

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-517742

(P2022-517742A)

(43)公表日 令和4年3月10日(2022.3.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全101頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-538378(P2021-538378)	(71)出願人	521359667		
(86)(22)出願日	令和1年12月20日(2019.12.20)		ディセルナ ファーマシューティカルズ		
(85)翻訳文提出日	令和3年8月27日(2021.8.27)		インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/067883		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州	0	
(87)国際公開番号	WO2020/139764		2 4 2 1 レキシントン ハイデン アベ		
(87)国際公開日	令和2年7月2日(2020.7.2)		ニュー 7 5		
(31)優先権主張番号	62/786,287	(74)代理人	100094569		
(32)優先日	平成30年12月28日(2018.12.28)		弁理士 田中 伸一郎		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100103610		
(31)優先権主張番号	62/787,038		弁理士 ▲吉▼田 和彦		
(32)優先日	平成30年12月31日(2018.12.31)	(74)代理人	100109070		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 須田 洋之		
(31)優先権主張番号	62/788,111	(74)代理人	100093300		
			弁理士 浅井 賢治		
		(74)代理人	100119013		
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H M G B 1 発現を阻害するための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、特に肝細胞におけるH M G B 1 発現を低減するために有用なオリゴヌクレオチド、組成物及び方法に関する。H M G B 1 発現を低減するための開示したオリゴヌクレオチドは、二本鎖又は一本鎖のいずれかであってよく、また、ヌクレアーゼに対する耐性が強く、免疫原性が低くなるように特徴を改善するために修飾してもよい。H M G B 1 発現を低減するための開示したオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝細胞などの特定の細胞又は器官を標的とするための標的化リガンドを含むように設計してもよく、また、肝線維症や関連する状態を治療するために使用してもよい。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H M G B 1 発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、15～50ヌクレオチド長のセンス鎖及び15～30ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を含み、前記センス鎖が、前記アンチセンス鎖と共に二重鎖領域を形成し、前記センス鎖が、配列番号1～13のいずれか1つに記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号14～26から選択される相補的な配列を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記センス鎖配列が、配列番号27～39のいずれか1つに記載の配列を含むか、又は前記配列から成る、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 3】

前記アンチセンス鎖配列が、配列番号14～26のいずれか1つに記載の配列から成る、請求項1又は2に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記センス鎖配列が、配列番号27に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号14に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記センス鎖配列が、配列番号28に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号15に記載の配列を含み、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記センス鎖配列が、配列番号29に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号16に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 7】

前記センス鎖配列が、配列番号30に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号17に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記センス鎖配列が、配列番号31に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号18に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記センス鎖配列が、配列番号32に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号19に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 10】

前記センス鎖配列が、配列番号33に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号20に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

前記センス鎖配列が、配列番号34に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号21に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

前記センス鎖配列が、配列番号35に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号22に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 13】

前記センス鎖配列が、配列番号36に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号23に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

前記センス鎖配列が、配列番号37に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号24に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

前記センス鎖配列が、配列番号38に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号25に記載の配列を含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

50

前記センス鎖配列が、配列番号 39 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖配列が、配列番号 26 に記載の配列を含む、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 17】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドの全ヌクレオチドが、修飾されている、請求項 17 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

前記修飾ヌクレオチドが、2' - 修飾を含む、請求項 17 又は 18 に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 20】

前記 2' 修飾が、2' - フルオロ又は 2' - O - メチルである、請求項 19 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

前記センス鎖の 1 位、2 位、4 位、6 位、7 位、12 位、14 位、16 位、18 ～ 27 位及び 31 ～ 36 位のうち 1 つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位及び 20 ～ 22 位のうち 1 つ以上が、2' - O - メチルで修飾されている、請求項 17 ～ 20 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 22】

前記センス鎖の 1 位、2 位、4 位、6 位、7 位、12 位、14 位、16 位、18 ～ 27 位及び 31 ～ 36 位の全て、及び、前記アンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位及び 20 ～ 22 位の全てが、2' - O - メチルで修飾されている、請求項 21 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 23】

前記センス鎖の 3 位、5 位、8 ～ 11 位、13 位、15 位及び 17 位のうち 1 つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位及び 19 位のうち 1 つ以上が、2' - フルオロで修飾されている、請求項 17 ～ 22 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 24】

前記センス鎖の 3 位、5 位、8 ～ 11 位、13 位、15 位及び 17 位の全て、及び、前記アンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位及び 19 位の全てが、2' - フルオロで修飾されている、請求項 23 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 25】

前記センス鎖の 1 ～ 7 位、12 ～ 27 位及び 31 ～ 36 位のうち 1 つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 ～ 13 位及び 15 ～ 22 位のうち 1 つ以上が、2' - O - メチルで修飾されている、請求項 17 ～ 20 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 26】

前記センス鎖の 1 ～ 7 位、12 ～ 27 位及び 31 ～ 36 位の全て、及び、前記アンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 ～ 13 位及び 15 ～ 22 位の全てが、2' - O - メチルで修飾されている、請求項 25 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 27】

前記センス鎖の 8 ～ 11 位のうち 1 つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位及び 14 位のうち 1 つ以上が、2' - フルオロで修飾されている、請求項 17 ～ 20、25、及び 26 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 28】

前記センス鎖の 8 ～ 11 位の全て、及び前記アンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、

50

10位及び14位の全てが、2'-フルオロで修飾されている、請求項27に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項29】

前記センス鎖の1位、2位、4～7位、9位、11位、14～16位、18～27位及び31～36位のうち1つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の1位、6位、8位、9位、11位、13位、15位、18位及び20～22位のうち1つ以上が、2'-O-メチルで修飾されている、請求項17～20のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項30】

前記センス鎖の1位、2位、4～7位、9位、11位、14～16位、18～27位及び31～36位の全て、及び、前記アンチセンス鎖の1位、6位、8位、9位、11位、13位、15位、18位及び20～22位の全てが、2'-O-メチルで修飾されている、請求項29に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項31】

