該標的配列と比較して1つのミスマッチを有する、実施形態9に記載のオリゴヌクレオチド。

【0317】

11. 該連続ヌクレオチド配列が、該標的配列と比較して2つのミスマッチを有する、実施形態9に記載のオリゴヌクレオチド。

50

【 0 3 1 8 】

1 2 . 該連続ヌクレオチド配列が、該標的配列に対して完全に相補的である、実施形態 9 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 1 9 】

1 3 . 該オリゴヌクレオチドが、T a u の発現を調節することができる、実施形態 1 ~ 1 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 0 】

1 4 . 該オリゴヌクレオチドが、T a u の発現を低減することができる、実施形態 1 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 1 】

1 5 . 該オリゴヌクレオチドが、- 1 0 k c a l 未満の G ° で該標的配列とハイブリダイズすることができる、実施形態 1 ~ 1 4 のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 2 】

1 6 . 該標的配列が、R N A に位置する、実施形態 1 ~ 1 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 3 】

1 7 . 該 R N A が、m R N A である、実施形態 1 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 4 】

1 8 . 該 m R N A が、プレ m R N A である、実施形態 1 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 5 】

1 9 . 該連続ヌクレオチド配列が、少なくとも 1 4 連続ヌクレオチド、特に 1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、又は 2 2 連続ヌクレオチドを含むか又はそれらからなる、実施形態 1 ~ 1 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 6 】

2 0 . 該連続ヌクレオチド配列が、1 6 ~ 2 2 個のヌクレオチドを含むか又はそれらからなる、実施形態 1 ~ 1 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 7 】

2 1 . 該連続ヌクレオチド配列が、1 8 ~ 2 0 個のヌクレオチドを含むか又はそれらからなる、実施形態 2 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 8 】

2 2 . 該オリゴヌクレオチドが、1 4 ~ 3 0 ヌクレオチド長を含むか又はそれらからなる、実施形態 1 ~ 2 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 2 9 】

2 3 . 該オリゴヌクレオチドが、1 6 ~ 2 4 ヌクレオチド長を含むか又はそれらからなる、実施形態 2 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 0 】

2 4 . 該オリゴヌクレオチドが、1 8 ~ 2 0 ヌクレオチド長を含むか又はそれらからなる、実施形態 2 2 又は 2 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 1 】

2 5 . 該オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列が、一本鎖である、実施形態 1 ~ 2 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 2 】

2 6 . 該オリゴヌクレオチドが、s i R N A でも自己相補的でもない、実施形態 1 ~ 2 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 3 】

2 7 . 1 個以上の修飾ヌクレオシドを含む、実施形態 1 ~ 2 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 4 】

2 8 . 該 1 個以上の修飾ヌクレオシドが、高親和性修飾ヌクレオシドである、実施形態 2 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 3 5 】

10

20

30

40

50

29. 該1個以上の修飾ヌクレオシドが、2'糖修飾ヌクレオシドである、実施形態27又は28に記載のオリゴヌクレオチド。

【0336】

30. 該1つ以上の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、2'-フルオロ-ANA、及びLNAヌクレオシドからなる群より独立して選択される、実施形態29に記載のオリゴヌクレオチド。

【0337】

31. 該1個以上の2'糖修飾ヌクレオシドが、LNAヌクレオシドである、実施形態29又は30に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【0338】

32. 該LNAヌクレオシドが、オキシ-LNA、アミノ-LNA、チオ-LNA、cET、及びENAから選択される、実施形態31に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0339】

33. 該修飾LNAヌクレオシドが、以下の2'-4'架橋-O-C₂H-を有するオキシ-LNAである、実施形態31又は32に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0340】

34. 該オキシ-LNAが、-D-オキシ-LNAである、実施形態33に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0341】

20

35. 該修飾LNAヌクレオシドが、以下の2'-4'架橋-O-CH(C₃H)-を有するcETである、実施形態31又は32に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0342】

36. 該cETが、(S)cET、すなわち6'-(S)メチル--D-オキシ-LNAである、実施形態35に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0343】

37. 該LNAが、以下の2'-4'架橋-O-C₂H-CH₂-を有するENAである、実施形態31又は32に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0344】

38. 該1個以上の2'糖修飾ヌクレオシドが、MOEヌクレオシドである、実施形態29又は30に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【0345】

39. 該オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態1~38のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【0346】

40. 該修飾ヌクレオシド間結合が、ヌクレアーゼ耐性である、実施形態39のオリゴヌクレオチド。

【0347】

41. 該連続ヌクレオチド配列内の該ヌクレオシド間結合の少なくとも50%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合又はボラノホスフェートヌクレオシド間結合である、実施形態39又は40に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【0348】

42. 該連続ヌクレオチド配列内の該ヌクレオシド間結合の80%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態39又は41に記載のオリゴヌクレオチド。

【0349】

43. 該連続ヌクレオチド配列内の該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、実施形態39~42に記載のオリゴヌクレオチド。

【0350】

44. 該オリゴヌクレオチドが、RNase Hを動員することができる、実施形態1~43に記載のオリゴヌクレオチド。

50

【 0 3 5 1 】

4 5 . 該オリゴヌクレオチド又は該連続ヌクレオチド配列が、ギャップマである、実施形態 4 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 2 】

4 6 . 該ギャップマが、式 5 ' - F - G - F ' - 3 ' を有し、ここで、該 F 及び F ' ウイング領域が独立して 1 ~ 8 個のヌクレオシドを含むか又はそれらからなり、そのうちの 2 ~ 5 個が実施形態 3 2 ~ 3 8 に記載の 2 ' 糖修飾ヌクレオシドであり、G は R N a s e H を動員することができる 6 ~ 1 6 個のヌクレオシドの領域である、実施形態 4 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 3 】

4 7 . 各ウイング領域 (F 及び F ') が、該ウイングの 5 ' 末端及び 3 ' 末端に少なくとも 1 つの 2 ' 糖修飾ヌクレオシドを有することを特徴とし、該 G 領域が、該ウイング領域 (例えば、該 G 領域の 5 ' 末端及び 3 ' 末端) に隣接して少なくとも 1 つの D N A ヌクレオシドを有する、実施形態 4 6 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 4 】

4 8 . 領域 F 及び F ' 内の該 2 ' 糖修飾ヌクレオシドの全てが、同一の L N A ヌクレオシドである、実施形態 4 6 又は 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 5 】

4 9 . 該 L N A ヌクレオシドの全てが、オキシ - L N A ヌクレオシドである、実施形態 4 8 のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 6 】

5 0 . 領域 F 及び F ' 内の該 2 ' 糖修飾ヌクレオシドの全てが、同一の M O E ヌクレオシドである、実施形態 4 6 又は 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 7 】

5 1 . a . 該 F ' 領域が 3 ~ 8 ヌクレオチド長であり、3 ~ 5 個の同一 L N A ヌクレオシド及び 0 ~ 4 個の D N A ヌクレオシドからなり、
b . 該 F ' 領域が 2 ~ 6 ヌクレオチド長であり、2 ~ 4 個の同一 L N A ヌクレオシド及び 0 ~ 2 個の D N A ヌクレオシドからなり、
c . 領域 G が 6 ~ 1 4 個の D N A ヌクレオチドである、実施形態 4 6 ~ 5 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 8 】

5 2 . 領域 F 又は F ' の少なくとも一方が、2 ' - O - アルキル - R N A 、 2 ' - O - メチル - R N A 、 2 ' - アルコキシ - R N A 、 2 ' - O - メトキシエチル - R N A 、 2 ' - アミノ - D N A 、及び 2 ' - フルオロ - D N A からなる群より独立して選択される少なくとも 1 つの 2 ' 置換修飾ヌクレオシドを更に含む、実施形態 4 6 又は 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 5 9 】

5 3 . 領域 G における該 R N a s e H 動員ヌクレオシドが、D N A 、 - L - L N A 、 C 4 ' アルキル化 D N A 、 A N A 及び 2 ' F - A N A 、並びに U N A から独立して選択される、実施形態 4 6 ~ 5 0 又は 5 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 6 0 】

5 4 . 領域 G 内の該ヌクレオシドが、D N A 及び / 又は - L - L N A ヌクレオシドである、実施形態 5 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 6 1 】

5 5 . 領域 G が、少なくとも 7 5 % の D N A ヌクレオシドからなる、実施形態 5 3 又は 5 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 6 2 】

5 6 . 該 G 領域の該ヌクレオチドの全てが、D N A である、実施形態 5 3 ~ 5 5 のオリゴヌクレオチド。

【 0 3 6 3 】

10

20

30

40

50

57. 該オリゴヌクレオチドが、CMP 番号 9__102、9__103、9__104、11__1、49__38、49__51、49__179、49__189、53__1、56__1、及び 62__1 から選択される、実施形態 1～56 に記載のオリゴヌクレオチド。

58. 該オリゴヌクレオチドが、

【化 5】

CTTtAATttaatcactcAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__102	
CTTTaattttaatcactCAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__103	
CTTTAaattttaatcaCtCAT	配列番号 9 ; CMP 番号 9__104	
CTTTAaattttaatcaCTCA	配列番号 11 ; CMP 番号 11__1	
TtaaCTCAAaatcaatTtctCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__38	10
TtaActCAAaatcaattCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__51	
TTAActCAaatcaattCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__179	
TTAActcaaatcaattCTCA	配列番号 49 ; CMP 番号 49__189	
CAACacccttttaattcATTA	配列番号 53 ; CMP 番号 53__1	
CTCAtcaacacaccttttaatt	配列番号 56 ; CMP 番号 56__1	
TTAActcatcaacaCCTT	配列番号 62 ; CMP 番号 62__1	

からなる群より選択される化合物であって、ここで、大文字が - D - オキシ LNA ヌクレオチドであり、小文字が DNA ヌクレオチドであり、全 LNA C が 5 - メチルシトシンであり、全ヌクレオチド間結合がホスホロチオエートヌクレオチド間結合である、実施形態 57 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0364】

59. 該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、図 2 に示されるように CMP 番号 9__103 である、実施形態 1～58 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0365】

60. 該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、図 3 に示されるように CMP 番号 9__104 である、実施形態 1～58 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0366】

61. 該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、図 4 に示されるように CMP 番号 11__1 である、実施形態 1～58 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0367】

62. 該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、図 5 に示されるように CMP 番号 49__38 である、実施形態 1～58 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0368】

63. 該アンチセンスオリゴヌクレオチドが、図 6 に示されるように CMP 番号 49__189 である、実施形態 1～58 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0369】

64. 請求項 1～58 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドと、該オリゴヌクレオチドに共有結合した少なくとも 1 つのコンジュゲート部分と、を含むコンジュゲート。

【0370】

65. 該コンジュゲート部分が、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、ビタミン、ウイルスタンパク質又はそれらの組合せから選択される、実施形態 59 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0371】

66. 該コンジュゲートが、脳血液関門を通過する送達を促進する、実施形態 59 又は 65 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0372】

67. 該コンジュゲートが、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、実施形態 66 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【 0 3 7 3 】

68．該オリゴヌクレオチドと該コンジュゲート部分との間に位置するリンカを含む、実施形態59～67に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 3 7 4 】

69．該リンカが、生理学的に不安定なリンカである、実施形態68に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【 0 3 7 5 】

70．実施形態1～58に記載のオリゴヌクレオチド又は実施形態59～69に記載のコンジュゲートと、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、及び／又はアジュバントと、を含む医薬組成物。

10

【 0 3 7 6 】

71．ヌクレオチド単位を反応させ、それによって該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、実施形態1～58に記載のオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供する。

【 0 3 7 7 】

72．該連続ヌクレオチド配列を非ヌクレオチドコンジュゲーション部分と反応させることを更に含む、実施形態71に記載の方法。

【 0 3 7 8 】

73．該オリゴヌクレオチドを、薬学的に許容される希釈剤、担体、塩、及び／又はアジュバントと混合することを含む、実施形態70に記載の組成物を製造する方法。

20

【 0 3 7 9 】

74．T a uを発現している標的細胞におけるT a u発現調節用インビトロ又はインビボ方法であって、実施形態1～57に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態59～69に記載のコンジュゲート、又は実施形態70に記載の医薬組成物を、有効量で該細胞に投与することを含む、方法。

【 0 3 8 0 】

75．疾患の治療又は予防方法であって、治療的又は予防的に有効な量である実施形態1～58に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態59～69に記載のコンジュゲート、又は実施形態70に記載の医薬組成物を、該疾患に罹患する又は罹り易い対象に投与することを含む、方法。

30

【 0 3 8 1 】

76．対象における疾患の治療又は予防のための薬品として使用するための、実施形態1～57に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態59～69に記載のコンジュゲート、又は実施形態70に記載の医薬組成物。

【 0 3 8 2 】

77．対象における疾患の治療又は予防のための薬品の調製のための、実施形態1～58のオリゴヌクレオチド、又は実施形態59～69のコンジュゲートの使用。

【 0 3 8 3 】

78．該疾患が、T a uのインビボ活性と関連する、実施形態75～77に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

40

【 0 3 8 4 】

79．該疾患が、T a uの過剰発現及び／又はT a uの異常レベルと関連する、実施形態75～78に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【 0 3 8 5 】

80．該T a uが、実施形態1～58に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態59～69に記載のコンジュゲート、又は実施形態70に記載の医薬組成物を含まない該発現と比較して、少なくとも30％、又は少なくとも40％、又は少なくとも50％、又は少なくとも60％、又は少なくとも70％、又は少なくとも80％、又は少なくとも90％、又は少なくとも95％低減する、実施形態79に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

50

【 0 3 8 6 】

8 1 . 該疾患が、タウオパチ、アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、大脳皮質基底核変性症 (C B D)、慢性外傷性脳症 (C T E)、前頭側頭型認知症 (F T D)、F T D P - 1 7、ピック病 (P i D)、嗜銀性顆粒病 (A G D)、変化優位型老年認知症 (T P S D)、原発性年齢関連タウオパチ (P A R T)、ダウン症候群、リティコ - ボディグ病、小児タウオパチ (一側性巨脳症 (H M E)、結節性硬化症、限局性皮質異形成 2 b 型、神経節膠腫、ハラーホルデン・スパッツ症候群、脳内鉄沈着を伴う神経変性症 1 型 (N B I A 1)、神経節細胞腫、亜急性硬化性全脳炎、発作性障害 (例えば、てんかん)、ネットワーク機能障害 (例えば、抑鬱)、及び運動障害 (例えば、パーキンソン病)を含む)から選択される、実施形態 7 5 ~ 7 9 に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

10

【 0 3 8 7 】

8 2 . 該疾患が、アルツハイマ病 (A D)、進行性核上性麻痺 (P S P)、前頭側頭型認知症 (F T D)、又は F T D P - 1 7 から選択される、実施形態 7 5 ~ 7 9 に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【 0 3 8 8 】

8 3 . 該対象が、哺乳動物である、実施形態 7 5 ~ 8 2 に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【 0 3 8 9 】

8 4 . 該哺乳動物が、ヒトである、実施形態 8 3 に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