前記センス鎖の3位、8位、10位、12位、13位及び17位のうち1つ以上、及び／又は、前記アンチセンス鎖の2～5位、7位、10位、12位、14位、16位、17位及び19位のうち1つ以上が、2'-フルオロで修飾されている、請求項17～20、29及び30のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項32】

前記センス鎖の3位、8位、10位、12位、13位、及び17位の全て、並びに前記アンチセンス鎖の2～5位、7位、10位、12位、14位、16位、17位、及び19位の全ては2'-フルオロで修飾されている、請求項31に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項33】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合を含む、請求項1～32のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項34】

前記少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合が、ホスホロチオエート結合である、請求項33に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項35】

前記オリゴヌクレオチドが、以下の1つ以上の位置の組み合わせの間、即ち、前記センス鎖の1位と2位との間、前記アンチセンス鎖の1位と2位との間、前記アンチセンス鎖の2位と3位との間、前記アンチセンス鎖の3位と4位との間、前記アンチセンス鎖の20位と21位との間、及び前記アンチセンス鎖の21位と22位との間にホスホロチオエート結合を有する、請求項33又は34に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項36】

前記オリゴヌクレオチドが、以下の各位置の組み合わせの間、即ち、前記センス鎖の1位と2位との間、前記アンチセンス鎖の1位と2位との間、前記アンチセンス鎖の2位と3位との間、前記アンチセンス鎖の20位と21位との間、前記アンチセンス鎖の21位と22位との間にホスホロチオエート結合を有する、請求項35に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項37】

前記アンチセンス鎖の第1位置のウリジンが、リン酸類似体を含む、請求項1～36のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

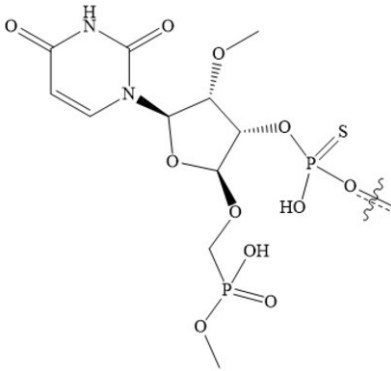
40

【請求項38】

前記オリゴヌクレオチドが、前記アンチセンス鎖の1位に以下の構造：

50

【化 1】



10

を含む、請求項 37 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 39】

前記センス鎖上の 28 ～ 30 位の - A A A - 配列のヌクレオチドのうち 1 つ以上が、一価 G a l N A c 部分と共役している、請求項 1 ～ 38 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 40】

前記センス鎖上の 28 ～ 30 位の - A A A - 配列の各ヌクレオチドが、一価 G a l N A c 部分と共役している、請求項 39 に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 41】

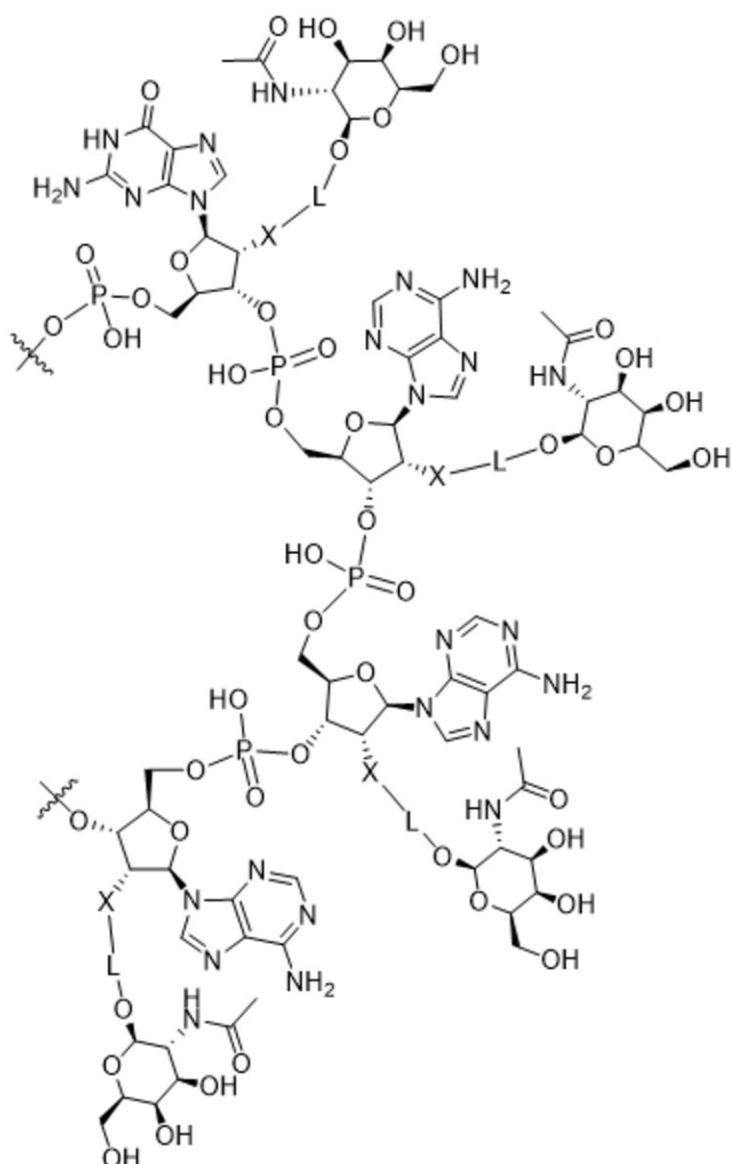
前記センス鎖上の 28 ～ 30 位の - A A A - モチーフが、以下の構造：

30

40

50

【化 2】



を含み、
式中：

Lは、数値の両端を含む1～20個でかつ連続的な共有結合した原子長の結合、クリックケミストリーハンドル、又はリンカーを表し、Lは置換及び非置換アルキレン、置換及び非置換アルケニレン、置換及び非置換アルキニレン、置換及び非置換ヘテロアルキレン、置換及び非置換ヘテロアルケニレン、置換及び非置換ヘテロアルキニレン、及びこれらの組み合わせから成る群より選択され；Xは、O、S、又はNである、請求項40に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項42】

Lが、アセタールリンカーである、請求項41に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項43】

Xが、Oである、請求項41又は42に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項44】

センス鎖上の28～30位の - AAA - 配列が、以下の構造：

10

20

30

40

50

10



30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

前記センス鎖が、19～50ヌクレオチド長である、請求項48に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項50】

前記二重鎖領域が、20ヌクレオチド長である、請求項48又は49に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項51】

センス鎖及びアンチセンス鎖を含む、H M G B 1の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、

(a) 前記センス鎖が、配列番号788に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号814に記載の配列を含む；

(b) 前記センス鎖が、配列番号789に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号815に記載の配列を含む；

(c) 前記センス鎖が、配列番号790に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号816に記載の配列を含む；

(d) 前記センス鎖が、配列番号791に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号817に記載の配列を含む；

(e) 前記センス鎖が、配列番号792に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号818に記載の配列を含む；

(f) 前記センス鎖が、配列番号793に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号819に記載の配列を含む；

(g) 前記センス鎖が、配列番号794に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号820に記載の配列を含む；

(h) 前記センス鎖が、配列番号795に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号821に記載の配列を含む；

(i) 前記センス鎖が、配列番号796に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号822に記載の配列を含む；

(j) 前記センス鎖が、配列番号797に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号823に記載の配列を含む；

(k) 前記センス鎖が、配列番号798に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号824に記載の配列を含む；

(l) 前記センス鎖が、配列番号799に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号825に記載の配列を含む；

(m) 前記センス鎖が、配列番号800に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号826に記載の配列を含む；

(n) 前記センス鎖が、配列番号801に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号827に記載の塩基配列を含む；

(o) 前記センス鎖が、配列番号802に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号828に記載の配列を含む；

(p) 前記センス鎖が、配列番号803に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号829に記載の配列を含む；

(q) 前記センス鎖が、配列番号804に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号830に記載の配列を含む；

(r) 前記センス鎖が、配列番号805に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号831に記載の配列を含む；

(s) 前記センス鎖が、配列番号806に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号832に記載の配列を含む；

(t) 前記センス鎖が、配列番号807に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号833に記載の配列を含む；

(u) 前記センス鎖が、配列番号808に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号834に記載の配列を含む；

10

20

30

40

50

(v) 前記センス鎖が、配列番号 809 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 835 に記載の配列を含む；

(w) 前記センス鎖が、配列番号 810 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 836 に記載の配列を含む；

(x) 前記センス鎖が、配列番号 811 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 837 に記載の配列を含む；

(y) 前記センス鎖が、配列番号 812 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 838 に記載の配列を含む；又は

(z) 前記センス鎖が、配列番号 813 に記載の配列を含み、前記アンチセンス鎖が、配列番号 839 に記載の配列を含むことを特徴とするオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 52】

請求項 1～51 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチド及び賦形剤を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 53】

オリゴヌクレオチドを被験体に送達する方法であって、請求項 52 に記載の組成物を被験体に投与することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 54】

前記被験体が、肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記被験体が、胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している、請求項 54 に記載の方法。

20

【請求項 56】

前記オリゴヌクレオチドを前記被験体に投与することにより H M G B 1 タンパク質の発現を低減する、請求項 53～55 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある被験体を治療する方法であって、請求項 1～51 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドを前記被験体に投与することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 58】

前記被験体が、胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している、請求項 57 に記載の方法。

30

【請求項 59】

前記被験体が、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）に罹患している、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記オリゴヌクレオチドが、前記被験体が肝毒性物質に曝される前に投与される、請求項 57～59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

前記オリゴヌクレオチドが、前記被験体が肝毒性物質に曝された後に投与される、請求項 57～59 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 62】

前記オリゴヌクレオチドが、前記被験体が肝毒性物質に曝されると同時に投与される、請求項 57～59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

前記投与により肝臓 H M G B 1 レベルが低下する、請求項 57～62 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 64】

前記投与により血清 H M G B 1 レベルが低下する、請求項 57～63 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 65】

肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある被験体を治療するための、請求項 1 ～ 51 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 66】

前記被験体が、胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している、請求項 65 に記載の使用。

【請求項 67】

前記被験体が、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に罹患している、請求項 65 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年12月28日出願の米国仮出願第62/786,287号、2018年12月31日出願の米国仮出願第62/787,038号、及び2019年1月3日出願の米国仮出願第62/788,111号の35U.S.C. § 119(e)に基づく利益を主張するものであり、それぞれは、その内容全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列リスト、表又はコンピュータプログラムの参照

20

「配列リスト」の公式なコピーは、EFS-Web経由でASCII形式のテキストファイルとして本明細書と同時に提出され、そのファイル名は「400930-014WO-ST25.txt」であり、作成日は2019年12月12日、サイズは306キロバイトである。EFS-Web経由で提出された配列リストは、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0003】