20

【実施例】

【 0 3 9 0 】

材料及び方法

オリゴヌクレオチドモチーフ配列及びオリゴヌクレオチド化合物

【 0 3 9 1 】

30

40

50

【表 5 - 1】

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における始まり	領域
6	tcaactcaatgcccttaatc	4-11-2	TCACtcaatgcccttaa TC	6__1	12051	A
7	taatcaactcaatgccctta	4-9-4	TAA ^T caactcaatgccCT TA	7__1	12054	A
8	taatcaactcaatgccctt	4-8-4	TAA ^T caactcaatgccCT T	8__1	12055	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-1-2- 1-1-3	CttaaatttaatcaC tCAT	9__1	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-1-1- 2-1-3	CttaaatttaatcaC tCAT	9__2	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-2-3- 3	CttaaatttaatcaC tCAT	9__3	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-2-2- 4	CttaaatttaatcaC TCAT	9__4	12060	A
9	clltaalllaalcactcat	1-10-2-1- 1-2-2	ClilaalllaaTCaC tcAT	9__5	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-2-1- 1-1-3	CttaaatttaatcaC tCAT	9__6	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-3-3- 2	CttaaatttaatcaC tcAT	9__7	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-3-2- 3	CttaaatttaatcaC tCAT	9__8	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-10-3-1- 4	CttaaatttaatcaC TCAT	9__9	12060	A
9	cttteaatttaatcaactcat	1-10-4-2- 2	CttaaatttaatcaC tcAT	9__10	12060	A
9	cttteaatttaatcaactcat	1-5-1-8-4	CttaaTttaatcac TCAT	9__11	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-5-1-7-1 -1-3	CttaaTttaatcac tCAT	9__12	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-5-1-6-1 -2-3	CttaaTttaatcac tCAT	9__13	12060	A
9	ctttaatttaatcaactcat	1-5-1-6-1 -1-4	CttaaTttaatcac TCAT	9__14	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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 における始まり	領域
9	ctttaattlaattcaactcat	1-5-1-1-6-2 -1-3	CttlaaTtllaalcaC tCAT	9_15	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-4-1-1-9-4	CtttaAatttaattcac TCAT	9_16	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-4-2-8-4	CtttaAatttaattcac TCAT	9_17	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-3-1-1-10-4	CtttAaatttaattcac TCAT	9_18	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-3-1-1-9-1 -1-3	CtttAaatttaattcac tCAT	9_19	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-3-1-1-1-1 -8-4	CtttAaTtllaattcac TCAT	9_20	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-3-2-9-4	CtttAAatttaattcac TCAT	9_21	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-3-3-8-4	CtttAAatttaattcac TCAT	9_22	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-1-1-1-1 4	CttTaaatttaattcac TCAT	9_23	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-1-1-10-1 1-1-3	CttTaaatttaattcaC tCAT	9_24	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-1-1-2-1 -8-4	CttTaaTtllaattcac TCAT	9_25	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-1-1-1-1 -9-4	CttTaAatttaattcac TCAT	9_26	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-1-1-1-2 -8-4	CttTaAatttaattcac TCAT	9_27	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-2-1-1-1 3	CttTAAatttaattcac tCAT	9_28	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-2-1-10-4	CttTAAatttaattcac TCAT	9_29	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-2-9-1 -2-2	CttTAAattlaattcaC tCAT	9_30	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-2-9-1 -1-3	CttTAAattlaattcaC tCAT	9_31	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-2-1-1-1 -8-4	CttTAAattlaattcac TCAT	9_32	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-3-9-4	CttTAAattlaattcac TCAT	9_33	12060	A
9	ctttaattlaattcaactcat	1-2-4-1-10-2	CttTAAattlaattcac tCAT	9_34	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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 における始まり	領域
9	ctttaatttaatacactcat	1-2-4-8-4	CtTTAAATttaatcac TCAT	9_35	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-3-1 -8-4	CtTtaaTttaatcac TCAT	9_36	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-2-1 -9-4	CtTtaaTttaatcac TCAT	9_37	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-2-2 -8-4	CtTtaaTttaatcac TCAT	9_38	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-1-1 -10-4	CtTtAattttaatcac TCAT	9_39	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-1-1 -9-1-1-3	CtTtAattttaatcac tCAT	9_40	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-1-1 -1-1-8-4	CtTtAattttaatcac TCAT	9_41	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-1-1-1 -9-4	CtTtAAattttaatcac TCAT	9_42	12060	A
9	clltaalllaalcactcat	1-1-1-1-1 -8-4	CtTlAATllaalcac TCAT	9_43	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-1 4	CtTtTaattttaatcac TCAT	9_44	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-0 1-2-2	CtTtTaattttaatcac tCAT	9_45	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-0 1-1-3	CtTtTaattttaatcac tCAT	9_46	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-2-1 -8-4	CtTtTaattttaatcac TCAT	9_47	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-1 -9-4	CtTtAattttaatcac TCAT	9_48	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-2 -10-2	CtTtAATttaatcac tCAT	9_49	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-2-1-2 -8-4	CtTtAATttaatcac TCAT	9_50	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-3-1-1 3	CtTTAattttaatcac tCAT	9_51	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-3-1-0 4	CtTTAattttaatcac TCAT	9_52	12060	A
9	clltaalllaalcactcat	1-1-3-9-1 -2-2	CtTTAalllaalcac tCAT	9_53	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	1-1-3-9-1 -1-3	CtTTAattttaatcac tCAT	9_54	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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における始まり	領域
9	ctttaattttaatcaactcat	1-1-3-1-1-1-10-2	CtTTAaTtTtaatcac tCAT	9_55	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	1-1-3-1-1-1-8-4	CtTTAaTtTtaatcac TCAT	9_56	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	1-1-4-1-1-1-2	CtTTAaTtTtaatcac tCAT	9_57	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	1-1-4-9-4	CtTTAaTtTtaatcac TCAT	9_58	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-2-3	CtTttaaTtTtaatcAc tCAT	9_59	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-1-1-4	CtTttaaTtTtaatcAc TCAT	9_60	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-2-1-1-3	CtTttaaTtTtaatcAC tCAT	9_61	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-2-4-2	CtTttaaTtTtaatCac tCAT	9_62	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-2-3-3	CtTttaaTtTtaatCac tCAT	9_63	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-2-2-4	CtTttaaTtTtaatCac TCAT	9_64	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-2-1-1-1-2-2	CtTttaaTtTtaatCaC tCAT	9_65	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-2-1-1-1-1-3	CtTttaaTtTtaatCaC tCAT	9_66	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-3-3-2	CtTttaaTtTtaatCAc tCAT	9_67	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-3-2-3	CtTttaaTtTtaatCAc tCAT	9_68	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-9-4-2-2	CtTttaaTtTtaatCAC tCAT	9_69	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-9-3	CtTtaaTtTtaatcac tCAT	9_70	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-8-4	CtTtaaTtTtaatcac TCAT	9_71	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-7-1-2-2	CtTtaaTtTtaatcac tCAT	9_72	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-7-1-1-3	CtTtaaTtTtaatcac tCAT	9_73	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-6-1-2-3	CtTtaaTtTtaatcAc tCAT	9_74	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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 における始まり	領域
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-6-1 -1-4	CTttaaTttaatcAaC TCAAT	9_75	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-6-2 -2-2	CTttaaTttaatcAaC tCAAT	9_76	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-4-1-6-2 -1-3	CTttaaTttaatcAaC tCAAT	9_77	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-1-1-1-1 3	CTtAaTttaatcAaC tCAAT	9_78	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-1-1-1-0 4	CTtAaTttaatcAaC TCAAT	9_79	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-1-1-9-1 -1-3	CTtAaTttaatcAaC tCAAT	9_80	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-1-1-1-1 -8-4	CTtAaTttaatcAaC TCAAT	9_81	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-2-9-4	CTtAAAtttaatcAaC TCAAT	9_82	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-2-3-8-4	CTtAAAtttaatcAaC TCAAT	9_83	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-1-0 1-2-2	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_84	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-1-0 1-1-3	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_85	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-1-1 -9-4	CTtTaaTttaatcAaC TCAAT	9_86	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-1-1-1-2 -10-2	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_87	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-2-1-1-1 3	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_88	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-2-1-1-0 4	CTtTaaTttaatcAaC TCAAT	9_89	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-2-9-1 -2-2	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_90	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-2-9-1 -1-3	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_91	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-2-1-1-1 -10-2	CTtTaaTttaatcAaC tCAAT	9_92	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-3-1-1-1 2	CTtTAAAtttaatcAaC tCAAT	9_93	12060	A
9	ctttaattttaatcaactcat	2-1-3-9-4	CTtTAAAtttaatcAaC TCAAT	9_94	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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における始まり	領域
9	ctttaatttaatacactcat	2-1-4-10-2	CTTAAATttaatcac tCAT	9_95	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-2-2-10-2	CTTtaATttaatcac tCAT	9_96	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-1-11-3	CTTtAattttaatcac tCAT	9_97	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-1-10-4	CTTtAattttaatcac TCAT	9_98	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-1-9-1-2-2	CTTtAattttaatcac tCAT	9_99	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-1-9-1-1-3	CTTtAattttaatcac tCAT	9_100	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-2-9-4	CTTtAAttttaatcac TCAT	9_101	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	3-1-3-10-2	CTTtAAttttaatcac tCAT	9_102	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	4-1-1-4	CTTtAattttaatcac TCAT	9_103	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	4-1-0-1-1-3	CTTtAattttaatcac tCAT	9_104	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	4-2-1-10-2	CTTtAAttttaatcac tCAT	9_105	12060	A
9	ctttaatttaatacactcat	4-1-1-9-4	CTTtAAttttaatcac TCAT	9_106	12060	A
10	gctllaatllaatcactcat	1-1-1-2-1-3	GctllaatllaatCtca tCAT	10_1	12060	A
10	gctllaatllaatcactcat	1-1-1-2-4-2	GctllaatllaatCtca tCAT	10_2	12060	A
10	gctllaatllaatcactcat	1-1-1-2-3-3	GctllaatllaatCtca tCAT	10_3	12060	A
10	gctttaatttaatacactcat	1-1-1-2-2-4	GctttaattttaatCtca tCAT	10_4	12060	A
10	gctttaatttaatacactcat	1-1-1-2-1-2-2	GctttaattttaatCtca tCAT	10_5	12060	A
10	gctttaatttaatacactcat	1-1-1-2-1-1-3	GctttaattttaatCtca tCAT	10_6	12060	A
10	gctttaatttaatacactcat	1-1-1-3-3-2	GctttaattttaatCtca tCAT	10_7	12060	A
10	gctttaatttaatacactcat	1-1-1-4-2-2	GctttaattttaatCtca tCAT	10_8	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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における始まり	領域
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-9-3	GctttaaTttaatca ctCAT	10_9	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-8-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_10	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-7-1 -2-2	GctttaaTttaatca CtcAT	10_11	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-7-1 -1-3	GctttaaTttaatca CtCAT	10_12	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-4-1 -2-1-1-3	GctttaaTttaatca CtCAT	10_13	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-4-2 -3-3	GctttaaTttaatca ctCAT	10_14	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-4-2 -1-1-2-2	GctttaaTttaatca CtcAT	10_15	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-6-1-4-3 -3-2	GctttaaTttaatca ctcAT	10_16	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-5-1-9-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_17	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-4-1-1-10- 4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_18	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-4-1-9-1 -1-3	GctttaaTttaatca CtCAT	10_19	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-4-1-1-1- -8-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_20	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-4-2-9-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_21	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-4-3-8-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_22	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-1-1-1- 4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_23	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-1-1-10- 1-2-2	GctttaaTttaatca CtcAT	10_24	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-1-1-10- 1-1-3	GctttaaTttaatca CtCAT	10_25	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-1-2-1 -8-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_26	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-1-1-1- -9-4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_27	12060	A
10	gctttaaelttaatcactcat	1-3-2-10- 4	GctttaaTttaatca ctCAT	10_28	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 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における始まり	領域
10	gctttaattttaatcaactcat	1-3-2-9-1-2-2	GcttTAattttaatca ctCAT	10_29	12060	A
10	gclltaalllaalcacalc	1-3-2-9-1-1-3	GcllTAalllaalca ctCAT	10_30	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-3-1-8-4	GcttTaaTttaatca ctCAT	10_31	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-2-1-9-4	GcttTaaTttaatca ctCAT	10_32	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-1-1-10-4	GcttTAattttaatca ctCAT	10_33	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-1-1-9-1-2-2	GcttTAattttaatca ctCAT	10_34	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-1-1-9-1-1-3	GcttTAattttaatca ctCAT	10_35	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-1-1-1-1-8-4	GcttTAattttaatca ctCAT	10_36	12060	A
10	gclltaalllaalcacalc	1-2-1-1-1-2-4	GcltTAAalllaalca ctCAT	10_37	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-2-1-1-4	GcttTAattttaatca ctCAT	10_38	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-2-1-10-1-2-2	GcttTAattttaatca ctCAT	10_39	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-2-1-10-1-1-3	GcttTAattttaatca ctCAT	10_40	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-2-1-1-9-4	GcttTAattttaatca ctCAT	10_41	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-2-3-9-1-2-2	GcttTAattttaatca ctCAT	10_42	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-1-1-9-2-4-2	GcttTaaTttaatCa ctCAT	10_43	12060	A
10	gclltaalllaalcacalc	1-1-1-9-2-3-3	GcltTaaTttaatCa ctCAT	10_44	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-1-1-9-2-1-1-2-2	GcttTaaTttaatCa ctCAT	10_45	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-1-1-9-3-2	GcttTaaTttaatCa ctCAT	10_46	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-1-1-4-1-9-3	GcttTaaTttaatca ctCAT	10_47	12060	A
10	gctttaattttaatcaactcat	1-1-1-4-1-8-4	GcttTaaTttaatca ctCAT	10_48	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

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 における始まり	領域
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-4-1 -7-1-2-2	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_49	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-4-1 -7-1-1-3	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_50	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-3-1 -9-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_51	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-2-1 -10-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_52	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-2-1 -9-1-2-2	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_53	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-2-1 -9-1-1-3	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_54	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-2-1 -1-1-8-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_55	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-2-2 -9-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_56	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-1 -1-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_57	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-1 -10-1-1-3	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_58	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-1 -2-1-8-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_59	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-1 -1-1-9-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_60	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-2 -9-1-2-2	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_61	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-1-1-3 -1-2	GcTttaaTtlaatca cTcaT	10_62	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-3-1 -8-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_63	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-2-1 -1-2	GcTttaaTtlaatca cTcaT	10_64	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-2-1 -9-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_65	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-1-1 -10-4	GcTttaaTtlaatca cTCAAT	10_66	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-1-1 -9-1-1-3	GcTttaaTtlaatca CtcaT	10_67	12060	A
10	gctttaattlaatcaactcat	1-1-2-1-2 -1-2	GcTttaaTtlaatca cTcaT	10_68	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 10】

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 における始まり	領域
10	gctttaaatttaataactcat	1-1-3-10-2-1-2	GcTTTaaattttaaTca CtcaT	10_69	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	1-1-4-9-1-2-2	GcTTTAaatttaaTca CtcaT	10_70	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-11-1-4-2	GcTttaaatttaaTca ctcaT	10_71	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-10-2-4-2	GcTttaaatttaaTca ctcaT	10_72	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-5-1-10-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_73	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-5-1-9-3	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_74	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-5-1-7-1-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_75	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-4-2-10-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_76	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-3-1-9-1-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_77	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-3-2-11-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_78	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-2-1-10-1-2	GcTtTaaTttaaTca CtcaT	10_79	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-2-1-1-1-1-2	GcTtTaaTttaaTca ctcaT	10_80	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-2-3-11-2	GcTtTAAtttaaTca ctcaT	10_81	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-1-1-2-1-1-2	GcTtTaaTttaaTca ctcaT	10_82	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-1-1-1-1-9-1-2-2	GcTtTaaTttaaTca CtcaT	10_83	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	2-1-1-1-1-2-1-2	GcTtTAAtttaaTca ctcaT	10_84	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	3-10-1-4-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_85	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	3-4-1-10-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_86	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	3-3-1-11-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_87	12060	A
10	gctttaaatttaataactcat	3-2-2-11-2	GcTttaaTttaaTca ctcaT	10_88	12060	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

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 における始まり	領域
10	gctttaatttaattcaactcaat	3-1-1-9-1 -1-1-1-2	GCTTtTaattttaattcaA cTcAT	10_89	12060	A
11	ctttaatttaattcaactca	4-10-4	CTTtTaattttaattcaC TCA	11_1	12061	A
12	ctttaatttaattcaactc	4-9-4	CTTtTaattttaattcaC TC	12_1	12062	A
13	tccaagtcaattgcctggcctt	3-14-3	TCCaagtcaattgcct ggCTT	13_1	12076	A
14	atccaagtcaattgcctggcct	3-14-3	ATCcaagtcaattgcc tGGCT	14_1	12077	A
15	accatccaagtcaattgcctg	3-14-3	ACCatccaagtcaat gCCTG	15_1	12080	A
16	cccatccaagtcaattgcct	3-14-3	CACcatccaagtcaa tGCCCT	16_1	12081	A
17	tacacccatccaagtcaattgc	3-14-3	TACacccatccaagt aatGC	17_1	12083	A
18	ttacacccatccaagtcaattg	3-14-3	TTAcacccatccaagt caATG	18_1	12084	A
19	acacccatccaagtcaatt	3-10-4	ACAcctccaagtCA AT	19_1	12085	A
20	tacacccatccaagttcaa	3-10-4	TACacccatccaagTC AA	20_1	12086	A
21	ttacacccatccaagttca	4-11-2	TTAcacccatccaagt CA	21_1	12087	A
22	ttacacccatccaagttc	4-9-3	TTAcacccatccaagt C	22_1	12088	A
23	aataatlacacccatccaa	4-9-4	AATAtlacacccatCC AA	23_1	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	1-3-1-10-4	AgaaTattacacccat CAA	24_1	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	1-3-1-9-1 -1-3	AgaaTattacacccat cCAA	24_2	12091	A
24	agaataatlacacccatccaa	1-3-1-9-2 -1-2	AgaaTattacacccat Ccaa	24_3	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	1-3-1-8-1 -2-3	AgaaTattacacccat cCAA	24_4	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	1-3-1-8-1 -1-4	AgaaTattacacccat CAA	24_5	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	1-3-1-8-2 -1-3	AgaaTattacacccat cCAA	24_6	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 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 における始まり	領域
24	agaataattacacccattccaa	1-3-1-8-3 -1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_7	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-3-1-7-1 -1-2-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_8	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-3-1-6-1 -1-1-1-1-1-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_9	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-3-1-6-1 -1-2-1-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_10	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-1-1-1-4	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_11	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-1-1-10-1-1-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_12	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-1-1-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_13	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-9-2 -1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_14	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-8-1 -2-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_15	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-8-1 -1-1-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_16	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-8-3 -1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_17	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-2-2-7-2 -1-1-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_18	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-10-1 -1-1-4	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_19	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-10-3 -1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_20	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-1-1-1-1-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_21	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-1-1-1-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_22	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-1-1-1-1-2-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_23	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-1-1-1-1-2	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_24	12091	A
24	agaataattacacccattccaa	1-1-1-1-1-1-1-2-3	AgaaTattacacccAT C _{CAA}	24_25	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 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 における始まり	領域
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-1-1-1-1-7-1-3-3	AgAaTattacacCat cCAA	24__26	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-1-1-1-1-6-1-4-3	AgAaTattacaCcat cCAA	24__27	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-1-1-1-1-6-2-3-2	AgAaTattacacCat ccAA	24__28	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-2-1-1-2-2-1-2	AgAAtattacacccaT CcAA	24__29	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-3	AgAA Tattacaccca cCAA	24__30	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-1-2	AgAA Tattacaccca CcAA	24__31	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-2-1-2	AgAA TattacacccaT CcAA	24__32	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-2-2-3	AgAA TattacacccaT cCAA	24__33	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-2-1-1-2	AgAA TattacacccaT CcAA	24__34	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	1-1-3-1-1-2-1-1-2	AgAA TattacacccaT CcAA	24__35	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-3-1-1-8-2-1-2	AgaaTattacacccaT CcAA	24__36	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-3-1-1-6-1-3-3	AgaaTattacacCat cCAA	24__37	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-1-1-3	AgaaTattacaccca cCAA	24__38	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-1-1-2	AgaaTattacaccca CcAA	24__39	12091	A
24	agaalalacacccaattccaa	2-2-1-1-9-2-1-2	AgaaTallacacccaT CcAA	24__40	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-8-1-2-3	AgaaTattacacccaT cCAA	24__41	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-8-1-1-1-2	AgaaTattacacccaT CcAA	24__42	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-8-1-1-2	AgaaTattacacccaT CcAA	24__43	12091	A
24	agaatattacacccaattccaa	2-2-1-1-6-1-1-1-1-1-1-2	AgaaTattacacccaT CcAA	24__44	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 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 における始まり	領域
24	agaataattacacccatccaa	2-2-2-6-1 -2-1-1-2	AGaaTAttacacCat cCAa	24_45	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-1-1-10- 2-1-2	AGaAtattacacccat cCAa	24_46	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-1-1-1-1 -6-1-1-2- 1-2	AGaAtAttacacCat cCAa	24_47	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-2-1-1- 3	AGaATattacacccat cCAa	24_48	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-2-10- 1-1-2	AGaATattacacccat cCAa	24_49	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-2-9-2 -1-2	AGaATattacacccat cCAa	24_50	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-2-8-1 -2-3	AGaATattacacccat cCAa	24_51	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-2-8-1 -1-1-1-2	AGaATattacacccat cCAa	24_52	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	2-1-3-9-1 -1-2	AGaATAttacacccat cCAa	24_53	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-11-2-1- 2	AGaattattacacccat cCAa	24_54	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-10-1-2- 3	AGaattattacacccat cCAa	24_55	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-10-1-1- 1-1-2	AGaattattacacccat cCAa	24_56	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-1-1-10- 1-1-2	AGaATattacacccat cCAa	24_57	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-1-1-8-1 -3-2	AGaATattacacccat cCAa	24_58	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	3-1-1-8-1 -1-1-1-2	AGaATattacacccat cCAa	24_59	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	4-11-1-1- 2	AGaattattacacccat cCAa	24_60	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	4-8-1-4-2	AGaattattacacccat cCAa	24_61	12091	A
24	agaataattacacccatccaa	4-1-1-9-1 -1-2	AGaATAttacacccat cCAa	24_62	12091	A
25	cagaataattacacccatccaa	1-4-1-9-1 -1-3	CagaATattacaccca TcCAa	25_1	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 15】

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における始まり	領域
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-4-1-9-2 -1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_2	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-4-1-7-1 -2-1-1-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_3	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-4-1-6-1 -1-1-1-1-1-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_4	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-1-10- 2-1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_5	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-1-7-2 -4-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_6	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-1-1-1-1 -6-2-3-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_7	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-2-11- 3	CagaaTattacaccca tCcAA	25_8	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-2-10- 1-1-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_9	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-2-9-2 -1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_10	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-3-2-8-1 -1-1-1-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_11	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-11- 2-1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_12	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-10- 1-2-3	CagaaTattacaccca tCcAA	25_13	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-2-1 -6-1-1-2-1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_14	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-1-1- -11-3	CagaaTattacaccca tCcAA	25_15	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-1-1- -9-2-1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_16	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-1-1- -8-1-2-3	CagaaTattacaccca tCcAA	25_17	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-1-1- -8-1-1-1-1-2	CagaaTattacaccca tCcAA	25_18	12091	A
25	cagaaatattacacccaatccaa	1-2-1-1-1- -7-1-1-2-1-2	CagaaTattacaccca TCcAA	25_19	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 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 における始まり	領域
25	cagaaattacacccatccaa	1-2-1-1-2- -6-1-2-1- 1-2	CagAAAttacacCa tCcAA	25__20	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-2-2-8-2 -3-2	CagAAattacacCA tCcAA	25__21	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-2-2-8-2 -1-1-1-2	CagAAattacacCA tCcAA	25__22	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -11-3	CaGaaTattacacca tCcAA	25__23	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -10-1-1-2	CaGaaTattacacca tCcAA	25__24	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -9-2-1-2	CaGaaTattacacca tCcAA	25__25	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -8-1-2-3	CaGaaTattacacca tCcAA	25__26	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -8-1-1-1-1- 1-2	CaGaaTattacacca tCcAA	25__27	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-2-1 -6-1-5-2	CaGaaTattacacCA tCcAA	25__28	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-1-1-1 -11-1-1-2	CaGAAattacacca tCcAA	25__29	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-1-1-1 -10-2-1-2	CaGAAattacacca tCcAA	25__30	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-1-1-1 -1-1-9-1-1- 1-2	CaGAAAttacacca tCcAA	25__31	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-1-1-1-1 -1-1-6-2- 3-2	CaGAAAttacacCA tCcAA	25__32	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-2-10- 1-1-1-1-2	CaGAAattacacca tCcAA	25__33	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	1-1-2-8-1 -1-1-3-2	CaGAAattacacCA tCcAA	25__34	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	2-3-1-10- 1-1-2	CAgaaTallacacca tCcAA	25__35	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	2-3-1-8-1 -3-2	CAgaaTattacacca tCcAA	25__36	12091	A
25	cagaaattacacccatccaa	2-3-1-8-1 -1-1-1-2	CAgaaTattacacca tCcAA	25__37	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 17】