本出願は、オリゴヌクレオチド及びその使用に関し、特にその使用は線維症に關与する状態の治療に関する。

【背景技術】

【0004】

30

組織線維症は、細胞外マトリックスと炎症因子の異常な蓄積を特徴とする状態を指し、この状態は瘢痕化をもたらし、慢性的な器官損傷を促進する。肝臓では、線維症は硬変や肝細胞癌につながる可能性のある肝損傷に対する多細胞反応である。この反応は、アルコール乱用、ウイルス性肝炎、代謝疾患などの状態に伴う肝臓損傷、並びに胆汁うっ滞性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、及び非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）などの肝疾患により引き起こされることが多い。高移動度グループボックス1（HMGB1）タンパク質が肝線維症において線維症を進行させる役割を担うことを示唆する研究もある（例えば、Li L-Cら、Journal of Cellular and Molecular Medicine、2014年、第18巻（12号）：p. 2331-39参照）。HMGB1は、損傷した細胞から放出される核タンパク質であり、炎症促進媒体として機能し、肝星細胞及び肝内皮細胞を肝損傷部位に誘導することが分かっている（Seoら、American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology、2013年、第305巻：G838-848）。肝星細胞は、肝臓内の線維形成活性を促進する増殖性の筋線維芽細胞への転換を経て、肝線維症の進行に中心的な役割を担うと考えられている（Kao YHら、Transplantation Proceedings、2008年、第40巻：p. 2704-5参照）。

40

【発明の概要】

【0005】

本開示の態様は、HMGB1発現を選択的に阻害するオリゴヌクレオチドを使用して、被

50

験体の線維症（例えば、肝線維症）を治療するための組成物及び方法に関する。いくつかの実施形態では、H M G B 1 発現を選択的に阻害するために強力な R N A i オリゴヌクレオチドが開発されている。従って、いくつかの実施形態では、本明細書で提供する R N A i オリゴヌクレオチドは、特に肝細胞での H M G B 1 発現を減少させ、それにより線維症を減少又は防止するために有用である。いくつかの実施形態では、ニックドテトラループ構造を組み込んだ R N A i オリゴヌクレオチドは、肝細胞への送達を容易にするために G a l N A c 部分と共役し (conjugate)、肝線維症治療のために H M G B 1 発現を阻害する（例えば、サル又はヒト初代培養肝細胞で G a l N A c を共役した H M G B 1 オリゴヌクレオチドを評価した実施例 3 及び 4 を参照）。いくつかの実施形態では、例えば胆汁うっ滞性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) 及び非アルコール性脂肪性肝

10

炎 (N A S H) などの肝臓状態にある被験体又はその疑いのある被験体を治療するための R N A i オリゴヌクレオチドの使用を含む方法を本明細書で提供する。更なる実施形態では、本開示は、特に R N A i オリゴヌクレオチドをベースとするアプローチを利用して m R N A ノックダウンを起こし易い H M G B 1 m R N A の主要な標的配列の同定に基づいている。更に、特定の修飾パターンを有する R N A i オリゴヌクレオチドを本明細書で開発し（表 2 に概説）、インビボで H M G B 1 m R N A 発現レベルを低下させるために特に有用なものを本明細書で提供する。

20

【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 2 7 ~ 3 9 のいずれか 1 つに記載の配列を含むか、又はその配列から成る。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 4 ~ 2 6 のいずれか 1 つに記載の配列から成る。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 2 7 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 4 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態ではセンス鎖配列は配列番号 2 8 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 5 に記載の配列を含む。

30

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 2 9 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 6 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 0 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 7 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 1 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 8 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 2 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 1 9 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 3 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 0 に記載の配列を含む。

40

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 4 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 1 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 5 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 2 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 6 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 3 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 7 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 4 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 3 8 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は配列番号 2 5 に記載の配列を含む。

50

いくつかの実施形態では、センス鎖配列は配列番号 39 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖配列は、配列番号 26 に記載の配列を含む。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチドを含む。

【0007】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは全て修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは 2' - 修飾を含む。いくつかの実施形態では、2' - 修飾は 2' - フルオロ又は 2' - O - メチルである。

いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 位、2 位、4 位、6 位、7 位、12 位、14 位、16 位、18 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位のうち 1 つ以上、並びに / 又はアンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20 ~ 22 位のうち 1 つ以上は 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 位、2 位、4 位、6 位、7 位、12 位、14 位、16 位、18 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20 ~ 22 位の全ては 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、5 位、8 ~ 11 位、13 位、15 位、及び 17 位のうち 1 つ以上、並びに / 又はアンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位のうち 1 つ以上は 2' - フルオロで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、5 位、8 ~ 11 位、13 位、15 位、及び 17 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位の全ては 2' - フルオロで修飾されている。

いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 ~ 7 位、12 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位のうち 1 つ以上、並びに / 又はアンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 ~ 13 位、及び 15 ~ 22 位のうち 1 つ以上は 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 ~ 7 位、12 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 1 位、4 位、6 位、8 位、9 位、11 ~ 13 位、及び 15 ~ 22 位の全ては 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 8 ~ 11 位のうち 1 つ以上、並びに / 又は、アンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、及び 14 位のうち 1 つ以上は 2' - フルオロで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 8 ~ 11 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 2 位、3 位、5 位、7 位、10 位、及び 14 位の全ては 2' - フルオロで修飾されている。

【0008】

いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 位、2 位、4 ~ 7 位、9 位、11 位、14 ~ 16 位、18 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位のうち 1 つ以上、並びに / 又はアンチセンス鎖の 1 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20 ~ 22 位のうち 1 つ以上は 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 位、2 位、4 ~ 7 位、9 位、11 位、14 ~ 16 位、18 ~ 27 位、及び 31 ~ 36 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 1 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20 ~ 22 位の全ては 2' - O - メチルで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、8 位、10 位、12 位、13 位、及び 17 位のうち 1 つ以上、並びに / 又はアンチセンス鎖の 2 ~ 5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位のうち 1 つ以上は 2' - フルオロで修飾されている。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、8 位、10 位、12 位、13 位、及び 17 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 2 ~ 5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位の全ては 2' - フルオロで修飾されている。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間結合はホスホロチオエート結合である。

【0009】

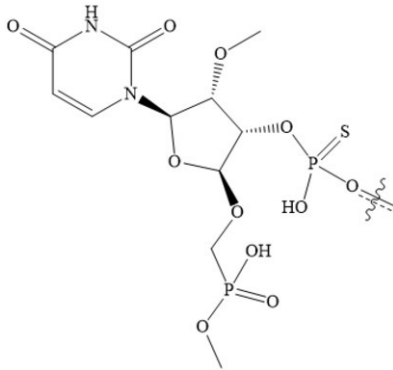
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは以下の 1 つ以上の組み合わせの間：セン

ス鎖の 1 位と 2 位との間、アンチセンス鎖の 1 位と 2 位との間、アンチセンス鎖の 2 位と 3 位との間、アンチセンス鎖の 3 位と 4 位との間、アンチセンス鎖の 20 位と 21 位との間、及びアンチセンス鎖の 21 位と 22 位との間にホスホロチオエート結合を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは以下の各組み合わせの間：センス鎖の 1 位と 2 位との間、アンチセンス鎖の 1 位と 2 位との間、アンチセンス鎖の 2 位と 3 位との間、アンチセンス鎖の 20 位と 21 位との間、アンチセンス鎖の 21 位と 22 位との間にホスホロチオエート結合を有する。

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の第 1 位置のウリジンはリン酸類似体を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはアンチセンス鎖の 1 位に以下の構造を含む：

10

【化 1】



20

【0010】

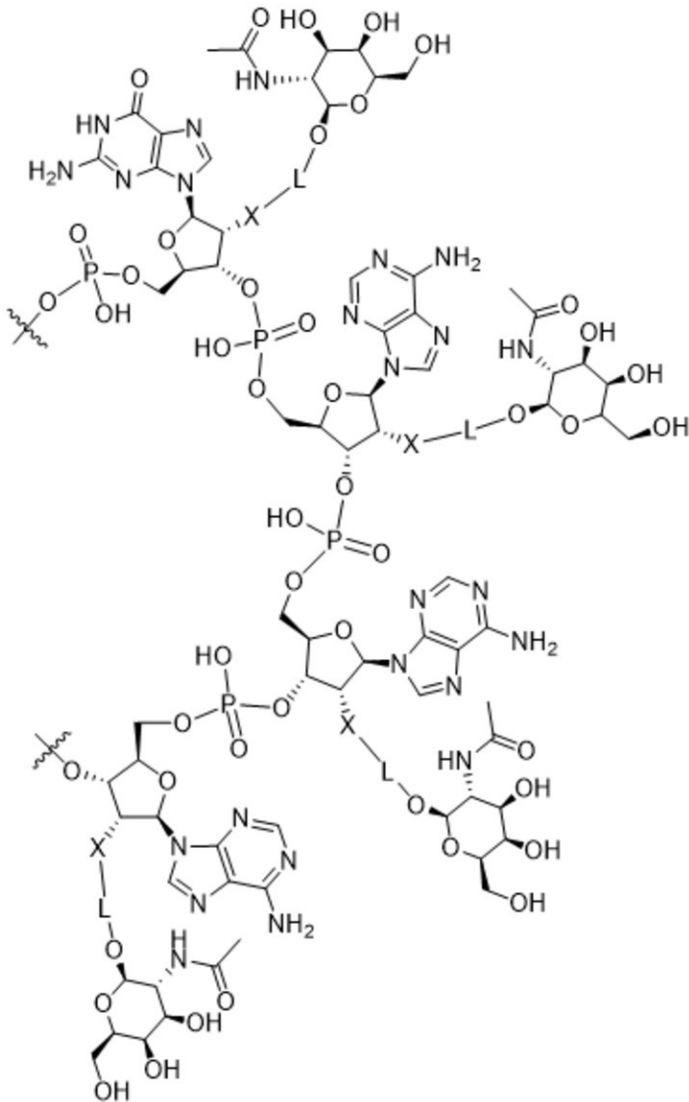
いくつかの実施形態では、センス鎖上にある 28～30 位の - A A A - 配列のヌクレオチドのうち 1 つ以上は一価 G a l N A c 部分と共役している。いくつかの実施形態では、センス鎖上にある 28～30 位の - A A A - 配列の各ヌクレオチドは一価 G a l N A c 部分と共役している。いくつかの実施形態では、センス鎖上にある 28～30 位の - A A A - モチーフは以下の構造を含む：

30

40

50

【化 2】



式中：

Lは、両端の数字を含む(inclusive)1～20個で連続的な共有結合原子長の結合、クリックケミストリーハンドル、又はリンカーを表し、Lは置換及び非置換アルキレン、置換及び非置換アルケニレン、置換及び非置換アルキニレン、置換及び非置換ヘテロアルキレン、置換及び非置換ヘテロアルケニレン、置換及び非置換ヘテロアルキニレン、及びこれらの組み合わせから成る群より選択される；XはO、S、又はNである。