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における始まり	領域
25	cagaaattattacaccatccaa	2-2-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_38	12091	A
25	cagaaattattacaccatccaa	2-1-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_39	12091	A
25	cagaaattattacaccatccaa	2-1-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_40	12091	A
25	cagaaattattacaccatccaa	2-1-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_41	12091	A
25	cagaaattattacaccatccaa	2-1-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_42	12091	A
25	cagaaattattacaccatccaa	2-1-1-1-1-1-1-2	CAGAAattattacaccatC _{CAA}	25_43	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-10-2-1-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_1	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-10-3-1-1-3	GaataattacaccatC _{CAA}	26_2	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-10-4-1-1-2	GaataattacaccatC _{CAA}	26_3	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-3-1-9-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_4	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-2-1-1-10-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_5	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-2-1-1-8-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_6	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-2-2-6-2-1-1-1-2	GaataattacaccatC _{CAA}	26_7	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-1-1-1-1-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_8	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-1-1-1-1-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_9	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-1-1-1-1-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_10	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-2-10-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_11	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-2-9-2-1-2	GaataattacaccatC _{CAA}	26_12	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-2-8-1-1-4	GaataattacaccatC _{CAA}	26_13	12091	A
26	gaataattacaccatccaa	1-1-2-8-3-1-2	GaataattacaccatC _{CAA}	26_14	12091	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 18】

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における始まり	領域
26	gaalalacacccatccaa	1-1-2-7-2 -2-3	GaATallacacCAIc CAA	26__15	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-10-1-1-1- 4	GaatattacacCAIc CAA	26__16	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-10-3-1-1- 2	GaatattacacCAIc CAA	26__17	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-9-4-1-1-2	GaatattacacCAIc CAA	26__18	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-2-1-6-4 -1-2	GaatAttacacCAIc CAA	26__19	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-1-1-1- 3	GaatAttacacCAIc CAA	26__20	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-9-2 -1-2	GaatAttacacCAIc CAA	26__21	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-8-1 -2-3	GaatAttacacCAIc CAA	26__22	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-8-3 -1-2	GaatAttacacCAIc CAA	26__23	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-7-1 -3-3	GaatAttacacCAIc CAA	26__24	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	2-1-1-7-2 -3-2	GaatAttacacCAIc CAA	26__25	12091	A
26	gaalalacacccatccaa	3-11-4	GaalalacacCAIc CAA	26__26	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	3-10-2-1-1- 2	GaatattacacCAIc CAA	26__27	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	3-8-2-1-1- -1-2	GaatattacacCAIc CAA	26__28	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	4-11-3	GaatAttacacCAIc CAA	26__29	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	4-8-1-2-3	GaatAttacacCAIc CAA	26__30	12091	A
26	gaatatcacccatccaa	4-7-1-1-1-2 -1-2	GaatAttacacCAIc CAA	26__31	12091	A
27	aatattacacccatcca	4-8-4	AATAttacacCAIc A	27__1	12092	A
28	agaatatcacccatcca	1-3-1-1-10- 3	AgaATattacacCAIc CAA	28__1	12092	A
28	agaalalacacccatcca	1-3-1-9-1 -1-2	AgaalalacacCAIc CAA	28__2	12092	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 19】

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 における始まり	領域
28	agaaatattacacccattcca	1-3-1-8-1 -1-3	AgaaTattacacccAt CCA	28__3	12092	A
28	agaaiallacaacccalcca	1-3-1-8-2 -1-2	AgaaTallacacccAT cCA	28__4	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-1-1-1-1-3	AgAAtat tacaacccat CCA	28__5	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-1-1-10-4	AgAAtat tacaacccat CCA	28__6	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-1-1-1-1-8-1-1-2	AgAAtAttacacccat cCA	28__7	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-1-1-1-1-6-1-3-2	AgAAtAttacacCCat cCA	28__8	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-2-2-1-1-2	AgAAtat tacaacccat cCA	28__9	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-2-2-2-8-1-2-2	AgAAtat tacaacccAt cCA	28__10	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-4	AgAAtat tacaacccat CCA	28__11	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-10-1-1-3	AgAAtat tacaacccAt CCA	28__12	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-9-2-2	AgAAtat tacaacCCAt cCA	28__13	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-2-1-6-1-3-2	AgAAtAttacacCCat cCA	28__14	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-2-1-6-1-2-3	AgAAtAttacacCCat CCA	28__15	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-1-2	AgAAtat tacaacccat cCA	28__16	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-10-3	AgAAtat tacaacccat CCA	28__17	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-8-1-2-2	AgAAtat tacaacccAt cCA	28__18	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-8-1-1-3	AgAAtat tacaacccAt CCA	28__19	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-7-1-3-2	AgAAtat tacaacCCat cCA	28__20	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-6-1-4-2	AgAAtat tacaCCat cCA	28__21	12092	A
28	agaaatattacacccattcca	1-1-1-1-1-1-6-1-3-2	AgAAtAttacacCCat cCA	28__22	12092	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 20】

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における始まり	縮減
28	agaatattacacccaatcca	1-1-2-1-1-3	AgAAtattacacccaatCCA	28_23	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	1-1-3-1-1-2	AgAATattacacccaatCCA	28_24	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	1-1-3-8-1-2-2	AgAATattacacccaatCCA	28_25	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	2-2-1-1-1-2	AGaaTattacacccaatCCA	28_26	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	2-2-1-8-1-2-2	AGaaTattacacccaatCCA	28_27	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	2-1-1-1-1-3	AGaAtattacacccaatCCA	28_28	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	2-1-2-1-1-2	AGaATattacacccaatCCA	28_29	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	2-1-2-8-1-2-2	AGaATattacacccaatCCA	28_30	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	3-1-0-1-2-2	AGAatattacacccaatCCA	28_31	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	3-1-1-1-1-2	AGaATattacacccaatCCA	28_32	12092	A
28	agaatattacacccaatcca	3-1-1-8-1-2-2	AGaATattacacccaatCCA	28_33	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-4-1-9-1-1-2	CagaaTattacacccaTCCA	29_1	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-3-1-1-1-3	CagaaTattacacccaTCCA	29_2	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-3-1-7-1-4-2	CagaaTattacacccaTCCA	29_3	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-3-2-1-1-2	CagaaTattacacccaTCCA	29_4	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-3-2-8-1-2-2	CagaaTattacacccaTCCA	29_5	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-3-2-7-1-3-2	CagaaTattacacccaTCCA	29_6	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-2-1-1-1-1-2	CagAaTattacacccaTCCA	29_7	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-2-1-1-1-8-1-2-2	CagAaTattacacccaTCCA	29_8	12092	A
29	cagaatattacacccaatcca	1-2-3-1-1-2	CagAATattacacccaTCCA	29_9	12092	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 1】

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における始まり	領域
29	caagaataattacaacccaatcca	1-1-1-1-2-1 -1-1-2	CaGaaTattacaaccca tcCA	29_10	12092	A
29	caagaataattacaacccaatcca	1-1-1-1-2-1 -8-1-2-2	CaGaaTattacaaccca tcCA	29_11	12092	A
29	caagaataattacaacccaatcca	1-1-2-2-10- 1-2-2	CaGAataattacaaccca tcCA	29_12	12092	A
29	caagaataattacaacccaatcca	2-1-1-1-10- 1-2-2	CaGAataattacaaccca tcCA	29_13	12092	A
29	caagaataattacaacccaatcca	2-1-1-1-7-1 -2-1-2-2	CaGAataattacaaccca tcCA	29_14	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-10-2-1- 3	GaatattacaacccaAtC CA	30_1	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-3-1-8-4	GaatAttacaacccaTC CA	30_2	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-2-1-10- 3	GaatTattacaacccaTC CA	30_3	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-2-1-8-1 -1-3	GaaTattacaacccaAtC CA	30_4	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-1-1-11- 3	GaAttattacaacccaTC CA	30_5	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-1-1-10- 4	GaAttattacaacccaTC CA	30_6	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-1-8-2 -1-3	GaAttattacaacccaAtC CA	30_7	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-1-7-2 -3-2	GaAttattacaacccaTC CA	30_8	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-1-1-1-1 -6-3-1-2	GaAttattacaacccaTC CA	30_9	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-2-10- 3	GaAttattacaacccaTC CA	30_10	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	1-1-2-8-1 -1-3	GaATattacaacccaAtC CA	30_11	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	2-11-4	GaatattacaacccaTC CA	30_12	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	2-10-1-1- 3	GAatattacaacccaAtC CA	30_13	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	2-2-1-9-3	GAatAttacaacccaTC CA	30_14	12092	A
30	gaataattacaacccaatcca	2-2-1-6-1 -3-2	GAatAttacaacccaTC CA	30_15	12092	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 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における始まり	領域
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-2	GAATattacaccatcca	30_16	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-3	GAATattacaccatcca	30_17	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-4	GAATattacaccatcca	30_18	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-5	GAATattacaccatcca	30_19	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-6	GAATattacaccatcca	30_20	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-7	GAATattacaccatcca	30_21	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-8	GAATattacaccatcca	30_22	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-9	GAATattacaccatcca	30_23	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-10	GAATattacaccatcca	30_24	12092	A
30	gaataattacaccatcca	2-1-1-1-1-1-11	GAATattacaccatcca	30_25	12092	A
31	tcagaaattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-1	TcAGaaTattacaccatcca	31_1	12092	A
31	tcagaaattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-2	TcAGaaTattacaccatcca	31_2	12092	A
31	tcagaaattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-3	TcAGaaTattacaccatcca	31_3	12092	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-4	AGaaTattacaccatcca	32_1	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-5	AGaaTattacaccatcca	32_2	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-6	AGaaTattacaccatcca	32_3	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-7	AGaaTattacaccatcca	32_4	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-8	AGaaTattacaccatcca	32_5	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-9	AGaaTattacaccatcca	32_6	12093	A
32	agaataattacaccatcca	1-1-1-1-1-1-10	AGaaTattacaccatcca	32_7	12093	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 23】

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 における始まり	領域
32	agaaatattacacccattcc	1-2-2-8-1 -1-2	AgAAATattacacccAA CC	32_8	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-2-2-8-4	AgAAATattacacccAA CC	32_9	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-3	AgAAatattacacccAA CC	32_10	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-4	AgAAatattacacccAA CC	32_11	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-8-1 -1-1-1-2	AgAAatattacacCCAA CC	32_12	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-8-1 -1-4	AgAAatattacacCCAA CC	32_13	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-7-1 -3-3	AgAAatattacACCAAT CC	32_14	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-7-2 -3-2	AgAAatattacACCAAT CC	32_15	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-7-3 -2-2	AgAAatattacACCAAT CC	32_16	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-1 -9-3	AgAAATattacacccAA CC	32_17	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-1 -8-1-1-2	AgAAATattacacccAA CC	32_18	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-1 -8-4	AgAAATattacacccAA CC	32_19	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-1 -7-1-2-2	AgAAATattacacCCAA CC	32_20	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-1-1-1-1-1 -6-1-1-1-1-1-2	AgAAATattacacCCAA CC	32_21	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-2-2-1-1-1-1-3	AgAAatattacacccAA CC	32_22	12093	A
32	agaaalalacacccattcc	1-1-2-2-7-2 -2-2	AgAAalalacacCCAA CC	32_23	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-2-2-6-1 -1-2-1-2	AgAAatattacACCAAT CC	32_24	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-3-1-1-1-1-2	AgAAATattacacccAA CC	32_25	12093	A
32	agaaatattacacccattcc	1-1-3-9-3	AgAAATattacacccAA CC	32_26	12093	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 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 における始まり	領域
32	agaaataattacacccaatcc	1-1-3-8-1 -1-2	AgAAATattacacccaAt CC	32__27	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	1-1-3-8-4	AgAAATattacacccaAT CC	32__28	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	1-1-3-6-1 -1-1-1-2	AgAAATattacacCcaT CC	32__29	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-2-1-1-10- 2	AGaaTattacacccaat CC	32__30	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-2-1-9-3	AGaaTattacacccaAT CC	32__31	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-2-1-8-1 -1-2	AGaaTattacacccaAt CC	32__32	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-2-1-8-4	AGaaTattacacccaAT CC	32__33	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-1-1-1- 2	AGaAAttacacccaat CC	32__34	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-1-1-10- 3	AGaAAttacacccaAT CC	32__35	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-1-8-1 -1-3	AGaAAttacacCcaT CC	32__36	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-1-6-1 -2-4	AGaAAttacAccaT CC	32__37	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-2-10- 2	AGaATattacacccaat CC	32__38	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	2-1-2-8-1 -1-2	AGaATattacacccaAt CC	32__39	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-1-1-3	AGaAAttacacccaAT CC	32__40	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-10-1-1- 2	AGaAAttacacccaAt CC	32__41	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-7-1-3-3	AGaAAttacAccaT CC	32__42	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-7-1-2-1 -1-2	AGaAAttacAccaT CC	32__43	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-7-1-1-1- -2	AGaAAttacAccaT CC	32__44	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-2-1-9-2	AGaAAttacacccaat CC	32__45	12093	A
32	agaaataattacacccaatcc	3-1-1-10- 2	AGaATattacacccaat CC	32__46	12093	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 25】

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における始まり	領域
32	agaatattacacccatcc	3-1-1-6-1 -1-2	AGAA TattacacccA t CC	32_47	12093	A
32	agaatattacacccatcc	4-1-1-2	AGAA Tattacacccat CC	32_48	12093	A
32	agaatattacacccatcc	4-1-0-3	AGAA Tattacacccat CC	32_49	12093	A
32	agaatattacacccatcc	4-8-1-2-2	AGAA Tattacacccat CC	32_50	12093	A
32	agaatattacacccatcc	4-6-1-1-1 -2-2	AGAA Tattacacccat CC	32_51	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-4-1-9-3	Cagaa Tattacaccca TCC	33_1	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-1-1-0-3	Cagaa Tattacaccca TCC	33_2	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-1-7-1 -2-3	Cagaa Tattacaccca TCC	33_3	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-1-6-1 -3-3	Cagaa Tattacaccca TCC	33_4	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-1-6-2 -3-2	Cagaa Tattacaccca tCC	33_5	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-2-1-0-2	Cagaa Tattacaccca tCC	33_6	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-2-9-3	Cagaa Tattacaccca TCC	33_7	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-3-2-8-1 -1-2	Cagaa Tattacaccca tCC	33_8	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-1-1-1-3	CagAa Tattacaccca TCC	33_9	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-1-2-1 -8-3	CagAa Tattacaccca TCC	33_10	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-1-1-1-3	CagAa Tattacaccca TCC	33_11	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-2-1-0-3	CagAA Tattacaccca TCC	33_12	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-2-8-1 -1-3	CagAA Tattacaccca TCC	33_13	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-2-3-6-1 -3-2	CagAA Tattacaccca tCC	33_14	12093	A
33	cagaatattacacccatcc	1-1-1-3-1 -6-2-1-2	CaGaa Tattacaccca tCC	33_15	12093	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 26】

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における始まり	領域
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-1-2-1 -8-1-1-2	CaGaaTattacacca tCC	33_16	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-1-1-1 -11-2	CaGAAattacacca tCC	33_17	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-1-1-1 -10-3	CaGAAattacacca TCC	33_18	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-1-1-1 -7-1-3-2	CaGAAattacacca tCC	33_19	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-1-1-1 -6-2-1-1-1- 1-2	CaGAAattacacca tCC	33_20	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	1-1-2-1-10- 1-1-2	CaGAAattacacca tCC	33_21	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-3-1-1-10- 2	CaGaaTattacacca tCC	33_22	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-3-1-1-8-1 -1-2	CaGaaTattacacca tCC	33_23	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-2-1-1-1- 2	CaGAAattacacca tCC	33_24	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-2-1-1-10- 3	CaGAAattacacca TCC	33_25	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-2-1-1-1-1 -6-1-2-2	CaGAAAttacacca tCC	33_26	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-1-1-1-1 3	CaGAAattacacca TCC	33_27	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-1-1-10- 1-1-2	CaGAAattacacca tCC	33_28	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-1-1-1-1 -10-2	CaGAAattacacca tCC	33_29	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-1-1-1-1 -8-1-1-2	CaGAAattacacca tCC	33_30	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-2-1-1-1 2	CaGAAattacacca tCC	33_31	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	2-1-2-6-1 -4-2	CaGAAattacacca tCC	33_32	12093	A
33	cagaaatattacaccatcc	3-1-1-1-1-1 2	CaGAAattacacca tCC	33_33	12093	A
34	gaatattacaccatcc	4-8-4	GAATattacacca TC	34_1	12093	A

10

20

30

40

50

【表 5 - 27】

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 における始まり	領域
35	tcagaaatattacacccattcc	2-4-1-10-2	TCagaaATattacacccatCC	35_1	12093	A
35	tcagaaatattacacccattcc	2-3-1-11-2	TCagaaATattacacccatCC	35_2	12093	A
35	tcagaaatattacacccattcc	2-3-1-16-1-4-2	TCagaaATattacacccatCC	35_3	12093	A
36	agaaatattacacccattc	4-8-4	AGAAAtattacacccATC	36_1	12094	A
37	cagaaatattacacccattc	4-8-4	CAGAAatattacacccAT	37_1	12095	A
38	caattctcatttcaacccattc	2-14-4	CAattctcatttcaacccCTTC	38_1	39562	B
39	tcaattctcatttcaacccattc	2-15-3	TCaattctcatttcaacccCTT	39_1	39563	B
40	atcaattctcatttcaacccattc	3-15-2	ATCaattctcatttcaacccCT	40_1	39564	B
41	aatcaattctcatttcaacccattc	4-13-3	AATCaattctcatttcaaccc	41_1	39565	B
42	aaatcaattctcatttcaacccattc	4-12-4	AAATcaattctcatttcaaac	42_1	39566	B
43	caaatcaaatcctcatttcaacccattc	4-12-4	CAAAAtcaaatcctcatttcaac	43_1	39567	B
44	tcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	3-13-4	TCAaatcaaatcctcatttcaac	44_1	39568	B
45	ctcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	4-13-3	CTCAaatcaaatcctcatttcaac	45_1	39569	B
46	actcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	4-12-4	ACTCAaatcaaatcctcatttcaac	46_1	39570	B
47	aactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	4-12-4	AACtcaaatcaaatcctcatttcaac	47_1	39571	B
48	laactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	4-12-4	TAACtcaaatcaaatcctcatttcaac	48_1	39572	B
49	ttaactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	1-5-1-10-3	TtaactCAaatcaaatcctcatttcaac	49_1	39573	B
49	ttaactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	1-5-2-10-2	TtaactCAaatcaaatcctcatttcaac	49_2	39573	B
49	ttaactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	1-5-2-9-3	TtaactCAaatcaaatcctcatttcaac	49_3	39573	B
49	ttaactcaaatcaaatcctcatttcaacccattc	1-4-2-11-2	TtaactCAaatcaaatcctcatttcaac	49_4	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 28】

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における始まり	領域
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-4-3-10-2	TtaacTCAaaatcaat tctCA	49__5	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-11-1-1-2	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__6	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-11-1-4	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__7	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-10-2-1-2	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__8	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-9-1-3-2	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__9	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-9-1-2-3	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__10	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-9-1-1-1-2	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__11	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-9-1-1-4	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__12	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-9-3-1-2	TtaacTcaaatcaat tctCA	49__13	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-7-1-4-3	TtaacTcaaatcAat tctCA	49__14	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-9-3	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__15	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-8-1-2	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__16	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-8-4	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__17	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-7-1-2-2	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__18	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-7-2-1-2	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__19	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-6-1-3-2	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__20	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-6-1-2-3	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__21	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-6-1-1-1-2	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__22	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-3-1-2-1-6-1-1-4	TtaacTcAaaatcaat tctCA	49__23	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 29】

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における始まり	領域
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-2-1-6-3-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaatTctCA	49_24	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_25	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-10-3	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_26	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-9-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_27	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-9-4	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_28	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-8-2-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_29	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-10-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_30	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-9-3	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_31	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-8-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_32	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-6-1-3-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_33	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-6-1-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA	49_34	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-1-1-1-1-1-1-2	TtaaCtCAaaatcaattctCA			
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-3-1-1-1-2	TtaaCTCAaaatcaattctCA	49_35	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-3-1-1-1-1-2	TtaaCTCAaaatcaattctCA	49_36	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-4-1-1-1-2	TtaaCTCAaaatcaattctCA	49_37	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-4-1-1-1-3-2	TtaaCTCAaaatcaattctCA	49_38	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-3-4-1-1-1-3-2	TtaaCTCAaaatcaattctCA	49_39	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-2-1-1-1-1-1-2	TtaaActcaaaatcaattctCA	49_40	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-2-1-1-1-1-1-1-1-2	TtaaActcaaaatcaattctCA	49_41	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-2-1-1-1-1-1-1-4	TtaaActcaaaatcaattctCA	49_42	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-2-1-1-3-1-8-1-1-1-2	TtaaActcaaaatcaattctCA			