【0011】

いくつかの実施形態では、Lはアセタールリンカーである。いくつかの実施形態では、XはOである。

いくつかの実施形態では、センス鎖上にある28～30位の - AAA - 配列は以下の構造を含む：

10

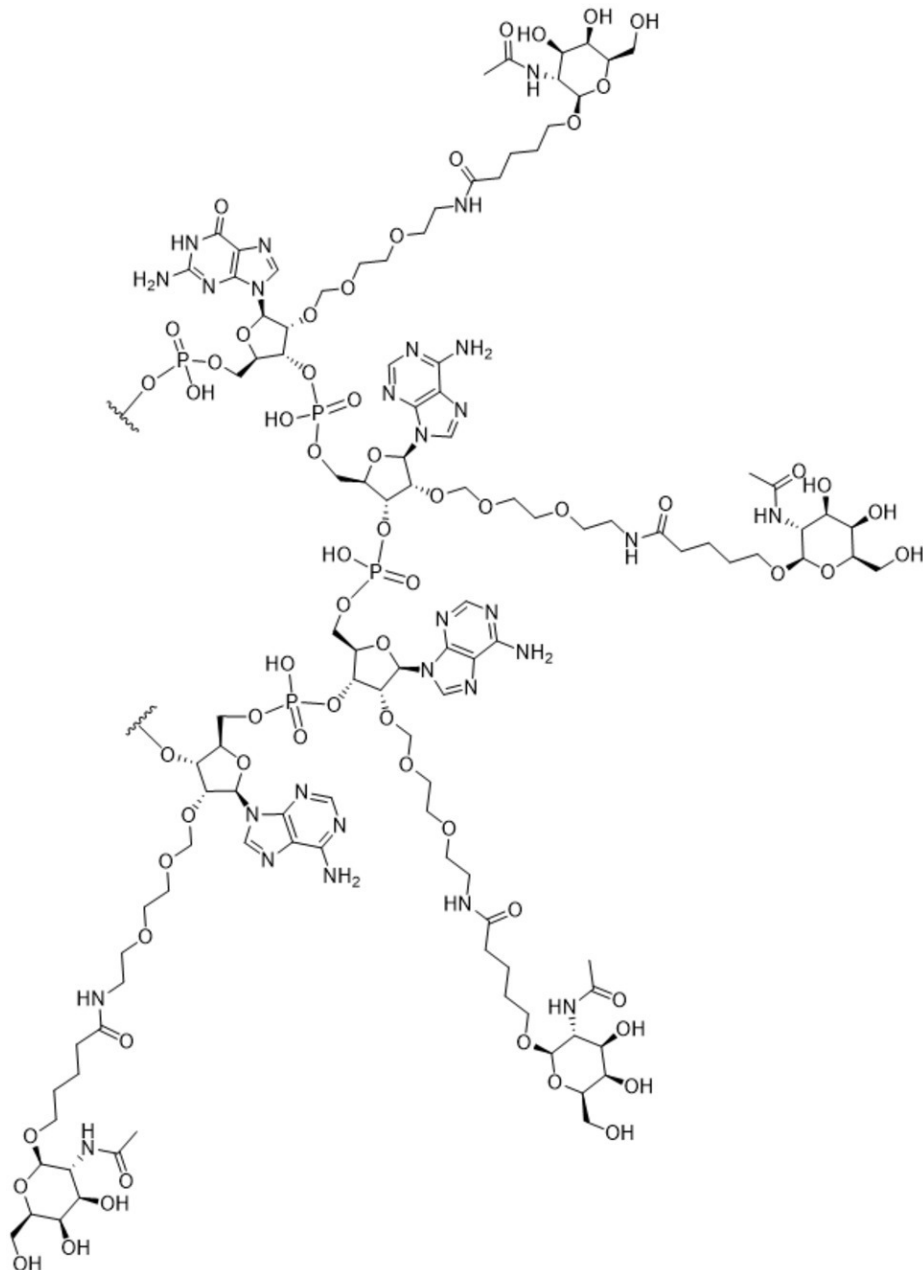
20

30

40

50

【化 3】



10

20

30

【0012】

本開示の他の態様は、HMGB1の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドを提供する。該オリゴヌクレオチドは15～30ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を含み、該アンチセンス鎖は配列番号1～13のいずれか1つに記載の配列の少なくとも15個の連続したヌクレオチドに相補的なHMGB1に相補的である領域を有する。

40

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は19～27ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は22ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは15～50ヌクレオチド長のセンス鎖を更に含み、センス鎖はアンチセンス鎖と共に二重鎖領域を形成する。いくつかの実施形態では、センス鎖は19～50ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は20ヌクレオチド長である。

【0013】

いくつかの実施形態では、HMGB1の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドはセンス鎖及びアンチセンス鎖を含み：

(a) センス鎖は配列番号788に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号814

50

に記載の配列を含む；

(b) センス鎖は配列番号 7 8 9 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 1 5 に記載の配列を含む；

(c) センス鎖は配列番号 7 9 0 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 1 6 に記載の配列を含む；

(d) センス鎖は配列番号 7 9 1 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 1 7 に記載の配列を含む；

(e) センス鎖は配列番号 7 9 2 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 1 8 に記載の配列を含む；

(f) センス鎖は配列番号 7 9 3 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 1 9 に記載の配列を含む； 10

(g) センス鎖は配列番号 7 9 4 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 0 に記載の配列を含む；

(h) センス鎖は配列番号 7 9 5 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 1 に記載の配列を含む；

(i) センス鎖は配列番号 7 9 6 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 2 に記載の配列を含む；

(j) センス鎖は配列番号 7 9 7 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 3 に記載の配列を含む；

(k) センス鎖は配列番号 7 9 8 に記載の配列から成り、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 4 に記載の配列から成り； 20

(l) センス鎖は配列番号 7 9 9 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 5 に記載の配列を含む；

(m) センス鎖は配列番号 8 0 0 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 6 に記載の配列を含む；

(n) センス鎖は配列番号 8 0 1 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 7 に記載の塩基配列を含む；

(o) センス鎖は配列番号 8 0 2 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 8 に記載の配列を含む；

(p) センス鎖は配列番号 8 0 3 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 2 9 に記載の配列を含む； 30

(q) センス鎖は配列番号 8 0 4 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 0 に記載の配列を含む；

(r) センス鎖は配列番号 8 0 5 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 1 に記載の配列を含む；

(s) センス鎖は配列番号 8 0 6 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 2 に記載の配列を含む；

(t) センス鎖は配列番号 8 0 7 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 3 に記載の配列を含む；

(u) センス鎖は配列番号 8 0 8 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 4 に記載の配列を含む； 40

(v) センス鎖は配列番号 8 0 9 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 5 に記載の配列を含む；

(w) センス鎖は配列番号 8 1 0 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 6 に記載の配列を含む；

(x) センス鎖は配列番号 8 1 1 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 7 に記載の配列を含む；

(y) センス鎖は配列番号 8 1 2 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 8 に記載の配列を含む；又は

(z) センス鎖は配列番号 8 1 3 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 8 3 9 50