10

20

30

40

50

【表 5 - 30】

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 における始まり	領域
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-3-1 -7-2-1-2	TtaActcAaatcaat TctCA	49_43	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-3-1 -6-1-2-3	TtaActcAaatcaat tctCA	49_44	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-3-1 -6-1-1-1-1-1-2	TtaActcAaatcaat tctCA	49_45	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-1 -9-1-1-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_46	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-1 -9-4	TtaActCaaatcaat tctCA	49_47	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-1 -8-2-1-2	TtaActCaaatcaat TctCA	49_48	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -10-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_49	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -8-1-1-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_50	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -8-4	TtaActCaaatcaat tctCA	49_51	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -7-2-1-2	TtaActCaaatcaat TctCA	49_52	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -6-1-3-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_53	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-2-2 -6-1-1-1-1-1-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_54	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-1-1-1-2 -9-1-1-2	TtaActCaaatcaat tctCA	49_55	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-1-2 -1-2	TtaActcaaatcaat tctCA	49_56	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-1-4	TtaActcaaatcaat tctCA	49_57	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-2 -2-1-2	TtaActcaaatcaat TctCA	49_58	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-2 -3-2	TtaActcaaatcaat tctCA	49_59	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-2 -1-1-2	TtaActcaaatcaat tctCA	49_60	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-2-2-1-1-2 -1-4	TtaActcaaatcaat tctCA	49_61	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 1】

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における始まり	領域
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-9-3 -1-2	TtaaACtcaaaatcaat TctCA	49_62	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-7-1 -5-2	TtaaACtcaaaatcAat tctCA	49_63	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -10-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_64	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -8-1-1-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_65	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -8-4	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_66	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -7-2-1-2	TtaaACtCAaaatcaat TctCA	49_67	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -6-1-3-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_68	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -6-1-1-1-1-1-2	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_69	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -6-1-1-4	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_70	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-2-1 -6-3-1-2	TtaaACtCAaaatcaat TctCA	49_71	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -1-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_72	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -9-1-1-2	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_73	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -9-4	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_74	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -8-2-1-2	TtaaACtCAaaatcaat TctCA	49_75	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -10-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_76	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -8-1-1-2	TtaaACtCAaaatcaat tCTCA	49_77	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-2-1-1 -6-1-3-2	TtaaACtCAaaatcaat tctCA	49_78	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-2-4-9-1 -1-2	TtaaACTCAaaatcaat tCTCA	49_79	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-1-2	Ttaaactcaaaatcaat tCTCA	49_80	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 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における始まり	領域
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-10-1-2-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatCtCA	49_81	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-10-1-1-2-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_82	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-10-2-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatCtCA	49_83	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-10-4-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_84	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-4-1-7-2-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_85	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-4-1-6-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_86	39573	B
49	ltaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-1-9-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_87	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-1-9-4	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_88	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-1-8-2-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_89	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-2-8-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_90	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-2-7-2-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_91	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-2-6-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_92	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-3-2-6-3-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_93	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_94	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-1-10-2-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_95	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-9-1-1-3-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_96	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-9-1-1-1-1-2	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_97	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-9-1-1-1-1-4	TtAactcaaaatcaatTCtCA	49_98	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 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 における始まり	領域
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -9-3-1-2	TtAaCtcaaaatcaat TtCtCA	49__99	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -7-1-5-2	TtAaCtcaaaatcAaat tclCA	49__100	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-10-2	TtAaCtcaAaatcaat tctCA	49__101	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-8-1-1-2	TtAaCtcaAaatcaat tCtCA	49__102	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-8-4	TtAaCtcaAaatcaat tCTCA	49__103	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-7-2-1-2	TtAaCtcaAaatcaat TtCtCA	49__104	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-6-1-3-2	TtAaCtcaAaatcaat tctCA	49__105	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-6-1-1-2	TtAaCtcaAaatcaat tCtCA	49__106	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-6-1-1-4	TtAaCtcaAaatcaat tCTCA	49__107	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -2-1-6-3-1-2	TtAaCtcaAaatcaat TtCtCA	49__108	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -1-1-11-2	TtAaCtCaaatcaat tctCA	49__109	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -1-1-9-1-1-2	TtAaCtCaaatcaat tCtCA	49__110	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -1-1-8-2-1-2	TtAaCtCaaatcaat TtCtCA	49__111	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -1-2-10-2	TtAaCtCAaatcaat tctCA	49__112	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1 -1-2-8-1-1-2	TtAaCtCAaatcaat tCtCA	49__113	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 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 における始まり	領域
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-1-1-1-1-2-6-1-3-2	TtAActCAaatcaat tctCA	49_114	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-1-1-2	TtAActcaaatcaat TctCA	49_115	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-1-0-1-1-1-1-2	TtAActcaaatcaat tctCA	49_116	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-3-1-8-1-1-2	TtAActcAaatcaat tctCA	49_117	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-3-1-7-2-1-2	TtAActcAaatcaat TctCA	49_118	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-3-1-6-1-1-1-1-2	TtAActcAaatcaat tctCA	49_119	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-2-1-9-1-1-2	TtAActCaaatcaat tctCA	49_120	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-2-1-8-2-1-2	TtAActCaaatcaat TctCA	49_121	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-2-2-8-1-1-2	TtAActCAaatcaat tctCA	49_122	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-2-2-7-2-1-2	TtAActCAaatcaat TctCA	49_123	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-2-2-2-6-1-1-1-1-2	TtAActCAaatcaat tctCA	49_124	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-1-2	TtAACTcaaatcaat tctCA	49_125	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-4	TtAACTcaaatcaat tctCA	49_126	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-0-2-1-2	TtAACTcaaatcaat TctCA	49_127	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-9-1-3-2	TtAACTcaaatcaat tctCA	49_128	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-9-1-1-1-1-2	TtAACTcaaatcaat tctCA	49_129	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-9-3-1-1-2	TtAACTcaaatcaat TctCA	49_130	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-7-1-5-2	TtAACTcaaatcAat tctCA	49_131	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 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における始まり	領域
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -10-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_132	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -8-1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_133	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -7-2-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_134	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -6-1-3-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_135	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -6-1-1-1-1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_136	39573	B
49	ltaactcaaatcaatttctca	1-1-3-2-1 -6-3-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_137	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-1 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_138	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-1 -9-1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_139	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-1 -9-4	TtAACTcAaatcaattctCA	49_140	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-1 -8-2-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_141	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-2 -8-1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_142	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	1-1-3-1-1-2 -6-1-3-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_143	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-5-1-1-8-1 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_144	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-5-1-1-7-2 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_145	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-5-1-1-6-1 -1-1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_146	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-5-1-1-6-3 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_147	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-4-2-8-1 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_148	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-4-2-7-2 -1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_149	39573	B
49	ttaactcaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-1 1-1-2	TtAACTcAaatcaattctCA	49_150	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 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 における始まり	領域
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-1-4	TTaaCtcaaaatcaat tCTCA	49_151	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-10-2-1-2	TTaaCtcaaaatcaat TtCA	49_152	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-9-1-3-2	TTaaCtcaaaatcaat tctCA	49_153	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-9-1-1-1-1-2	TTaaCtcaaaatcaat tCTCA	49_154	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-7-1-5-2	TTaaCtcaaaatcAat tctCA	49_155	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-10-2	TTaaCtCAaaatcaat tctCA	49_156	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-8-1-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_157	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-8-4	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_158	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-7-2-1-2	TTaaCtCAaaatcaat TtCA	49_159	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-6-1-3-2	TTaaCtCAaaatcaat tctCA	49_160	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-2-1-6-1-1-1-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_161	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-1-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tctCA	49_162	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-9-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_163	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-10-2	TTaaCtCAaaatcaat tctCA	49_164	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-2-1-1-1-6-1-3-2	TTaaCtCAaaatcaat tctCA	49_165	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-1-1-1-10-1-1-1-1-2	TTaaCtcaaaatcaat tCTCA	49_166	39573	B
49	ltaactcaaaatcaatttctca	2-1-1-2-1-9-1-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_167	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-1-1-2-1-8-1-1-2	TTaaCtCAaaatcaat tCTCA	49_168	39573	B
49	ttaactcaaaatcaatttctca	2-1-2-9-1-1-1-1-2	TTaaCtcaaaatcaat tCTCA	49_169	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 37】

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 における始まり	領域
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	2-1-2-2-1-2-2-1-2-2-1-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__170	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	2-1-2-2-2-1-2-2-1-2-2-1-2-1-1-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__171	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-1-1-1-1-1-2	TTAAactcaaaatcaatTCTCA	49__172	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-10-1-2-2-1-1-2	TTAAactcaaaatcaatTCTCA	49__173	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-10-1-1-1-2-2-1-2	TTAAactcaaaatcaatTCTCA	49__174	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-4-1-7-2-1-2	TTAAactcAaaatcaatTCTCA	49__175	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-4-1-6-1-1-1-1-2	TTAAactcAaaatcaatTCTCA	49__176	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-3-1-9-1-1-2	TTAAactCaaatcaatTCTCA	49__177	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-3-1-9-4	TTAAactCaaatcaatTCTCA	49__178	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-3-1-8-2-1-2	TTAAactCaaatcaatTCTCA	49__179	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-3-2-8-1-1-2	TTAAactCAaaatcaatTCTCA	49__180	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-1-1-1-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__181	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-9-1-3-2	TTAAactcaaaatcaatTCTCA	49__182	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-9-1-1-1-1-2	TTAAactcaaaatcaatTCTCA	49__183	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-7-1-5-2	TTAACTcAaaatcAatTCTCA	49__184	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-2-1-10-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__185	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-2-1-8-1-1-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__186	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-2-1-6-1-3-2	TTAACTcAaaatcaatTCTCA	49__187	39573	B
49	ttaaactcaaaatcaatttctca	3-1-1-1-1-1-1-2	TTAACTCaaatcaatTCTCA	49__188	39573	B

10

20

30

40

50

【表 5 - 38】

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における始まり	領域
49	ttaaactcaaatcaatttctca	4-12-4	TTAAactcaaatcaat tCTCA	49__189	39573	B
49	ttaaactcaaatcaatttctca	4-11-2-1-2	TTAAactcaaatcaat TctCA	49__190	39573	B
49	ttaaactcaaatcaatttctca	4-3-1-7-2	TTAAactcaaatcaat TctCA	49__191	39573	B
49	ttaaactcaaatcaatttctca	4-2-1-9-1-1-2	TTAAactCaaatcaat tCtCA	49__192	39573	B
50	tttaactcaaatcaatttctc	4-12-4	TTAAactcaaatcaa LCTC	50__1	39574	B
51	tttaactcaaatcaatttctc	4-11-4	TTAAactcaaatcaa TtCT	51__1	39575	B
52	ccctttaaattcaattag	4-8-4	CCTTttaaattcaTTA G	52__1	72861	C
53	caacaacctttaaattcaatta	4-12-4	CAACaacctttaaatt cATTA	53__1	72862	C
54	aacaacctttaaattcaatt	4-10-4	ACAacctttaaattC ATT	54__1	72863	C
55	catcaaacacctttaaattca	2-14-4	Catcaaacacctttaa aTTCA	55__1	72865	C
56	clcalcaaacaccllllaall	4-14-2	CTCAlcaaacacclll laatt	56__1	72867	C
57	actcaatcaaacacctttaa	2-14-4	ACTcaatcaaacacct tTAAT	57__1	72868	C
58	aaactcaataaacacctttaa	3-13-4	AACtcaataaacacct tTTAA	58__1	72869	C
59	taactcatcaaacacctttaa	4-14-2	TAACtcatcaaacacc tttTA	59__1	72870	C
60	ttaaactcatcaaacacctt	4-13-3	TTAAactcatcaaacac cTTTT	60__1	72871	C
61	ttaaactcatcaaacacclll	3-12-4	TTAAactcatcaaacac CITT	61__1	72872	C
62	ttaaactcatcaaacacctt	3-11-4	TTAAactcatcaaacac CITT	62__1	72873	C
63	ttaaactcatcaaacacct	4-9-4	TTAAactcatcaaacAC CT	63__1	72874	C
64	gttaactcatcaaacace	4-10-3	GTTAactcatcaaacA CC	64__1	72875	C
65	gttaactcatcaaacac	4-9-3	GTTAactcatcaaacA C	65__1	72876	C

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 9】

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における始まり	領域
66	atttccaaaattcacttttac	1-1-3-10- 2-1-2	AttTCc aaaattcact TtAC	66-1	133964	-
67	c c g t t t t c t t a c c a c c c t	5-10-5	C C G T T t t e t t a e e A C C C T	67-1	114184	-

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。

【0392】

設計は、ギャップマ設計である F - G - F ' を指す。古典的なギャップマ設計、例えば 3 - 10 - 3 では、フランク内の全ヌクレオチド (F 及び F ') は、同じ 2 ' 糖修飾ヌクレオシド、例えば LNA、cET、又は MOE と、ギャップ (G) を形成する中央の DNA ストレッチとで構成される。交互フランク設計のギャップマでは、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、いくつかの 2 ' 糖修飾ヌクレオシド (M) の後にいくつかの DNA ヌクレオシド (D) が続くことを表す。例えば、2 - 2 - 1 モチーフのフランクは 5 ' [M]₂ - [D]₂ - [M]₃ ' を表し、1 - 1 - 1 - 1 - 1 モチーフは 5 ' [M] - [D] - [M] - [D] - [M]₃ ' を表す。両方のフランクは 5 ' 末端及び 3 ' 末 50

10

20

30

40

端に2'糖修飾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(典型的には、6~16個)で構成されている。

【0393】

表中の見出し「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-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、下線付きの大文字はMOEヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、全LNA-Cは5-メチルシトシンであり、eは5-メチルシトシンDNAを表し、全ヌクレオシド間結合は、ヌクレオチド間の下付き文字でマークされない限りホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、下付きのoはホスホジエステル結合を表す。

【0394】

オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド合成は当該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。

【0395】

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、オリゴヌクレオチドを、水性アンモニアを用いて5~16時間60℃で固相支持体をから切断する。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ESI-MSによって更に確認する。

【0396】

オリゴヌクレオチドの伸長：

-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(ibz)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-メチル-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmz)、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、又はそのようなコンジュゲート基を使用できる。ホスホロ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典型的に使用される試薬である。

【0397】

固相合成後のコンジュゲーションでは、市販のC6アミノリンカホルホラミダイト(phorphoramidite)を固相合成の最後のサイクルで使用することができ、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。

【0398】

RP-HPLCによる精製：

粗化合物は、Phenomenex Jupiter C18 10 μ 150 \times 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。

【0399】

省略語：

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

10

20

30

40

50

T H F : テトラヒドロフラン

B z : ベンゾイル

I b u : イソブチリル

R P - H P L C : 逆相高速液体クロマトグラフィ

【0400】

T_mアッセイ:

オリゴヌクレオチドとRNA標的(リン酸結合、PO)二重鎖を、500mLのRNAseフリー水で3mMに希釈し、500mLの2倍T_m緩衝液(200mMのNaCl、0.2mMのEDTA、20mMリン酸、pH7.0)と混合する。この溶液を95℃で3分間加熱し、次いで、室温で30分間アニールする。二重鎖の融解温度(T_m)は、PE TempLabソフトウェア(Perkin Elmer)を用いて、ペルチェ温度プログラムPTP6を備えたLambda 40 UV/VIS分光光度計で測定する。温度を20℃から95℃に上昇させ、次いで25℃に低下させ、260nmで吸収を記録する。一次導関数と、融解及びアニーリングの両方の極大値とを使用して、二重鎖T_mを評価する。

10

【0401】

初代神経細胞培養物

初代ニューロン培養物を、マウスTauノックアウトバックグラウンドでヒトTau導入遺伝子を発現するE18トランスジェニックマウスの前脳から確立した。(Andorferら、「J Neurochem」第86巻第582~590頁(2003年))。初代ニューロンは、製造者のプロトコルに従ってパパイソ消化により生成した(Worthington Biochemical Corporation、LK0031050)。簡単に述べれば、マウスMAPTヌルバックグラウンド上でヒト微小管関連タンパク質Tau(MAPT)遺伝子全体を発現するhTauマウスE18 BAC-Tg胚から前脳を解剖し、パパイソ/DNアーゼ/イーグル平衡塩溶液(Earle's balanced salt solution:EBSS)溶液中で37℃にて30~45分間インキュベートした。細胞ペレットの粉碎及び遠心分離後、反応をEBSS含有プロテアーゼ阻害剤、ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin:BSA)、及びDNアーゼとのインキュベーションにより停止した。細胞を粉碎し、2%B-27、100µg/mLペニシリン、85µg/mLストレプトマイシン、及び0.5mMグルタミンを補充したNeurobasal(NB、Invitrogen)で洗浄した。

20

30

【0402】

トランスジェニックTauマウス(hTauマウス)

ヒトPAC由来のTau導入遺伝子、Tauプロモータにより駆動されるH1ハプロタイプ(Polydoroら、「J. Neurosci.」(2009年)第29巻第34号第10741~9頁)を発現し、天然マウスTau遺伝子を欠失した雌雄トランスジェニックマウス(30~40g)を使用して、忍容性、薬力学的エンドポイント、及び組織薬剤濃度を評価した。

【0403】

動物を一定の温度(21±2℃)及び湿度(50±10%)に維持したコロニー室で保持し、12時間/日照射した(0600時間点灯)。全ての動物は試験期間中、自由に食物及び水を摂取することができた。行動学的研究は0700~1500時間実施された。

40

【0404】

脳室内(ICV)注射は、Halley and McCormickの方法に従って、27又は30ゲージ針を装着したハミルトン・マイクロ・シリンジを用いて実施した。針は、脳への侵入を制限するため、先端から2.5mmにポリエチレンガードを装着した。マウスはイソフルラン麻酔薬(1.5~4%)を用いて麻酔した。注射されるマウスは、片手の親指と人差し指とで首の後ろのたるんだ皮膚を保持した。次いで、優しくではあるがしっかりとした圧力をかけ、動物の頭部をしっかりとした平らな表面に押し付けることによって固定した。次いで、針の先端を、頭皮及び頭蓋骨を通して、十字縫合の約1mm外側

50

及び1 mm尾側に挿入した。針を位置決めして、生理食塩水ビヒクル中に5マイクロリットルの体積でASOを投与し、右（又は左）側脳室に20～30秒かけて注入した。針を10秒間留置した後、抜去した。この処置は手術又は切開を必要としない。処置から回復するまで動物を加熱パッドで温めた。

【0405】

投与3日後及び／又は4週間後、マウスをイソフルラン過量投与、続いて急速に断頭することで殺し、脳組織（右前頭皮質領域）を後のTau qPCRのためにドライアイス上で採取した。

【0406】

【化6】

ヒト幹細胞由来ニューロンの細胞培養及び分化に使用される培地
N2B27+SFA培地=N2B27+S, F, Aサイトカイン

使用したサイトカイン	参照	販売元	ストック	N2B27（希釈） における最終使用
SHH （ソニックヘッジホッグ）	100-45	Pepr otech	PBS+0.1%BSA 中100ug/mL	1:500（200 ng/mL）
FGF8	100-25	Pepr otech	100ug/mL	1:1000（10 0ng/mL）
AA（Aa2-P）	A8960	Sigma	DMEM:F12中P BS+0.1%BSA 100mM	1:1000

10

20

【0407】

【化7】

N2B27+BGA培地=N2B27+B, G, Aa, cAサイトカイン+P/S+ラミニン

使用したサイトカイン	参照	販売元	ストック	N2B27（希釈） における最終使用
BDNF	450-02	Pepr otech	PBS+0.1%BSA 中20ug/mL	1:1000
GDNF	450-10	Pepr otech	PBS+0.1%BSA 中10ug/mL	1:1000
AA（Aa2-P）	A8960	Sigma	DMEM:F12中10 0mM	1:1000
cAMP	D009	BIOLOG Life Sc ience	水中200mM	1:400
PenStrep	15140- 122	Gibco		1%
ラミニン	112432 17001	Roche	1mg/mL	1:500

30

【0408】

実施例1

ASO標的化MAPTイントロンのインビトロスクリーニング

アンチセンスオリゴヌクレオチド（antisense oligonucleotide：ASO）スクリーニングを、807のASOの標的化MAPTイントロンを用いて、ヒト化Tauマウス由来の初代神経細胞で実施した。

40

【0409】

インビトロでMAPT mRNAを低減するASOの能力を、QuantiGene（登録商標）分析によって測定した。各Tau mRNA低減は、アッセイのバックグラウンドシグナルを差し引き、ハウスキーピング遺伝子チューブリンmRNAシグナルを介して各ウェルを正常化することによって標準化した。

【0410】

初代神経細胞培養物を、「材料及び方法」セクションに記載されている通りに調製し、ポリ-D-リジンで被覆した384ウェルプレート上に10,000細胞/ウェルで播種

50

し、B27、GlutaMAX、及びペニシリン - ストレプトマイシンを含有するNeurobasal培地中で維持した。ASOを水で希釈し、DIV01で細胞に加えて、最終濃度0.5 μ Mにした。ASO添加後、ニューロンを37℃及び5%CO₂で5日間インキュベートして、mRNAの定常状態低減を達成した。培地を除去し、細胞をDPBS中で1回洗浄した。溶解物メッセンジャーRNAの測定は、QuantiGene（登録商標）2.0試薬システム（Affymetrix（登録商標））を用いて行った。これは、特異的に設計されたRNA捕捉プローブセットに依存する分岐DNA - シグナル増幅方法を用いてRNAを定量する。50 μ LのプロテイナーゼKを予め加温した溶解混合物（Lysis mix）5 mLに加えて作製した作動細胞溶解緩衝液を用いて細胞を溶解し、dH₂Oで1:4の最終希釈に希釈した。作動溶解緩衝液をプレート（45 μ L/ウェル）に加え、粉碎して混合し、密封し、55℃で30分間インキュベートした。溶解後、ウェルを-80℃で保存するか、又は直ちにアッセイした。

10

【0411】

溶解物を、使用した特異的捕捉プローブ（Tau又はチューブリン）に応じて、溶解混合物中で希釈した。次いで、合計27 μ L/ウェルを捕捉プレート（捕捉プローブで被覆された384ウェルのポリスチレンプレート）に加えた。2.2 mLのヌクレアーゼフリー水、1.2 mLの溶解混合物、184 μ Lのブロッキング試薬、並びに66.8 μ Lの特異的2.0プローブセットのヒトMAPT（カタログ番号15486）及びマウス3チューブリン（カタログ番号SB-17245）を、製造者の指示（QuantiGene（登録商標）2.0 Affymetrix（登録商標））に従って合わせることによって、作動プローブセット試薬を生成した。次いで、7 μ Lの作動プローブセット試薬を、捕捉プレート上の27 μ Lの溶解物希釈液（又はバックグラウンド試料用の溶解混合物27 μ L）に加えた。プレートを遠心分離し、次いで16~20時間55℃でインキュベートして、ハイブリダイズした（標的RNA捕捉）。標的RNAのシグナル増幅及び検出は、未結合材料を除去するために、緩衝液で3回プレートを洗浄することによって開始した。2.0増幅ハイブリダイゼーション試薬（30 μ L/ウェル）を加え、55℃で1時間インキュベートし、次いで吸引し、洗浄緩衝液を加え、3回吸引した。次いで、2.0増幅ハイブリダイゼーション試薬を記載の通りに加え（30 μ L/ウェル）、55℃で1時間インキュベートし、前述の通りに洗浄を繰り返した。次に、2.0ラベル・プローブ・ハイブリダイゼーション試薬を加え（30 μ L/ウェル）、50℃で1時間インキュベートし、前述の通りに洗浄を繰り返した。最後に、プレートを遠心分離して過剰な洗浄緩衝液を全て除去し、2.0基質（30 μ L/ウェル）を加えた。プレートを室温で5分間インキュベートし、プレートをルミノメータモードのPerkinElmer Envisionマルチラベルリーダ上で15分以内に画像化した。

20

30

【0412】

目的の遺伝子について、平均アッセイ・バックグラウンド・シグナルを、各技術的反復の平均シグナルから差し引いた。バックグラウンドで差し引かれた目的遺伝子の平均シグナルを、ハウスキーピングチューブリンRNAのバックグラウンドで差し引かれた平均シグナルで割る。処理試料に対する阻害パーセントを、未処理試料に対して計算した（すなわち、値が低いほど阻害は増大する）。未処理試料のバックグラウンドの可変性は、バックグラウンドと等しい又はバックグラウンドより高い処理試料のパーセント阻害をもたらし得る。これらの場合、パーセント阻害は、対照の100%阻害として表される（すなわち、阻害なし）。

40

【0413】

図1は、全807のASOによって達成されたMAPT mRNA低減を示す。図では、MAPT標的核酸上の3つの領域A、B、及びCが示されている。これらの領域ではASOの分布率が高く、対照（100%）と比較して標的を40%以下に低減している。

【0414】

実施例2

MAPT上の選択された領域を標的とするASOのインビトロスクリーニング

50

実施例 1 のスクリーニングに基づいて、A S O の新規ライブラリを、図 1 に示される通り領域 A、B、及び C を標的とするように設計した。モチーフ配列及びオリゴヌクレオチド化合物を上記の表 5 に示す。

【 0 4 1 5 】

スクリーニングは実施例 1 に記載の通り行った。結果を表 6 に示す。

【 0 4 1 6 】

【表 6 - 1】

抗 M A P T 化合物のインビトロスクリーニング

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
6_1	T C A C t c a t g c c t t a a T C	2
7_1	T A A T c a c t c a t g c C T T A	1 5
8_1	T A A T c a c t c a t g C C T T	3 4
9_1	C t t t a a t t t t a a T c a C t C A T	4 1
9_2	C t t t a a t t t t a a T c A C t C A T	3 6
9_3	C t t t a a t t t t a a T C a c t C A T	2 8
9_4	C t t t a a t t t t a a T C a c T C A T	3 1
9_5	C t t t a a t t t t a a T C a C t c A T	2 8
9_6	C t t t a a t t t t a a T C a C t C A T	5 5
9_7	C t t t a a t t t t a a T C A c t c A T	3 0
9_8	C t t t a a t t t t a a T C A c t C A T	2 1
9_9	C t t t a a t t t t a a T C A c T C A T	6 1
9_10	C t t t a a t t t t a a T C A C t c A T	2 4
9_11	C t t t a a T t t t a a t c a c T C A T	1 4
9_12	C t t t a a T t t t a a t c a C t C A T	2 2
9_13	C t t t a a T t t t a a t c A c t C A T	3 3
9_14	C t t t a a T t t t a a t c A c T C A T	9
9_15	C t t t a a T t t t a a t c A C t C A T	2 0
9_16	C t t t a A t t t t a a t c a c T C A T	1 7
9_18	C t t t A a t t t t a a t c a c T C A T	1 0
9_19	C t t t A a t t t t a a t c a C t C A T	1 7
9_20	C t t t A a T t t t a a t c a c T C A T	0
9_21	C t t t A A t t t t a a t c a c T C A T	3
9_22	C t t t A A T t t t a a t c a c T C A T	1
9_23	C t t T a a t t t t a a t c a c T C A T	1 3
9_24	C t t T a a t t t t a a t c a C t C A T	1 3
9_25	C t t T a a T t t t a a t c a c T C A T	4
9_26	C t t T a A t t t t a a t c a c T C A T	4
9_27	C t t T a A T t t t a a t c a c T C A T	1
9_28	C t t T A a t t t t a a t c a c t C A T	1 2
9_29	C t t T A a t t t t a a t c a c T C A T	1
9_30	C t t T A a t t t t a a t c a C t c A T	1 5
9_31	C t t T A a t t t t a a t c a C t C A T	4
9_32	C t t T A a T t t t a a t c a c T C A T	1
9_33	C t t T A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_34	C t t T A A T t t t a a t c a c t c A T	4
9_35	C t t T A A T t t t a a t c a c T C A T	1
9_36	C t T t a a T t t t a a t c a c T C A T	5
9_37	C t T t a A t t t t a a t c a c T C A T	7
9_38	C t T t a A T t t t a a t c a c T C A T	2
9_39	C t T t A a t t t t a a t c a c T C A T	3
9_40	C t T t A a t t t t a a t c a C t C A T	9
9_41	C t T t A a T t t t a a t c a c T C A T	4
9_42	C t T t A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_43	C t T t A A T t t t a a t c a c T C A T	1
9_44	C t T T a a t t t t a a t c a c T C A T	2
9_45	C t T T a a t t t t a a t c a C t c A T	1 5
9_46	C t T T a a t t t t a a t c a C t C A T	3
9_47	C t T T a a T t t t a a t c a c T C A T	2
9_48	C t T T a A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_49	C t T T a A T t t t a a t c a c t c A T	1
9_50	C t T T a A T t t t a a t c a c T C A T	1

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
9_51	C t T T A a t t t t a a t c a c t C A T	1
9_52	C t T T A a t t t t a a t c a c T C A T	1
9_53	C t T T A a t t t t a a t c a C t c A T	6
9_54	C t T T A a t t t t a a t c a C t C A T	2
9_56	C t T T A a T t t t a a t c a c T C A T	1
9_57	C t T T A A t t t t a a t c a c t c A T	1
9_58	C t T T A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_59	C T t t a a t t t t a a t c A c t C A T	39
9_60	C T t t a a t t t t a a t c A c T C A T	10
9_61	C T t t a a t t t t a a t c A C t C A T	20
9_62	C T t t a a t t t t a a T C a c t c A T	26
9_63	C T t t a a t t t t a a T C a c t C A T	14
9_64	C T t t a a t t t t a a T C a c T C A T	14
9_65	C T t t a a t t t t a a T C a C t c A T	15
9_66	C T t t a a t t t t a a T C a C t C A T	38
9_67	C T t t a a t t t t a a T C A c t c A T	9
9_68	C T t t a a t t t t a a T C A c t C A T	12
9_69	C T t t a a t t t t a a T C A C t c A T	9
9_70	C T t t a a T t t t a a t c a c t C A T	42
9_71	C T t t a a T t t t a a t c a c T C A T	6
9_72	C T t t a a T t t t a a t c a C t c A T	49
9_73	C T t t a a T t t t a a t c a C t C A T	15
9_74	C T t t a a T t t t a a t c A c t C A T	16
9_75	C T t t a a T t t t a a t c A c T C A T	12
9_76	C T t t a a T t t t a a t c A C t c A T	32
9_77	C T t t a a T t t t a a t c A C t C A T	15
9_78	C T t t A a t t t t a a t c a c t C A T	21
9_79	C T t t A a t t t t a a t c a c T C A T	3
9_80	C T t t A a t t t t a a t c a C t C A T	10
9_81	C T t t A a T t t t a a t c a c T C A T	2
9_82	C T t t A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_84	C T t T a a t t t t a a t c a C t c A T	22
9_85	C T t T a a t t t t a a t c a C t C A T	8
9_86	C T t T a A t t t t a a t c a c T C A T	2
9_89	C T t T A a t t t t a a t c a c T C A T	1
9_90	C T t T A a t t t t a a t c a C t c A T	5
9_92	C T t T A a T t t t a a t c a c t c A T	1
9_94	C T t T A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_97	C T T t A a t t t t a a t c a c t C A T	0
9_98	C T T t A a t t t t a a t c a c T C A T	1
9_99	C T T t A a t t t t a a t c a C t c A T	7
9_100	C T T t A a t t t t a a t c a C t C A T	3
9_101	C T T t A A t t t t a a t c a c T C A T	1
9_103	C T T T a a t t t t a a t c a c T C A T	0
9_105	C T T T a a T t t t a a t c a c t c A T	0
9_106	C T T T a A t t t t a a t c a c T C A T	1
10_1	G c t t t a a t t t t a a T c a C t C A T	35
10_2	G c t t t a a t t t t a a T C a c t c A T	56
10_3	G c t t t a a t t t t a a T C a c t C A T	18
10_4	G c t t t a a t t t t a a T C a c T C A T	21
10_5	G c t t t a a t t t t a a T C a C t c A T	16
10_6	G c t t t a a t t t t a a T C a C t C A T	35
10_7	G c t t t a a t t t t a a T C A c t c A T	22
10_8	G c t t t a a t t t t a a T C A C t c A T	12
10_9	G c t t t a a T t t t a a t c a c t C A T	61

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
10_10	G c t t t t a a T t t a a t c a c T C A T	19
10_11	G c t t t t a a T t t a a t c a C t c A T	76
10_12	G c t t t t a a T t t a a t c a C t C A T	12
10_13	G c t t t t a a T t t a a T c a C t C A T	15
10_14	G c t t t t a a T t t a a T C a c t C A T	7
10_15	G c t t t t a a T t t a a T C a C t c A T	14
10_16	G c t t t t a a T t t a a T C A c t c A T	10
10_17	G c t t t t a A t t t a a t c a c T C A T	28
10_18	G c t t t t A a t t t a a t c a c T C A T	16
10_19	G c t t t t A a t t t a a t c a C t C A T	13
10_20	G c t t t t A a T t t a a t c a c T C A T	2
10_21	G c t t t t A A t t t a a t c a c T C A T	3
10_22	G c t t t t A A T t t a a t c a c T C A T	1
10_23	G c t t t T a a t t t a a t c a c T C A T	18
10_24	G c t t t T a a t t t a a t c a C t c A T	51
10_25	G c t t t T a a t t t a a t c a C t C A T	8
10_26	G c t t t T a a T t t a a t c a c T C A T	4
10_27	G c t t t T a A t t t a a t c a c T C A T	3
10_28	G c t t t T A a t t t a a t c a c T C A T	2
10_29	G c t t t T A a t t t a a t c a C t c A T	13
10_30	G c t t t T A a t t t a a t c a C t C A T	3
10_31	G c t T t t a a T t t a a t c a c T C A T	4
10_32	G c t T t t a A t t t a a t c a c T C A T	6
10_33	G c t T t t A a t t t a a t c a c T C A T	3
10_34	G c t T t t A a t t t a a t c a C t c A T	18
10_35	G c t T t t A a t t t a a t c a C t C A T	6
10_36	G c t T t t A a T t t a a t c a c T C A T	2
10_37	G c t T t t A A t t t a a t c a c T C A T	1
10_38	G c t T t T a a t t t a a t c a c T C A T	1
10_39	G c t T t T a a t t t a a t c a C t c A T	12
10_40	G c t T t T a a t t t a a t c a C t C A T	3
10_41	G c t T t T a A t t t a a t c a c T C A T	1
10_42	G c t T t T A a t t t a a t c a C t c A T	5
10_43	G c T t t t a a t t t a a T C a c t c A T	15
10_44	G c T t t t a a t t t a a T C a c t C A T	11
10_45	G c T t t t a a t t t a a T C a C t c A T	15
10_46	G c T t t t a a t t t a a T C A c t c A T	7
10_47	G c T t t t a a T t t a a t c a c t C A T	23
10_48	G c T t t t a a T t t a a t c a c T C A T	6
10_49	G c T t t t a a T t t a a t c a C t c A T	34
10_50	G c T t t t a a T t t a a t c a C t C A T	12
10_51	G c T t t t a A t t t a a t c a c T C A T	10
10_52	G c T t t t A a t t t a a t c a c T C A T	5
10_53	G c T t t t A a t t t a a t c a C t c A T	26
10_54	G c T t t t A a t t t a a t c a C t C A T	10
10_55	G c T t t t A a T t t a a t c a c T C A T	3
10_56	G c T t t t A A t t t a a t c a c T C A T	2
10_57	G c T t t T a a t t t a a t c a c T C A T	5
10_58	G c T t t T a a t t t a a t c a C t C A T	9
10_59	G c T t t T a a T t t a a t c a c T C A T	5
10_60	G c T t t T a A t t t a a t c a c T C A T	4
10_61	G c T t t T A a t t t a a t c a C t c A T	10
10_62	G c T t t T A A t t t a a t c a c t c A T	4
10_63	G c T T t a a T t t a a t c a c T C A T	2
10_64	G c T T t a A t t t a a t c a c t c A T	21

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
10__65	GcTTTtAAttttaaatcaactCAT	2
10__66	GcTTTtAAttttaaatcaactCAT	2
10__67	GcTTTtAAttttaaatcaactCAT	1
10__68	GcTTTtAAttttaaatcaactcAT	4
10__69	GcTTTtAAttttaaatcaactcAT	1
10__70	GcTTTtAAttttaaatcaactcAT	5
10__71	GCttttaaattttaaatCactcAT	71
10__72	GCttttaaattttaaatCactcAT	22
10__73	GCttttaaattttaaatCactcAT	76
10__74	GCttttaaattttaaatCactcAT	25
10__75	GCttttaaattttaaatcaactcAT	43
10__76	GCttttaaattttaaatcaactcAT	25
10__77	GCttttAAttttaaatcaactcAT	13
10__78	GCttttAAttttaaatcaactcAT	22
10__79	GCtttTaattttaaatcaactcAT	16
10__80	GCtttTaattttaaatcaactcAT	8
10__81	GCtttTAAAttttaaatcaactcAT	3
10__82	GCtTTtAAttttaaatcaactcAT	21
10__83	GCtTTtAAttttaaatcaactcAT	7
10__84	GCtTTtAAttttaaatcaactcAT	3
10__85	GCTtttaaattttaaatCactcAT	29
10__86	GCTtttaaattttaaatCactcAT	32
10__87	GCTtttAAttttaaatcaactcAT	38
10__88	GCTtttAAttttaaatcaactcAT	6
10__89	GCTtTaattttaaatcaactcAT	9
11__1	CTTTAaattttaaatcaCTCA	0
12__1	CTTTAaattttaaatcaCTC	0
19__1	ACAaccatccaagtCAAT	20
20__1	TACaccatccaagtCAA	18
21__1	TTACaccatccaagtCA	0
22__1	TTACaccatccaagTTC	5
23__1	AATAtttacaccatCCAA	0
24__1	AgaaTatttacaccatCCAA	11
24__2	AgaaTatttacaccatCCAA	8
24__3	AgaaTatttacaccatCCAA	6
24__4	AgaaTatttacaccatCCAA	11
24__5	AgaaTatttacaccatCCAA	14
24__6	AgaaTatttacaccatCCAA	6
24__7	AgaaTatttacaccatCCAA	2
24__8	AgaaTatttacaccatCCAA	12
24__9	AgaaTatttacaccatCCAA	11
24__10	AgaaTatttacaccatCCAA	18
24__11	AgaaTatttacaccatCCAA	10
24__12	AgaaTatttacaccatCCAA	12
24__13	AgaaTatttacaccatCCAA	1
24__14	AgaaTatttacaccatCCAA	1
24__15	AgaaTatttacaccatCCAA	9
24__16	AgaaTatttacaccatCCAA	0
24__17	AgaaTatttacaccatCCAA	10
24__18	AgaaTatttacaccatCCAA	3
24__19	AgAaatatttacaccatCCAA	10
24__20	AgAaatatttacaccatCCAA	13
24__21	AgAaatatttacaccatCCAA	0
24__22	AgAaatatttacaccatCCAA	3
24__23	AgAaatatttacaccatCCAA	13

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

CMP 番号	化合物	対照の%MAPT mRNA
24_24	AgAaTattacaccAtCcAA	1
24_25	AgAaTattacaccATCcAA	8
24_26	AgAaTattacaccCatCcAA	3
24_27	AgAaTattacaccCatCcAA	1
24_28	AgAaTattacaccCatCcAA	5
24_29	AgAaTattacaccATCcAA	13
24_30	AgAaTattacaccatCcAA	10
24_31	AgAaTattacaccatCcAA	4
24_32	AgAaTattacaccATCcAA	12
24_33	AgAaTattacaccAtCcAA	13
24_34	AgAaTattacaccAtCcAA	5
24_35	AgAaTattacaccATCcAA	4
24_36	AGaAtattacaccATCcAA	5
24_37	AGaAtattacaccCatCcAA	2
24_38	AGaAtattacaccatCcAA	11
24_39	AGaAtattacaccatCcAA	3
24_40	AGaAtattacaccATCcAA	17
24_41	AGaAtattacaccAtCcAA	9
24_42	AGaAtattacaccAtCcAA	2
24_43	AGaAtattacaccATCcAA	5
24_44	AGaAtattacaccATCcAA	9
24_45	AGaAtattacaccCatCcAA	3
24_46	AGaAtattacaccATCcAA	9
24_47	AGaAtattacaccATCcAA	26
24_48	AGaAtattacaccatCcAA	8
24_49	AGaAtattacaccatCcAA	0
24_50	AGaAtattacaccATCcAA	2
24_51	AGaAtattacaccAtCcAA	4
24_52	AGaAtattacaccAtCcAA	0
24_53	AGaAtattacaccatCcAA	1
24_54	AGaAtattacaccATCcAA	5
24_55	AGaAtattacaccAtCcAA	1
24_56	AGaAtattacaccAtCcAA	0
24_57	AGaAtattacaccatCcAA	0
24_58	AGaAtattacaccAtCcAA	13
24_59	AGaAtattacaccATCcAA	11
24_60	AGaAtattacaccatCcAA	11
24_61	AGaAtattacaccCatCcAA	56
24_62	AGaAtattacaccatCcAA	4
25_1	CagAaTattacaccATCcAA	8
25_2	CagAaTattacaccATCcAA	11
25_3	CagAaTattacaccATCcAA	9
25_4	CagAaTattacaccATCcAA	12
25_5	CagAaTattacaccATCcAA	20
25_6	CagAaTattacaccATCcAA	10
25_7	CagAaTattacaccATCcAA	6
25_8	CagAaTattacaccatCcAA	5
25_9	CagAaTattacaccatCcAA	6
25_10	CagAaTattacaccATCcAA	9
25_11	CagAaTattacaccATCcAA	12
25_12	CagAaTattacaccATCcAA	11
25_13	CagAaTattacaccAtCcAA	2
25_14	CagAaTattacaccATCcAA	19
25_15	CagAaTattacaccatCcAA	13
25_16	CagAaTattacaccATCcAA	7