に記載の配列を含む。

【0014】

更に、本明細書に記載のいずれかのオリゴヌクレオチド及び賦形剤含む組成物を、本明細書で提供する。

更に、オリゴヌクレオチドを被験体に送達する方法を本明細書で提供し、当該方法には、本明細書に記載のいずれかのオリゴヌクレオチドを含む組成物を被験体に投与することが含まれる。

いくつかの実施形態では、被験体は肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある。

いくつかの実施形態では、被験体は胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドを被験体に投与することによりHMG B 1タンパク質の発現を低減する。

更に本明細書では、肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある被験体を治療する方法を提供し、当該方法には、本明細書に記載のいずれかのオリゴヌクレオチドを被験体に投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、被験体は胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している。いくつかの実施形態では、被験体は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に罹患している。いくつかの実施形態では、被験体が肝毒性物質に曝される前にオリゴヌクレオチドを投与する。いくつかの実施形態では、被験体が肝毒性物質に曝された後にオリゴヌクレオチドを投与する。いくつかの実施形態では、被験体が肝毒性物質に曝されると同時にオリゴヌクレオチドを投与する。いくつかの実施形態では、その投与により、肝臓HMG B 1レベルが低下する。いくつかの実施形態では、その投与により、血清HMG B 1レベルが低下する。

本明細書では更に、肝線維症に罹患しているか、又はそのリスクがある被験体を治療するための、本明細書に記載のいずれかのオリゴヌクレオチドの使用を提供する。いくつかの実施形態では、被験体は、胆汁うっ滞性又は自己免疫性肝疾患に罹患している。いくつかの実施形態では、被験体は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に罹患している。

以下の添付図面は本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成し、特定の実施形態を説明し、書面による説明と合わせて、本明細書に開示した組成物及び方法の特定の態様の非限定的な例を提供する役割を担う。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】3つの異なる修飾パターン（図1B）を有する3種のGalNAc共役HMG B 1オリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。NM__002128.5の位置番号をx軸とした。

【図1B】3つの異なる修飾パターンである。

【図2】3つの異なる濃度の3種のGalNAc共役HMG B 1オリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。NM__002128.5の位置番号をx軸とした。

【図3】3種のGalNAc共役HMG B 1オリゴヌクレオチドの4つの異なる時点におけるインビボ活性評価を示す。NM__002128.5の位置番号をx軸とした。

【図4A】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通(triple commons)HMG B 1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

【図4B】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通HMG B 1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

【図4C】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通HMG B 1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

10

20

30

40

50

【図4D】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通HMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

【図4E】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通HMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

【図4F】Hu h - 7（ヒト肝臓）細胞における288個の3種共通HMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。各s i RNAのセンス鎖の3'末端に対応するNM__002128.5のヌクレオチド位置をx軸に示す。5'アッセイ（赤）及び3'アッセイ（青）の各々について、残留mRNAの割合を示す。

10

【図5】図4A～4Fのスクリーンで同定した22種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。22種のHMGB1オリゴヌクレオチドは、2つの異なる修飾パターン（M2及びM3、修飾パターンについては図1B参照）でGalNAc共役している。NM__002128.5の位置番号をx軸とした。

【図6】投与から21日後のリードGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。NM__002128.5の位置番号をx軸とした。

【図7】サル／ヒト初代培養肝細胞で試験したGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドを示す。矢印は、非ヒト霊長類スクリーンでも試験するためにオリゴヌクレオチドを選択したことを示す。

20

【図8A】IC50曲線で示したカニクイザル肝細胞#1における6種のGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドの活性を示す。

【図8B】IC50曲線で示したカニクイザル肝細胞#2におけるGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドの活性を示す。

【図8C】IC50曲線で示したヒト肝細胞#1におけるGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドの活性を示す。

【図8D】IC50曲線で示したサル及びヒト肝細胞における陽性対照GalNAc共役LDHAオリゴヌクレオチドの活性を示す。

【図9A】非ヒト霊長類におけるGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。4mg/kgの1回投与。

30

【図9B】非ヒト霊長類におけるGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドのインビボ活性評価を示す。1回投与量は2mg/kgで、投与は4回繰り返す。

【図10A】マウス細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。5'アッセイである。

【図10B】マウス細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。3'アッセイである。

【図10C】サル細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。5'アッセイである。

40

【図10D】サル細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。3'アッセイである。

【図10E】ヒト細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。5'アッセイである。

【図10F】ヒト細胞株における、3つの異なる濃度（0.03nM、0.1nM、及び1nM）での6種のHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチドのスクリーニングを示す。

50

3' アッセイである。

【図11A】 mock に正規化した HMGB1 の IC50 曲線による、Hu h - 7 細胞における4種の Ga l N A c 共役 HMGB1 オリゴヌクレオチドの活性をしめす。

【図11B】 mock に正規化した HMGB2 の IC50 曲線による、Hu h - 7 細胞における4種の Ga l N A c 共役 HMGB1 オリゴヌクレオチドの活性を示す。

【図11C】 mock に正規化した HMGB3 の IC50 曲線による、Hu h - 7 細胞における4種の Ga l N A c 共役 HMGB1 オリゴヌクレオチドの活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

いくつかの態様によれば、本開示は、肝線維症の治療のために、細胞、特に肝臓の細胞（例えば肝細胞）における HMGB1 発現の低減に有効な、HMGB1 mRNA を標的とするオリゴヌクレオチドを提供する。従って、関連する態様では、本開示は、肝臓における HMGB1 遺伝子発現を選択的に低減することを含む線維症治療方法を提供する。特定の実施形態では、本明細書で提供する HMGB1 を標的とするオリゴヌクレオチドは、標的組織の選択した細胞（例えば、肝臓の肝細胞）に送達して、その組織の線維症を治療するように設計する。インビボで HMGB1 mRNA をノックダウンするために特に有用な、特定の修飾パターンを有する RNA i オリゴヌクレオチドを本明細書において開示している（表2に概説）。