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
25__17	C a g A a T a t t a c a c c A t c C A A	0
25__18	C a g A a T a t t a c a c c A t C c A A	13
25__19	C a g A a T a t t a c a c C a T C c A A	6
25__20	C a g A a T A t t a c a c C a t C c A A	12
25__21	C a g A A t a t t a c a c C A t c c A A	2
25__22	C a g A A t a t t a c a c C A t C c A A	25
25__23	C a G a a T a t t a c a c c a t c C A A	2
25__24	C a G a a T a t t a c a c c a t C c A A	3
25__25	C a G a a T a t t a c a c c a T C c A A	5
25__26	C a G a a T a t t a c a c c A t c C A A	0
25__27	C a G a a T a t t a c a c c A t C c A A	10
25__28	C a G a a T a t t a c a C c a t c c A A	4
25__29	C a G a A t a t t a c a c c a t C c A A	6
25__30	C a G a A t a t t a c a c c a T C c A A	3
25__31	C a G a A t A t t a c a c c a t C c A A	6
25__32	C a G a A t A t t a c a c C A t c c A A	2
25__33	C a G A a t a t t a c a c c A t C c A A	5
25__34	C a G A a t a t t a c a C c A t c c A A	10
25__35	C A g a a T a t t a c a c c a t C c A A	5
25__36	C A g a a T a t t a c a c c A t c c A A	5
25__37	C A g a a T a t t a c a c c A t C c A A	3
25__38	C A g a A t a t t a c a c c a t C c A A	26
25__39	C A g A a t a t t a c a c c A t c c A A	1
25__40	C A g A a t a t t a c a c c A t C c A A	11
25__41	C A g A a T a t t a c a c c A t c c A A	6
25__42	C A g A a T a t t a c a c C a t c c A A	73
25__43	C A g A A t a t t a c a c c a t C c A A	1
26__1	G a a t a t t a c a c C A t C C A A	11
26__2	G a a t a t t a c a c C A T c C A A	13
26__3	G a a t a t t a c a c C A T C c A A	10
26__4	G a a T a t t a c a c c a t C C A A	0
26__5	G a a T a t t a c a c c a t C C A A	2
26__6	G a a T a t t a c a c c A t C C A A	0
26__7	G a a T A t t a c a c C A t C c A A	8
26__8	G a A t a t t a c a c c a t C C A A	1
26__9	G a A t A t t a c a c c a t C C A A	1
26__10	G a A t A t t a c a c C A T C c A A	22
26__11	G a A T a t t a c a c c a t C C A A	1
26__12	G a A T a t t a c a c c a T C c A A	2
26__13	G a A T a t t a c a c c A t C C A A	3
26__14	G a A T a t t a c a c c A T C c A A	3
26__15	G a A T a t t a c a c C A t c C A A	1
26__16	G A a t a t t a c a c c A t C C A A	0
26__17	G A a t a t t a c a c c A T C c A A	1
26__18	G A a t a t t a c a c C A T C c A A	8
26__19	G A a t A t t a c a c C A T C c A A	22
26__20	G A a T a t t a c a c c a t c C A A	1
26__21	G A a T a t t a c a c c a T C c A A	1
26__22	G A a T a t t a c a c c A t c C A A	4
26__23	G A a T a t t a c a c c A T C c A A	5
26__24	G A a T a t t a c a c C a t c C A A	9
26__25	G A a T a t t a c a c C A t c c A A	2
26__26	G A A t a t t a c a c c a t C C A A	3
26__27	G A A t a t t a c a c c a T C c A A	3
26__28	G A A t a t t a c a c C A t C c A A	5

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
26__29	G A A T a t t a c a c c a t c C A A	0
26__30	G A A T a t t a c a c c A t c C A A	0
26__31	G A A T a t t a c a c C a T C c A A	2 4
27__1	A A T A t t a c a c c a T C C A	0
28__1	A g a a T a t t a c a c c a t C C A	1
28__2	A g a a T a t t a c a c c a T c C A	6
28__3	A g a a T a t t a c a c c A t C C A	1
28__4	A g a a T a t t a c a c c A T c C A	5
28__5	A g a A t a t t a c a c c a t C C A	5
28__6	A g a A t a t t a c a c c a T C C A	6
28__7	A g a A t A t t a c a c c a T c C A	3
28__8	A g a A t A t t a c a c C a t c C A	4
28__9	A g a A T a t t a c a c c a t c C A	2
28__10	A g a A T a t t a c a c c A t c C A	0
28__11	A g A a t a t t a c a c c a T C C A	8
28__12	A g A a t a t t a c a c c A t C C A	1
28__13	A g A a t a t t a c a c C A t c C A	1
28__14	A g A a t A t t a c a c C a t c C A	3
28__15	A g A a t A t t a c a c C a t C C A	6
28__16	A g A a T a t t a c a c c a t c C A	3
28__17	A g A a T a t t a c a c c a t C C A	1
28__18	A g A a T a t t a c a c c A t c C A	3
28__19	A g A a T a t t a c a c c A t C C A	0
28__20	A g A a T a t t a c a c C a t c C A	6
28__21	A g A a T a t t a c a C c a t c C A	3
28__22	A g A a T A t t a c a c C a t c C A	5
28__23	A g A A t a t t a c a c c a t C C A	0
28__24	A g A A T a t t a c a c c a t c C A	2
28__25	A g A A T a t t a c a c c A t c C A	3
28__26	A G a a T a t t a c a c c a t c C A	2
28__27	A G a a T a t t a c a c c A t c C A	1
28__28	A G a A t a t t a c a c c a t C C A	1
28__29	A G a A T a t t a c a c c a t c C A	0
28__30	A G a A T a t t a c a c c A t c C A	1
28__31	A G A a t a t t a c a c c A t c C A	1
28__32	A G A a T a t t a c a c c a t c C A	1
28__33	A G A a T a t t a c a c c A t c C A	5
29__1	C a g a a T a t t a c a c c a T c C A	1
29__2	C a g a A t a t t a c a c c a t C C A	4
29__3	C a g a A t a t t a c a C c a t c C A	1 5
29__4	C a g a A T a t t a c a c c a t c C A	6
29__5	C a g a A T a t t a c a c c A t c C A	1 2
29__6	C a g a A T a t t a c a c C a t c C A	3
29__7	C a g A a T a t t a c a c c a t c C A	2
29__8	C a g A a T a t t a c a c c A t c C A	9
29__9	C a g A A T a t t a c a c c a t c C A	0
29__10	C a G a a T a t t a c a c c a t c C A	0
29__11	C a G a a T a t t a c a c c A t c C A	7
29__12	C a G A a t a t t a c a c c A t c C A	4
29__13	C A g A a t a t t a c a c c A t c C A	0
29__14	C A g A a t a t t a c A c c A t c C A	2
30__1	G a a t a t t a c a c C A t C C A	2 0
30__2	G a a t A t t a c a c c a T C C A	2
30__3	G a a T a t t a c a c c a t C C A	1
30__4	G a a T a t t a c a c c A t C C A	1

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

CMP 番号	化合物	対照の%MAPT mRNA
30__5	GaAtattacacccatCCA	0
30__6	GaAtattacacccaTCCA	1
30__7	GaAtattacacCAtCCA	4
30__8	GaAtattacaCCatCCA	2
30__9	GaAtAttacacCATCCA	20
30__10	GaATattacacccatCCA	1
30__11	GaATattacacccaTCCA	4
30__12	GAatattacacccaTCCA	1
30__13	GAatattacacccaTCCA	1
30__14	GAatAttacacccatCCA	2
30__15	GAatAttacacCCatCCA	3
30__16	GAaTattacacccatCCA	5
30__17	GAaTattacacccaTCCA	0
30__18	GAaTattacacccaTCCA	5
30__19	GAaTattacacccaTCCA	3
30__20	GAaTattacacCAtCCA	2
30__21	GAaTattacaCCatCCA	2
30__22	GAAtattacacccatCCA	4
30__23	GAAtattacacCCatCCA	2
30__24	GAATattacacccatCCA	1
30__25	GAATattacacccaTCCA	3
31__1	TcAgaaTattacacccatCCA	10
31__2	TcAgaaTattacacccaTCCA	3
31__3	TcAgaaTattacacccaTCCA	7
32__1	AgaaTattacacccaTCC	1
32__2	AgaaTattacacccaTCC	1
32__3	AgaaTAttacacCCatCC	0
32__4	AgaaTattacacccaTCC	5
32__5	AgaaTattacACCAtCC	39
32__6	AgaaTAttacacCCatCC	7
32__7	AgaaTattacacccaTCC	1
32__8	AgaaTattacacccaTCC	0
32__9	AgaaTattacacccaTCC	1
32__10	AgAatattacacccaTCC	1
32__11	AgAatattacacccaTCC	5
32__12	AgAatattacacCCAAtCC	5
32__13	AgAatattacacCCAAtCC	15
32__14	AgAatattacACCAAtCC	3
32__15	AgAatattacACCAAtCC	0
32__16	AgAatattacACCAAtCC	18
32__17	AgAaTattacacccaTCC	4
32__18	AgAaTattacacccaTCC	3
32__19	AgAaTattacacccaTCC	3
32__20	AgAaTattacacCCatCC	10
32__21	AgAaTattacacCCAAtCC	18
32__22	AgAAatattacacccaTCC	5
32__23	AgAAatattacacCCAAtCC	6
32__24	AgAAatattacacCCAAtCC	34
32__25	AgAAatattacacccaTCC	1
32__26	AgAAatattacacccaTCC	1
32__27	AgAAatattacacccaTCC	2
32__28	AgAAatattacacccaTCC	2
32__29	AgAAatattacacCCAAtCC	13
32__30	AGaaTattacacccaTCC	5
32__31	AGaaTattacacccaTCC	0

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
32_32	AGaaTattacaccAtCC	4
32_33	AGaaTattacaccATCC	1
32_34	AGaAtattacaccatCC	2
32_35	AGaAtattacaccatCC	1
32_36	AGaAtattacacCatCC	4
32_37	AGaAtattacAccATCC	11
32_38	AGaATattacaccatCC	0
32_39	AGaATattacaccAtCC	0
32_40	AGAAatattacaccatCC	4
32_41	AGAAatattacaccAtCC	0
32_42	AGAAatattacAccatCC	2
32_43	AGAAatattacAccAtCC	10
32_44	AGAAatattacAccatCC	12
32_45	AGAAatAttacaccatCC	3
32_46	AGAAATattacaccatCC	1
32_47	AGAAATattacaccAtCC	1
32_48	AGAAATattacaccatCC	0
32_49	AGAAAtattacaccatCC	0
32_50	AGAAAtattacacCatCC	0
32_51	AGAAAtattacAccatCC	5
33_1	CagaaTattacaccatCC	7
33_2	CagaaTattacaccatCC	55
33_3	CagaaTattacacCatCC	19
33_4	CagaaTattacAccatCC	8
33_5	CagaaTattacAccatCC	20
33_6	CagaaTattacaccatCC	1
33_7	CagaaTattacaccatCC	2
33_8	CagaaTattacaccAtCC	3
33_9	CagAAatattacaccatCC	1
33_10	CagAAatAttacaccatCC	10
33_11	CagAAATattacaccatCC	0
33_12	CagAAAtattacaccatCC	11
33_13	CagAAAtattacacCatCC	4
33_14	CagAAATattacacCatCC	3
33_15	CaGaatAttacacCatCC	5
33_16	CaGaaTattacaccAtCC	1
33_17	CaGaaTattacaccatCC	1
33_18	CaGaaTattacaccatCC	14
33_19	CaGaaTattacacCatCC	6
33_20	CaGaaTattacAccAtCC	53
33_21	CaGAAatattacaccAtCC	0
33_22	CAGaaTattacaccatCC	0
33_23	CAGaaTattacaccAtCC	1
33_24	CAGaAtattacaccatCC	3
33_25	CAGaAtattacaccatCC	61
33_26	CAGaAtAttacacCatCC	5
33_27	CAGAAatattacaccatCC	8
33_28	CAGAAatattacaccAtCC	0
33_29	CAGAAATattacaccatCC	0
33_30	CAGAAATattacaccAtCC	1
33_31	CAGAAAtattacaccatCC	13
33_32	CAGAAAtattacAccatCC	1
33_33	CAGAAAtattacaccatCC	10
34_1	GAATattacaccATCC	0
35_1	TCagaaTattacaccatCC	10

10

20

30

40

50

【表 6 - 10】

CMP 番号	化合物	対照の%MAPT mRNA
35__2	TCagaaAtattacacCATCC	11
35__3	TCagaaAtattacacCATCC	9
36__1	AGAAAtattacacCATC	0
37__1	CAGAAAtattacacCAT	0
38__1	CAatttctcattttcaacCTTC	14
39__1	TCaatttctcattttcaacCTT	35
40__1	ATCaatttctcattttcaacCT	17
41__1	AATCaatttctcattttcaACC	28
42__1	AAATCaatttctcattttCAAC	38
43__1	CAAATcaatttctcattTCAA	22
44__1	TCAaatcaatttctcatTTCA	0
45__1	CTCAaatcaatttctcatTTC	6
46__1	ACTCaaatcaatttctcATTT	5
47__1	AACTCaaatcaatttctCATT	37
48__1	TAACTcaaatcaatttctTCAT	20
49__1	TtaactCaaatcaatttctTCA	46
49__2	TtaactCAaatcaatttctCA	35
49__3	TtaactCAaatcaatttctTCA	9
49__4	TtaactCaaatcaatttctCA	33
49__5	TtaactCAaatcaatttctCA	6
49__6	TtaactcaaatcaatttctCA	63
49__7	TtaactcaaatcaatttCTCA	18
49__8	TtaactcaaatcaattTCTCA	19
49__9	TtaactcaaatcaaTtctCA	80
49__10	TtaactcaaatcaaTtctTCA	26
49__11	TtaactcaaatcaaTtctCA	30
49__12	TtaactcaaatcaaTtCTCA	18
49__13	TtaactcaaatcaaTTCtCA	32
49__14	TtaactcaaatcAattctTCA	22
49__15	TtaactcAaatcaattctTCA	20
49__16	TtaactcAaatcaattctCA	28
49__17	TtaactcAaatcaattCTCA	7
49__18	TtaactcAaatcaattTctCA	19
49__19	TtaactcAaatcaattTCTCA	9
49__20	TtaactcAaatcaaTtctCA	33
49__21	TtaactcAaatcaaTtctTCA	13
49__22	TtaactcAaatcaaTtCTCA	16
49__23	TtaactcAaatcaaTtCTCA	12
49__24	TtaactcAaatcaaTTCtCA	19
49__25	TtaactCaaatcaattctCA	33
49__26	TtaactCaaatcaattctTCA	14
49__27	TtaactCaaatcaattctCA	17
49__28	TtaactCaaatcaattCTCA	7
49__29	TtaactCaaatcaattTCTCA	7
49__30	TtaactCAaatcaattctCA	7
49__32	TtaactCAaatcaattctCA	10
49__33	TtaactCAaatcaaTtctCA	10
49__34	TtaactCAaatcaaTtCTCA	6
49__35	TtaactCaaatcaattctCA	10
49__36	TtaactCaaatcaattctCA	7
49__37	TtaactCaaatcaattctCA	4
49__39	TtaactcaaatcaattTCTCA	24
49__40	TtaactcaaatcaaTtCTCA	26
49__41	TtaactcaaatcaaTtCTCA	17
49__42	TtaactcAaatcaattctCA	33

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
49_43	T t a A c t c A a a t c a a t T C t C A	1 1
49_44	T t a A c t c A a a t c a a T t c T C A	1 5
49_45	T t a A c t c A a a t c a a T t C t C A	2 4
49_46	T t a A c t C a a a t c a a t t C t C A	2 0
49_47	T t a A c t C a a a t c a a t t C T C A	6
49_48	T t a A c t C a a a t c a a t T C t C A	6
49_49	T t a A c t C A a a t c a a t t c t C A	1 8
49_50	T t a A c t C A a a t c a a t t C t C A	9
49_53	T t a A c t C A a a t c a a T t c t C A	1 2
49_54	T t a A c t C A a a t c a a T t C t C A	6
49_55	T t a A c T C a a a t c a a t t C t C A	7
49_56	T t a A C t c a a a t c a a t t C t C A	3 0
49_57	T t a A C t c a a a t c a a t t C T C A	7
49_58	T t a A C t c a a a t c a a T T C t C A	1 1
49_59	T t a A C t c a a a t c a a T t c t C A	4 7
49_60	T t a A C t c a a a t c a a T t C t C A	1 8
49_61	T t a A C t c a a a t c a a T t C T C A	9
49_62	T t a A C t c a a a t c a a T T C t C A	1 7
49_63	T t a A C t c a a a t c A a t t c t C A	4 0
49_64	T t a A C t c A a a t c a a t t c t C A	2 3
49_65	T t a A C t c A a a t c a a t t C t C A	1 3
49_67	T t a A C t c A a a t c a a t T C t C A	4
49_68	T t a A C t c A a a t c a a T t c t C A	1 9
49_69	T t a A C t c A a a t c a a T t C t C A	1 2
49_70	T t a A C t c A a a t c a a T t C T C A	9
49_71	T t a A C t c A a a t c a a T T C t C A	1 6
49_72	T t a A C t C a a a t c a a t t c t C A	1 2
49_73	T t a A C t C a a a t c a a t t C t C A	9
49_74	T t a A C t C a a a t c a a t t C T C A	4
49_75	T t a A C t C a a a t c a a t T C t C A	4
49_76	T t a A C t C A a a t c a a t t c t C A	3
49_78	T t a A C t C A a a t c a a T t c t C A	3
49_79	T t a A C T C a a a t c a a t t C t C A	6
49_80	T t A a c t c a a a t c a a T t C t C A	1 1
49_81	T t A a c t c a a a t c a A t t C t C A	3 5
49_82	T t A a c t c a a a t c a A t T C t C A	1 8
49_83	T t A a c t c a a a t c a A T t C t C A	2 1
49_84	T t A a c t c a a a t c a A T T C t C A	3 6
49_85	T t A a c t c A a a t c a a t T C t C A	7
49_86	T t A a c t c A a a t c a a T t C t C A	6
49_87	T t A a c t C a a a t c a a t t C t C A	1 9
49_88	T t A a c t C a a a t c a a t t C T C A	7
49_89	T t A a c t C a a a t c a a T T C t C A	6
49_90	T t A a c t C A a a t c a a t t C t C A	9
49_92	T t A a c t C A a a t c a a T t C t C A	3
49_93	T t A a c t C A a a t c a a T T C t C A	1 1
49_94	T t A a C t c a a a t c a a t t C t C A	3 4
49_95	T t A a C t c a a a t c a a T T C t C A	1 1
49_96	T t A a C t c a a a t c a a T t c t C A	5 6
49_97	T t A a C t c a a a t c a a T t C t C A	1 5
49_98	T t A a C t c a a a t c a a T t C T C A	1 4
49_99	T t A a C t c a a a t c a a T T C t C A	3 0
49_100	T t A a C t c a a a t c A a t t c t C A	4 6
49_101	T t A a C t c A a a t c a a t t c t C A	2 4
49_102	T t A a C t c A a a t c a a t t C t C A	2 2

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

CMP番号	化合物	対照の%MAPT mRNA
49__103	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	8
49__104	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	6
49__105	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	28
49__106	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	31
49__107	TtAaCtC Aa a t c a a T t C T C A	29
49__108	TtAaCtC Aa a t c a a T T C t C A	38
49__109	TtAaCtC Aa a t c a a t t t c t C A	21
49__110	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	19
49__111	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	9
49__112	TtAaCtC Aa a t c a a t t t c t C A	10
49__113	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	10
49__114	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	6
49__115	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	6
49__116	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	9
49__117	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	11
49__118	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	3
49__119	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	11
49__120	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	33
49__121	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	2
49__123	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	1
49__125	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	6
49__126	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C T C A	5
49__127	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	9
49__128	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	33
49__129	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	12
49__130	TtAaCtC Aa a t c a a T T C t C A	19
49__131	TtAaCtC Aa a t c A a t t t c t C A	25
49__132	TtAaCtC Aa a t c a a t t t c t C A	15
49__133	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	6
49__134	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	10
49__135	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	15
49__136	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	22
49__137	TtAaCtC Aa a t c a a T T C t C A	33
49__138	TtAaCtC Aa a t c a a t t t c t C A	8
49__139	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	6
49__141	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	11
49__143	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	3
49__144	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	14
49__145	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	6
49__146	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	6
49__147	TtAaCtC Aa a t c a a T T C t C A	9
49__148	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	6
49__149	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	2
49__150	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	26
49__151	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C T C A	8
49__152	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	11
49__153	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	41
49__154	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	14
49__155	TtAaCtC Aa a t c A a t t t c t C A	38
49__156	TtAaCtC Aa a t c a a t t t c t C A	23
49__157	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C t C A	13
49__158	TtAaCtC Aa a t c a a t t t C T C A	4
49__159	TtAaCtC Aa a t c a a t T C t C A	6
49__160	TtAaCtC Aa a t c a a T t c t C A	20
49__161	TtAaCtC Aa a t c a a T t C t C A	12

10

20

30

40

50

【表 6 - 13】

CMP 番号	化合物	対照の % M A P T m R N A
49__162	T T a a C t C a a a t c a a t t c t C A	18
49__163	T T a a C t C a a a t c a a t t C t C A	10
49__164	T T a a C t C A a a t c a a t t c t C A	7
49__166	T T a A c t c a a a t c a a T t C t C A	17
49__167	T T a A c t C a a a t c a a t t C t C A	7
49__168	T T a A c t C A a a t c a a t t C t C A	3
49__169	T T a A C t c a a a t c a a T t C t C A	12
49__170	T T a A C t c A a a t c a a T T C t C A	9
49__171	T T a A C t c A a a t c a a T t C t C A	25
49__172	T T A a c t c a a a t c a a T t C t C A	16
49__173	T T A a c t c a a a t c a A t t C t C A	27
49__174	T T A a c t c a a a t c a A T T C t C A	14
49__175	T T A a c t c A a a t c a a T T C t C A	5
49__176	T T A a c t c A a a t c a a T t C t C A	6
49__177	T T A a c t C a a a t c a a t t C t C A	15
49__178	T T A a c t C a a a t c a a t t C T C A	4
49__180	T T A a c t C A a a t c a a t t C t C A	6
49__181	T T A a C t c a a a t c a a t t C t C A	23
49__182	T T A a C t c a a a t c a a T t c t C A	38
49__183	T T A a C t c a a a t c a a T t C t C A	17
49__184	T T A a C t c a a a t c A a t t c t C A	40
49__185	T T A a C t c A a a t c a a t t c t C A	19
49__186	T T A a C t c A a a t c a a t t C t C A	13
49__187	T T A a C t c A a a t c a a T t c t C A	13
49__188	T T A a C t C a a a t c a a t t c t C A	18
49__189	T T A A c t c a a a t c a a t t C T C A	3
49__190	T T A A c t c a a a t c a a T T C t C A	9
49__191	T T A A c t c A a a t c a a T T C t C A	3
49__192	T T A A c t C a a a t c a a t t C t C A	6
50__1	T T T A a c t c a a a t c a a T T C T C	1
51__1	T T T A a c t c a a a t c a a T T C T	10
52__1	C C T T t t a a t t c a T T A G	72
53__1	C A A C a c c t t t t a a t t c A T T A	0
54__1	A A C A c c t t t t a a t t c A T T	27
55__1	C A t c a a c a c c t t t t a a T T C A	100
56__1	C T C A t c a a c a c c t t t t a a T T	15
57__1	A C t c a t c a a c a c c t t t T A A T	37
58__1	A A C t c a t c a a c a c c t t T T A A	16
59__1	T A A C t c a t c a a c a c c t t t T A	18
60__1	T T A A c t c a t c a a c a c c t T T T	12
61__1	T T A a c t c a t c a a c a c C T T T	4
62__1	T T A a c t c a t c a a c a C C T T	3
63__1	T T A A c t c a t c a a c A C C T	0
64__1	G T T A a c t c a t c a a c A C C	29
65__1	G T T A a c t c a t c a a C A C	78

【0417】

実施例 3

選択されたオリゴヌクレオチドの IC50 値

実施例 2 からのいくつかの最良性能のオリゴヌクレオチドの IC50 を、96 ウェルアッセイを用いて初代神経細胞中においてインビトロで決定した。

【0418】

初代神経細胞培養物を、「材料及び方法」セクションに記載されている通りに調製し、ポリ-D-リジンで被覆した 96 ウェルプレート上に 50,000 細胞/ウェルで播種し、B27、GlutaMAX、及びペニシリン-ストレプトマイシンを含有する Neur

o b a s a l 培地中で維持した。A S O を水 (I C 5 0 決定用) で希釈し、播種から 1 日後 (D I V 0 1) に細胞へ加えた。I C 5 0 決定のために、ニューロンを $0.5 \sim 5 \mu\text{M}$ の最高濃度で処理し、約 1 : 4 の濃度反応希釈を使用して I C 5 0 を決定した。国際公開第 W O 2 0 1 6 / 1 2 6 9 9 5 号の A S O - 0 0 1 9 3 3 に対応する C M P 番号 6 6 _ 1 を、陽性対照として含めた。A S O 処理後、ニューロンを 3 7 で 5 日間インキュベートして、m R N A の定常状態低減を達成した。培地を除去し、細胞を以下の通りに溶解した。溶解物メッセンジャー R N A の測定は、Q U A N T I G E N E (登録商標) 2 . 0 試薬システム (A F F Y M E T R I X (登録商標)) を用いて行った。これは、特異的に設計された R N A 捕捉プローブセットに依存する分岐 D N A - シグナル増幅方法を用いて R N A を定量する。作動細胞溶解緩衝液を、 $50 \mu\text{L}$ のプロテイナーゼ K を予め加温した溶解混合物 5 mL に加えて作製し、 dH_2O で 1 : 4 の最終希釈に希釈した。作動溶解緩衝液をプレート ($150 \mu\text{L}$ / ウェル) に加え、粉碎して混合し、密封し、 55 で 3 0 分間インキュベートした。溶解後、ウェルを -80 で保存するか、又は直ちにアッセイした。

【0419】

溶解物を、使用した特異的捕捉プローブ (T a u 又はチューブリン) に応じて、溶解混合物中で希釈した。次いで、合計 $80 \mu\text{L}$ / ウェルを捕捉プレート (捕捉プローブで被覆された 9 6 ウェルのポリスチレンプレート) に加えた。 $12.1 \mu\text{L}$ のヌクレアーゼフリー水、 $6.6 \mu\text{L}$ の溶解混合物、 $1 \mu\text{L}$ のブロッキング試薬、ヒト M A P T (カタログ番号 1 5 4 8 6) 及びマウス 3 チューブリン (カタログ番号 S B - 1 7 2 4 5) のいずれかの $0.3 \mu\text{L}$ の特異的 2 . 0 プローブセットを、製造者の指示 (Q U A N T I G E N E (登録商標) 2 . 0 A F F Y M E T R I X (登録商標)) に従って合わせることによって、作動プローブセット試薬を生成した。次いで、 $20 \mu\text{L}$ の作動プローブセット試薬を、捕捉プレート上の $80 \mu\text{L}$ の溶解物希釈液 (又はバックグラウンド試料用の溶解混合物 $80 \mu\text{L}$) に加えた。プレートを遠心分離し、次いで 1 6 ~ 2 0 時間 55 でインキュベートして、ハイブリダイズした (標的 R N A 捕捉)。標的 R N A のシグナル増幅及び検出を、未結合材料を除去するために、緩衝液で 3 回プレートを洗浄することによって開始した。2 . 0 プレ増幅ハイブリダイゼーション試薬 ($100 \mu\text{L}$ / ウェル) を加え、 55 で 1 時間インキュベートし、次いで吸引し、洗浄緩衝液を加え、3 回吸引した。次いで、2 . 0 増幅ハイブリダイゼーション試薬を記載の通りに加え ($100 \mu\text{L}$ / ウェル)、 55 で 1 時間インキュベートし、前述の通りに洗浄を繰り返した。次に、2 . 0 ラベル・プローブ・ハイブリダイゼーション試薬を加え ($100 \mu\text{L}$ / ウェル)、 50 で 1 時間インキュベートし、前述の通りに洗浄を繰り返した。最後に、プレートを遠心分離して過剰な洗浄緩衝液を全て除去し、2 . 0 基質 ($100 \mu\text{L}$ / ウェル) を加えた。プレートを室温で 5 分間インキュベートし、プレートをルミノメータモードの P e r k i n E l m e r E n v i s i o n マルチラベルリーダ上で 1 5 分以内に画像化した。

【0420】

データ決定：目的の遺伝子について、平均アッセイ・バックグラウンド・シグナルを、各技術的反復の平均シグナルから差し引いた。バックグラウンドで差し引かれた目的遺伝子の平均シグナルを、ハウスキーピングチューブリン R N A のバックグラウンドで差し引かれた平均シグナルで割る。処理試料に対する阻害パーセントを、未処理試料に対して計算した (すなわち、値が低いほど阻害は増大する)。未処理試料のバックグラウンドの可変性は、バックグラウンドと等しい又はバックグラウンドより高い処理試料のパーセント阻害をもたらし得る。これらの場合、パーセント阻害は、対照の 1 0 0 % 阻害として表される (すなわち、阻害なし)。結果を表 7 に示す。

【0421】

10

20

30

40

【表 7】

抗MAPT化合物のIC50

CMP番号	化合物	領域	IC50 (nM)
9__103	CTTTaattttaatcacTCAT	A	12.2
11__1	CTTTaattttaatcaCTCA	A	9.4
34__1	GAATatttacaccATCC	A	32.0
37__1	CAGAAattattacaCCAT	A	15.6
49__189	TTAActcaaatcaattCTC A	B	11.8
56__1	CTCAtcaacacaccttttaaT T	C	44.0
62__1	TTAActcatctcaacaCCTT	C	40.5
63__1	TTAActcatctcaaacACCT	C	37.1
66__1	AtTTCcaaatctcactTTtA C	—	44.3

10

【0422】

実施例 4

インビボ忍容性及びインビボTau mRNA低減

実施例 2 からの最良性能のオリゴヌクレオチドのいくつかを、ヒト化Tauマウスにおいてインビボで試験して、CNSにおける急性忍容性と、単回注射の3日後又は28日後のMAPT mRNA低減とを評価した。

20

【0423】

トランスジェニックTauマウスに、100 µgのASOを脳室内(ICV)注射(材料及び方法、トランスジェニックTauマウスのセクションを参照)によって投与した。国際公開第WO2016/126995号のASO-001933に対応するCMP番号66__1を、陽性対照として含めた。ASOのICV単回注射から1時間、動物の行動学的副作用を観察した。副作用の重篤度に対する急性忍容性は、0(副作用なし)~20(安楽死につながる痙攣)のスケールでスコア化した。忍容性スケールを5つの神経行動学的カテゴリに分けた:(1)運動亢進、(2)活動性及び覚醒の低下、(3)運動機能障害/運動失調、(4)異常な姿勢及び呼吸、並びに(5)振戦/痙攣。各カテゴリを0~4のスケールでスコア化し、最低総スコアは20であった。ホームケージ中での動物を行動の変化について観察し、その後、握力及び正向反射の測定を含むより詳細な観察のため、ホームケージから取り出した。本発明のASOの急性忍容性からのデータを表8に示す。

30

【0424】

右前頭皮質領域におけるMAPT mRNA低減を、以下の通りにqPCRによって分析した。収集したマウス脳組織(材料及び方法セクション、トランスジェニックTauマウスを参照)を、Qiagen Tissue Lyzer IIを用いて、ホスファターゼ阻害剤カクテルセット2及び3、1 mM PMSF(Sigma、ミズーリ州セントルイス)、並びに完全プロテアーゼ阻害剤カクテルEDTAフリー(Roche、インディアナ州インディアナポリス)を補充した10倍体積の高塩濃度/ショ糖緩衝液(10 mM トリス-HCl、pH 7.4、800 mM NaCl、10%ショ糖(w/v)、1 mM EGTA)中で均質化した。ホモジネートを20,000 × gで20分間4にて遠心分離した。上清を100,000 × gで1時間4にて遠心分離した。

40

【0425】

cDNA合成及びその後のPCRのために、脳組織上清からの300 ngのRNAを、1ウェルの96ウェルプレート(Axygen、PCR-96-C-S)に加えた。各ウェルに、7.5 µLのマスタミックス(2.5 mM NTP混合物5 µL及び反応当たり2.5 µLのランダムプライマ)を加え、プレートを1000 rpmで遠心分離し、サーモサイクラ中に3分間70で放置した。プレートを直ちに氷上で冷却し、4 µLの反応マスタミックスを加えた。PCRの前に、プレートを簡単に遠心分離して、ウェルの底に試料を収集した。cDNA合成を42で60分間、95で10分間行い、その後4

50

で保持した。cDNA試料を分子生物学グレードの水で1:3に希釈し、更に使用するまで-20℃で保存した。

【0426】

PCRについては、各試料を2つのプローブセットで3回実施した(MAPT: Taqman Expression Assay Hs00902193__m1; GAPDH GAPDH Taqman Expression Assay Hs01922876__u1)。各反応物に、予め希釈した4μLのcDNA及び6μLのマスタミックスを加え、プレートを遠心分離した。試料を95℃で20秒間インキュベートした後、95℃で1秒間及び60℃で20秒間の40サイクルでインキュベートした。

【0427】

データはCt法を用いて分析した。ここで、各試料は最初にGAPDHに標準化し、次いで未処理対照のパーセントとして表した(パーセント阻害)。パーセント阻害が対照細胞と同等又はそれ以上である場合、パーセント阻害は0阻害として表した。

【0428】

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

h T a u マウスにおける急性忍容性並びに [1 > インビボ < 1] での処置 3 日後及び 4 週間後の M A P T m R N A 低減

CMP 番号	化合物	領域	急性忍容性	生理食塩水の % M A P T m R N A	
				3 日目	4 週間
9_103	CTTTaattttaat cactCAT	A	0.5	16	16
11_1	CTTTaattttaat cactCA	A	0.0	16	18
9_104	CTTTaattttaat caCtCAT	A	0.25	NA	28
9_102	CTTtAATttaat cactcAT	A	1.75	NA	20
34_1	GAATattacacc ATCC	A	0.0	36	20
9_91	CTtTAattttaat caCtCAT	A	0.50	NA	84
9_83	CTtAATttaat cactCAT	A	0.75	NA	31
9_17	CtttaAATttaat cactCAT	A	0.50	NA	65
9_88	CTtTAattttaat cactCAT	A	0.50	NA	43
9_96	CTTtaAATttaat cactcAT	A	2.50	NA	54
9_95	CTtTAATttaat cactcAT	A	4.13	NA	34
9_93	CTtTAAttttaat cactcAT	A	1.88	NA	52
9_87	CTtTAATttaat cactcAT	A	1.63	NA	46
9_55	CtTTAAttttaat cactcAT	A	2.50	NA	54
37_1	CAGAatattaca CCAT	A	0.0	27	NA
49_189	TTAActcaaatc aatCTCA	B	0.0	29	29
49_38	TtaaCTCAaatc aaTtctCA	B	1.50	NA	18
49_179	TTAActCaaatc aatTCtCA	B	1.0	NA	32
49_51	TtaActCAaatc aatCTCA	B	1.25	NA	31
49_124	TtAAActCAaatc aaTtCtCA	B	1.50	NA	48
49_165	TtaaCtCAaatc aaTtctCA	B	0.88	NA	44
49_91	TtAactCAaatc aatTCtCA	B	0.63	NA	60
49_52	TtaActCAaatc aatTCtCA	B	2.88	NA	56
49_140	TtAACTCaaatc aatCTCA	B	0.25	NA	43
49_66	TtaACTcAaatc aatCTCA	B	0.0	NA	36

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

4 9 _ 1 4 2	T t A A C t C A a a t c a a t t C t C A	B	0 . 5	N A	3 6
4 9 _ 1 2 2	T t A A c t C A a a t c a a t t C t C A	B	0 . 7 5	N A	5 6
4 9 _ 7 7	T t a A C t C A a a t c a a t t C t C A	B	1 . 1 3	N A	5 5
5 0 _ 1	T T T A a c t c a a a t c a a t T C T C	B	N A	2 6	N A
5 3 _ 1	C A A C a c c t t t t a a t t c A T T A	C	N A	2 1	N A
5 6 _ 1	C T C A t c a a c a c c t t t t a a T T	C	0 . 2	2 5	N A
6 2 _ 1	T T A a c t c a t c a a c a C C T T	C	0 . 0	3 9	2 8
6 3 _ 1	T T A A c t c a t c a a c A C C T	C	0 . 5	1 3	N A
6 6 _ 1	A t T T C c a a a t t c a c t T T t A C	—	0 . 8 3	3 7	4 4

N A = 評価せず

【 0 4 2 9 】

実施例 5

ヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cell : h E S C) 由来ニューロンにおけるインビトロ有効性

実施例 2 から選択した A S O を、ヒト胚性幹細胞 (h E S C) 由来ニューロンを用いた代替的インビトロアッセイにおいて、3つの異なる濃度 (200 nM、8 nM、及び 0 . 32 nM) で試験した。比較目的のために、M A P T を標的とする2つの先行技術のオリゴヌクレオチド、すなわち、国際公開第 W O 2 0 1 6 / 1 2 6 9 9 5 号の A S O - 0 0 1 9 3 3 に対応する C M P 番号 6 6 _ 1 及び同第 W O 2 0 1 8 / 0 6 4 5 9 3 号の化合物第 8 1 4 9 0 7 号に対応する C M P 番号 6 7 : 1 が含まれた。

【 0 4 3 0 】

ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell : E S C) の培養及び A S O 処理 :

神経幹細胞 (neural stem cell : N S C) を、公開された手順 (Chambersら (2009 年) 「Nat. Biotech.」第 7 巻第 275 ~ 280 頁) に従ってヒト E S C から誘導した。神経幹細胞 (N S C) を、S F A 培地中において 1 週間で腹側化前駆細胞に増殖し、次いで、6 週間で B G A A 培地中においてニューロンに分化した。培地含量については材料及び方法のセクションを参照されたい。

【 0 4 3 1 】

細胞を、10,000 細胞 / c m ² の密度で、ポリオルニチン及びラミニンで被覆したフラスコ内の N 2 B 2 7 + S F A 培地中に播種した。4 日目に培地を交換した。7 日後、N 2 B 2 7 + S F A 培地中で細胞をトリプシン処理し、N 2 B 2 7 + B G A A 培地中で腹側化前駆細胞として、50,000 細胞 / ウェルの密度で 96 ウェルプレート中に播種した。

【 0 4 3 2 】

培地を週 2 回交換し、最初の培地交換時に A S O による処置を開始し、6 週間続けた。次いで、細胞を以下に記載する通りに採取した。

【 0 4 3 3 】

q P C R 分析 :

処理したニューロンを以下の通りに採取した : 培地を除去し、続いて 125 μ L の P U R E L I N K (登録商標) P r o 96 溶解緩衝液及び 125 μ L の 70 % エタノールを加えた。製造者の指示書に従って R N A を精製し、最終容積 50 μ L の水で溶出した結果、R N A 濃度は 10 ~ 20 n g / μ L であった。次いで、ワンステップ q P C R 反応の前

10

20

30

40

50

に、RNAを水で10倍に希釈した。

【0434】

ワンステップqPCR反応では、qPCRミックス(QantaBio製qScript™MXLE 1-step RT-qPCR TOUGHMIX(登録商標)Low ROX)を2つのTaqmanプローブと10:1:1の比率で混合して(qPCRミックス:プローブ1:プローブ2)、マスタミックスを生成した。qPCRを技術的反復として実施し、TaqmanプローブをLife Technologiesから入手した:MAPT_Hs00902193_m1;GAPDH 4325792(標準化に使用したハウスキーピング遺伝子)。

【0435】

次いで、マスタミックス(6μL)及びRNA(4μL、1~2ng/μL)を、qPCRプレート(MICROAMP(登録商標)光学384ウェル、カタログ番号4309849)中で混合した。プレートに播種後、プレートを室温で1分間1000g急速に回転し、Via(商標)7システム(Applied Biosystems、Thermo)に移した。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、その後1.6 /秒の減温、続いて60 で45秒間。QuantStudio(商標)リアルタイムPCRソフトウェアを使用してデータを分析した。ASO処理試料のパーセント阻害を、対照処理試料と比較して産出した(低い値はMAPTの高い減少を示す)。結果は表9に2回の技術的反復の平均として示す。

【0436】

hESCニューロンにおけるTauタンパク質及びpTauタンパク質の測定
PBSで洗浄した細胞を、Cytobuster Protein Extraction Reagent(メルクミリポア、第71009号)、1%のPhosphatase Inhibitor Cocktail 3(Sigma、第P0044号)、1%のProteases Inhibitor Set III(Calbiochem、第539134号)、1%のDNase-I(Roche、第4536282001号)、及び10mM MgCl₂を含む緩衝液中に抽出した。細胞抽出物を上下にピペティングして溶解し、その後、使用するまで-20 で保存した。

【0437】

細胞抽出物中の総Tauレベルは、Tau特異的抗体5A6(DSHB抗体レジストリ番号:AB_528487)及びRocheインハウスTauモノクローナル抗体Tau 4/2を含むインハウス・アッセイ・フォーマットを用いて、AlphaLISAにより測定した。後者の抗体は、マウスをヒト全長Tau、すなわち最長ヒト脳アイソフォームであるアミノ酸441個で免疫化することによって作製した。Tau 4/2は、アミノ酸369と441の間に位置するTauのC末端エピトープに結合する。簡単に述べれば、細胞抽出物をAlphaLISA HiBlockアッセイ緩衝液(PerkinElmer、AL004C)中に希釈し、ビオチン化5A6及びTau 4/2-被覆AlphaLISA受容体ビーズと混合した。室温で1時間インキュベートした後、ストレプトアビジン被覆ドナービーズを混合物に加える。30分間インキュベートした後、試料をEnvisionプレートリーダー(励起680nm、蛍光615nm)で測定した。組換えヒトTau(メルクミリポア、第AG960号)を用いて標準曲線を作成した。

【0438】

細胞抽出物中のリン酸化Tau(Tau-pS422)レベルを、Tau特異的抗体5A6(DSHB抗体レジストリID:AB_528487)及びTau-pS422特異的抗体5.6.11(国際公開第WO2010/142423号、及びCollinら(2014年)「Brain」第137巻第2834~2846頁に記載)を含むRocheインハウス・アッセイ・フォーマットを用いてAlphaLISAにより測定した。細胞抽出物をアッセイ前にアッセイ緩衝液B中へ希釈する。緩衝液Bは、25mM HEPES pH7.4、0.5%Triton X-100、0.1%Top Block(LuBio Science)、1mg/mLデキストラン500、10%E LISAプロ

10

20

30

40

50

ッキング試薬 (Roche) を含む。以下の通りに調製した ERK リン酸化 Tau を用いて標準曲線を調製した：組換えヒト Tau を、Grueninger ら (「Neurobiology of Disease」第 37 巻 (2010 年) 第 294 ~ 306 頁) に記載されている通りに作製した。組換え His 標識 ERK 2 (自主制作) は、活性化 MEK K1 (自主制作) とのインキュベーションにより活性化された。次いで、活性化 ERK 2 を、2 mM ATP を含有する緩衝液中で 1 : 50 のモル比で Tau とインキュベートした。続いて、ERK 2 を Ni-NTA アガロース (Qiagen) 上を通して除去した。その後、S422 でのリン酸化の程度を質量分析により決定した。

【0439】

結果を表 9 に示す。

【0440】

10

20

30

40

50

【表 9】

3つの異なる濃度で処理後のhESC由来ニューロンにおけるMAPT低減及びTauタンパク質低減

CMP番号	対照のMAPT%			対照の総Tauタンパク質%			対照のリン酸化Tauタンパク質%		
	200	8	0.32	200	8	0.32	200	8	0.32
ASO濃度 (nM)									
9__104	5.4	36.6	100.9	7.0	40.3	88.3	0.6	12.0	54.0
9__103	1.2	15.6	71.8	1.8	23.2	66.2	0.1	19.8	92.9
11__1	1.0	12.5	72.3	1.5	25.9	65.1	0.1	17.5	70.4
49__38	5.7	36.3	83.5	6.8	45.5	79.6	1.3	51.6	116.6
49__189	7.0	36.5	90.2	10.4	48.1	102.9	5.0	59.6	137.3
53__1	4.8	32.9	79.4	8.8	45.7	79.0	3.1	48.6	127.6
66__1	11.0	40.2	81.9	10.9	48.4	69.9	3.6	57.9	94.2
9__102	2.0	34.9	99.0	3.0	44.3	87.4	0.3	37.7	113.8
49__179	10.5	53.6	96.4	12.4	70.7	91.7	3.5	76.0	112.0
49__51	6.7	39.8	76.1	5.9	60.2	92.2	1.3	68.2	161.6
56__1	2.8	36.8	93.2	3.6	49.3	96.6	0.3	37.9	111.9
62__1	4.5	38.6	86.2	5.8	48.4	88.1	1.5	47.8	119.0
67__1	31.1	57.0	86.0	35.9	58.4	79.2	26.2	65.8	115.5

【0441】

実施例 6

実施例 5 の選択された化合物の IC50

実施例 5 からの有効な ASO の選択を、2つの先行技術の対照 (CMP 番号 66__1 及び CMP 番号 67__1) と共に同じ hESC 由来ニューロンアッセイで試験して、標的 mRNA 低減及び Tau タンパク質低減の IC50 を決定した。

【0442】

実験は、以下のオリゴヌクレオチド濃度を用いて実施例 5 に記載した通りに行った：1000、200、40、8、1.6、0.32、0.064、0.0128、0.002

10

20

30

40

50

56 nM。

【0443】

IC50値をGraphPad PRISMソフトウェアを用いて適合させた。結果を表10に示す。

【0444】

【表10】

MAPT及びTAUタンパク質に対するIC50及び最大効果（対照に対する%）

CMP番号	化合物	IC50 MAPT (nM)	最大効果 MAPT	IC50 TAU (nM)	最大効果 MAPT
9__103	CTTTaaatttaaat caacTCAT	2.0	0.6	1.4	1.1
49__38	TtaaCTCAaatc aatTctCA	8.2	2.6	6.1	1.6
53__1	CAACacctttta attcATTA	7.6	1.7	15.0	1.9
66__1	AtTTTCcaaatc actTTtAC	9.7	8.1	11.8	4.9
67__1	CCoGTTTttcett acceeACoCCT	17.7	22.6	43.3	23.4

10

【0445】

これらのデータから、本発明のCMP番号9__103及び49__38はより効果的であり、全てのパラメータに関して従来技術の化合物よりも良好なIC50を有するが、一方でCMP番号53__1は、先行技術の化合物よりも優れた最大ノックダウンと、CMP番号66__1と同様のIC50とを有するようである。

20

【0446】

実施例7

hTauマウスの特定の脳領域におけるインビボ活性

実施例5からのASOの選択を、単回低用量ICV投与の4週間後に、ヒト化Tauマウス（hTauマウス）の特定の脳領域においてインビボで標的を低減するそれらの能力について試験した。

【0447】

本実施例で使用したヒト化Tauマウスは、マウスTauバックグラウンド上に点突然変異P301Sを伴うヒトTau（最長ヒト脳アイソフォーム）を過剰発現するインハウスRoche hTau P301Sトランスジェニックマウス系統である。

30

【0448】

ヒト化Tauマウスに25 µgのASOを下記の通りに脳室内（ICV）注射によって投与した。国際公開第WO2016/126995号のASO-001933に対応するCMP番号66__1を比較の目的で含めた。

【0449】

インビボICVマウス評価：

動物飼育：

体重16～23グラムである雌雄混合の動物を、一定の温度（ 22 ± 2 ）及び湿度（ $55 \pm 10\%$ ）に維持したコロニー室で保持し、12時間/日照射した（0600時間点灯）。全ての動物は試験期間中、自由に食物及び水を摂取することができた。全てのマウスプロトコルは、デンマーク動物実験国内倫理委員会（Danish National Committee for Ethics in Animal Experiments）によって承認された。

40

【0450】

脳室内注射：

化合物を脳室内（ICV）注射によりマウスに投与した。雌雄混合の6～8匹のマウスを各処置群に含めた。ICV投与前にマウスの体重を測定し、イソフルラン又はプロポフォルで麻酔した（30 mg/kg）。脳室内注射は、皮膚及び頭蓋骨を通り右側脳室中へ正確な距離（3.9 mm）を貫通するように調節されたスタンドに固定された23ゲ-

50

ジ針を装着したF E Pカテーテルを有する、ハミルトン・マイクロ・シリンジを用いて行った。注射されるマウスは、片手の親指と人差し指とで首のひだを保持した。優しくではあるがしっかりとした圧力をかけ、針が頭蓋骨の正中線の右1～2mm（内側外側）と目の後ろ1～2mmとを貫通するように頭を上を押した。試験化合物又はビヒクルの5μLボラスを、予め決定した注入速度で30秒かけて注入した。還流を避けるために、マウスを更に5秒間この位置で保持した後、針から離れるように注意深く下方に引き抜いた。この処置は手術又は切開を必要としない。処置から回復するまで動物を加熱ランプ下に置いた。

【0451】

試験終了時（4週間）、脳組織（皮質、髄質／能橋、及び中脳）を、T a u m R N A 及びタンパク質の分析のためドライアイス上に採取した。

10

【0452】

組織均質化：

マウス脳組織試料を、Q i a g e n の T i s s u e L y z e r I I を用いて M a g N A P u r e L C R N A I s o l a t i o n T i s s u e L y s i s B u f f e r (R o c h e 、 イ ン デ ィ ア ナ 州 イ ン デ ィ ア ナ ポ リ ス) 中 で 均 質 化 し た 。 ホ モ ジ ネ ー ト を 完 全 に 溶 解 さ せ る た め 室 温 で 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 溶 解 後 、 ホ モ ジ ネ ー ト を 3 分 間 1 3 0 0 0 r p m で 遠 心 分 離 し 、 上 清 を 分 析 に 使 用 し た 。

【0453】

組織からのRNA精製：

R N A を 、 キ ャ ッ ト 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 を 用 い る M a g N A P u r e 9 6 i n s t r u m e n t (R o c h e 、 イ ン デ ィ ア ナ 州 イ ン デ ィ ア ナ ポ リ ス) を 用 い て 、 3 5 0 μ L の 上 清 か ら 精 製 し た 。 R N A 試 料 を 、 R N a s e フ リ ー 水 中 で 2 n g / μ L に 標 準 化 し 、 及 び 更 な る 使 用 ま で - 2 0 ° C で 保 存 し た 。 実 施 例 5 に 記 載 し た 通 り に M A P T m R N A レ ベ ル を 定 量 し た 。

20

【0454】

マウス脳組織からのT a u タンパク質測定：

予め秤量した凍結組織を、10mMトリスCl pH7.4、800mM NaCl、1mM E G T A 、 1 0 % シ ャ 糖 、 1 % の P h o s p h a t a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l 3 (S i g m a 、 第 P 0 0 4 4 号) 、 1 % の P r o t e a s e s I n h i b i t o r S e t I I I (C a l b i o c h e m 、 第 5 3 9 1 3 4 号) を 含 む 1 0 体 積 (w t / v o l) の 抽 出 緩 衝 液 で 抽 出 し た 。 P r e C e l l y s 組 織 破 壊 剤 (2 0 秒 、 6 5 0 0 r p m) を 用 い て ホ モ ジ ネ ー ト を 調 製 し た 。 次 い で 、 ホ モ ジ ネ ー ト を 1 0 ' 0 0 0 x g で 2 0 分 間 4 ° C に て 遠 心 分 離 し 、 上 清 を 分 析 の た め に 保 持 し た 。

30

【0455】

抽出物中のT a u レベルを、P e r k i n E l m e r (カ タ ロ グ 番 号 A L 2 7 1 C) に よ っ て 提 供 さ れ た 総 T a u A l p h a L I S A キ ャ ッ ト を 用 い て A l p h a L I S A に よ っ て 測 定 し た 。 こ の ア ッ セ イ に 使 用 し た 抗 体 は キ ャ ッ ト と 共 に 提 供 さ れ た B T 2 及 び T a u - 1 2 で あり、両方ともT a u の中央領域に結合する。抽出物をH i B l o c k ア ッ セ イ 緩 衝 液 中 に 希 釈 し 、 次 い で 、 各 試 料 5 μ l を ア ッ セ イ に 使 用 し た 。 ア ッ セ イ は 、 供 給 者 に よ っ て 記 載 さ れ た 通 り に 他 の 方 法 で 実 施 し た 。

40

【0456】

m R N A 及 び タ ン パ ク 質 の 定 量 の 結 果 を 表 1 1 に 示 す 。

【0457】

【表 1 1】

25 μ g の A S O の単回 I C V 投与から 4 週間後の脳の一部領域におけるインビボ有効性。M A P T m R N A を % 対照として 4 つの脳領域に示し、T a u タンパク質を % 対照として 1 つの脳領域に示す。

C M P 番号	m R N A % 対照								タンパク質 % 対照	
	皮質 A 1		皮質 A 2		髄質 - 能橋		中脳		皮質 B 2	
	平均	標準	平均	標準	平均	標準	平均 (A v g)	標準	平均	標準
9__104	74	12	77	14	68	19	65	18	73	18
9__103	80	13	80	10	66	17	64	12	69	16
11__1	58	12	62	15	54	16	48	19	63	11
49__38	63	12	67	9	55	18	49	16	76	15
49__189	75	5	70	10	54	4	55	6	84	13
53__1	80	10	93	7	81	12	81	16	101	11
66__1	94	20	98	6	101	4	99	11	112	8

【0458】

これらのデータから、25 μ g のかなり低い協議 (c o n c e r t a t i o n) でさえ、対照化合物がこの濃度で標的の減少を事実上示さない場合、本発明の化合物のほとんどの脳領域において 20 % 以上の低減が見られることが観察され得る。

【0459】

実施例 8

h T a u マウスにおけるインビボ用量反応及び時間経過

2 つの A S O (C M P 番号 9__103 及び 49__189) の用量反応性を、3 つの異なる用量 (25、50、及び 100 μ g) を用いて評価し、投与から 1 週間後及び 4 週間後に特定の脳領域で標的の低減を測定した。比較目的のために、2 つの先行技術化合物 (C M P 番号 66__1__103 及び 67__1) を、1 週間試験のいくつかの用量に含めた。

【0460】

実験は実施例 7 に記載した通りに本質的に実施した。しかしながら、T a u タンパク質は 1 週間を超える半減期を有するため、1 週間実施された用量反応試験では、T a u タンパク質は測定されなかった。結果を表 1 2 及び表 1 3 に示す。

【0461】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

25 μ g、50 μ g、若しくは100 μ gのASOでの単回ICV投与1週間後、又は100 μ gのASO単回ICV投与4週間後の脳の一部領域におけるインビボ有効性。4つの脳領域について%対照としてのMAPT mRNAを示した。

脳領域	ASO 濃度 μ g	CMP番号	9__103	49__38	66__1	67__1	9__103	49__38
		時間	1週間				4週間	
Cort ex A1	25	平均	51	69	NA	NA	NA	NA
		標準	13	8	NA	NA	NA	NA
	50	平均	52	52	68	NA	NA	NA
		標準	12	14	14	NA	NA	NA
	100	平均	33	39	60	71	36	37
		標準	10	24	12	25	17	26
Cort ex A2	25	平均	73	59	NA	NA	NA	NA
		標準	12	12	NA	NA	NA	NA
	50	平均	68	39	73	NA	NA	NA
		標準	15	7	8	NA	NA	NA
	100	平均	42	43	77	63	51	46
		標準	21	30	12	20	13	30
Midb rain	25	平均	79	43	NA	NA	NA	NA
		標準	20	4	NA	NA	NA	NA
	50	平均	50	26	68	NA	NA	NA
		標準	14	6	11	NA	NA	NA
	100	平均	51	38	78	76	60	38
		標準	29	31	21	27	28	35
Medu lla- Pons	25	平均	81	41		NA	NA	NA
		標準	21	6		NA	NA	NA
	50	平均	57	26	70	NA	NA	NA
		標準	18	5	10	NA	NA	NA
	100	平均	58	37	80	82	61	40
		標準	34	31	23	28	29	33

NA＝評価せず

【0462】

【表 1 3】

100 μ gのASOで単回ICV投与した4週間後の対照に対するTauタンパク質%のインビボ低減

脳領域	皮質B1	
CMP番号	平均	標準
9__103	56	18
49__38	43	35

【0463】

表12及び13のデータから、本発明の化合物は、特に100 μ gを投与した場合に、先行技術の化合物よりも有意に優れた性能を示すことが見て取ることができる。MAPT低減は4週間にわたって維持されることもまた見て取ることができる。更に、本発明の化合物は、化合物100 μ gの単回投与による4週間の処置後に、Tauタンパク質の有意な低減を示す。

10

20

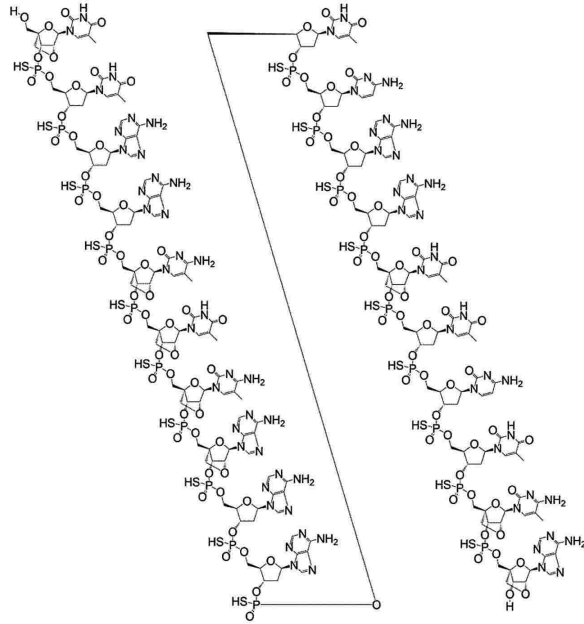
30

40

50

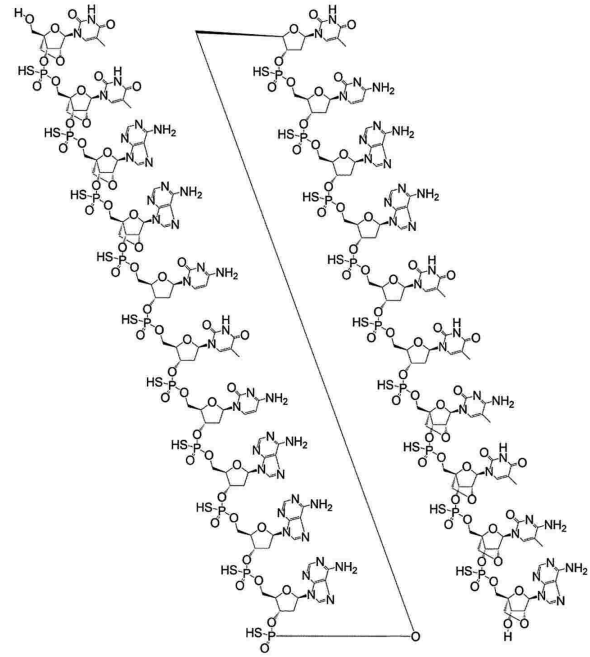
【 図 5 】

図 5
CMP 番号 4 9 _ 3 8



【 図 6 】

図 6
CMP 番号 4 9 _ 1 8 9



10

20

【 配列表 】

0007604423000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/51 (2017.01)

F I

A 6 1 K 47/51

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ピーダ ヘーイドーン

デンマーク国, 2 9 7 0 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セーノオー 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ブ

(72)発明者 アニャ ムルハート フーイ

デンマーク国, 2 9 7 0 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セーノオー 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ブ

(72)発明者 リチャード イー・オルソン

アメリカ合衆国, コネティカット 0 6 4 9 2, ウォーリングフォード

(72)発明者 マリアネ エル・イェンスン

デンマーク国, 2 9 7 0 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セーノオー 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ブ

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 9 0 6 3 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 6 4 5 9 3 (WO, A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 1 6 9 5 3 (JP, A)

Neuron, 2017年, Vol.94, No.6, pp.1056-1070

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n b a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d