定義した用語の説明を含む、本開示の更なる態様を以下に提供する。

【0017】

I. 定義

およそ：本明細書で使用しているように、1つ以上の対象の数値に適用される用語「およそ」又は「約」は、記載した参照数値に近い数値を指す。特定の実施形態では、用語「およそ」又は「約」は、特段の記載がない限り、又は文脈から特段に明白でない限り、記載した参照数値のいずれかの方向（参照値を超える値又は下回る値）に25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下に収まる数値の範囲を指す（ただし、そのような数値が、有り得る数値の100%を超える場合を除く）。

投与：本明細書で使用しているように、用語「投与する」又は「投与」は、（例えば、被験体の状態を治療するために）薬理的に有用な方法で、被験体に物質（例えば、オリゴヌクレオチド）を提供することを意味する。

アジア糖タンパク質受容体（ASGPR）：本明細書で使用しているように、用語「アジア糖たんぱく質受容体」又は「ASGPR」は、大きい方の48kDaサブユニット（ASGPR-1）及び小さい方の40kDaサブユニット（ASGPR-2）により形成される2部構成C型レクチンを指す。ASGPRは主に肝細胞の類洞表面に発現し、末端ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン残基を含む循環糖タンパク質（アジア糖タンパク質）の結合、内部移行、及びその後のクリアランスに主要な役割を担っている。

減衰：本明細書で使用しているように、用語「減衰させる」は低減すること、又は効果的に停止することを意味する。非限定的な例として、本明細書で提供する1つ以上の治療法は、被験体における肝線維症又は肝臓の炎症の発症又は進行を低減又は効果的に停止させる可能性がある。この減衰には、例えば、肝線維症又は肝臓の炎症の1つ以上の態様（例えば、症状、組織の特徴、及び細胞、炎症又は免疫の活性等）の減少、肝線維症又は肝臓の炎症の1つ以上の態様の検出可能な進行（悪化）の消失、或いは他の方法で予想できる場合の、被験体における肝線維症又は肝臓の炎症の検出可能な態様の消失が挙げられる。

【0018】

相補的：本明細書で使用しているように、用語「相補的」は、2つのヌクレオチドが互いに塩基対を形成することを可能にする2つのヌクレオチド（例えば、2つの対向する核酸上、又は単一の核酸鎖の対向する領域上）間の構造的関係を指す。例えば、1つの核酸のプリンヌクレオチドは対向する核酸のピリミジンヌクレオチドに相補的であり、互いに水

10

20

30

40

50

素結合を形成することにより一緒に塩基対になる。いくつかの実施形態では、互いに相補的なヌクレオチドは、ワトソン-クリック様式で、又は安定二重鎖の形成を可能にする任意の他の様式で塩基対になることが可能である。いくつかの実施形態では、2つの核酸は、本明細書に記載しているように、相補性領域を形成するように互いに相補的な複数のヌクレオチドの領域を有してもよい。

デオキシリボヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「デオキシリボヌクレオチド」は、リボヌクレオチドと比較して、そのペントース糖の2'位置にヒドロキシルの代わりに水素を有するヌクレオチドを指す。修飾デオキシリボヌクレオチドとは、2'位以外の位置で原子の1つ以上の修飾又は置換を有するデオキシリボヌクレオチドであり、糖、リン酸基、もしくは塩基中に修飾もしくは置換を含むか、又は糖、リン酸基、もしくは塩基の修飾もしくは置換を含む。

二本鎖オリゴヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「二本鎖オリゴヌクレオチド」は、ほぼ二重鎖形態であるオリゴヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域（単数又は複数）の相補的塩基対は、共有結合していない核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域（単数又は複数）の相補的な塩基対は、共有結合している核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域（単数又は複数）の相補的な塩基対は、一緒に塩基対となるヌクレオチドの相補的な逆平行配列を提供するように（例えば、ヘアピンを介して）折り畳まれた単一の核酸鎖から形成される。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、互いに完全に二重化された2つの共有結合していない核酸鎖を含む。しかし、いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に二重化された、例えば一端又は両端にオーバーハングを有する2つの共有結合していない核酸鎖を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に相補的であるヌクレオチドの逆平行配列を含み、従って、内部ミスマッチ又は末端ミスマッチなどの1つ以上のミスマッチを有していてもよい。

【0019】

二重鎖：本明細書で使用しているように、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）に関して、用語「二重鎖」は、ヌクレオチドの2つの逆平行配列の相補的な塩基対合を経て形成される構造を指す。

賦形剤：本明細書で使用しているように、用語「賦形剤」は、例えば、所望の一致性又は安定化効果を提供するか、又はそれらに寄与するために組成物に含まれてもよい非治療剤を指す。

肝細胞：本明細書で使用しているように、用語「肝細胞（単数又は複数）」は、肝臓の実質組織の細胞を指す。これらの細胞は肝臓の質量のおよそ70～85%を占め、血清アルブミン、フィブリノーゲン、及び凝固因子（因子3及び4を除く）のプロトロンビン群を産生する。肝細胞系統細胞のマーカーとしては：トランスサイレチン（Ttr）、グルタミン合成酵素（Glu）、肝細胞核因子1a（Hnf1a）、及び肝細胞核因子4a（Hnf4a）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。成熟肝細胞のマーカーとしては、限定するものではないが：シトクロムP450（Cyp3a11）、フマリルアセトアセテート加水分解酵素（Fah）、グルコース6-リン酸（G6p）、アルブミン（Alb）、及びOC2-2F8（例えば、Huchら、Nature、2013年、第494巻（7436号）：p. 247-250参照）が挙げられ、肝細胞マーカーに関するこれらの内容は参照により本明細書に援用される。

肝毒性物質：本明細書で使用しているように、用語「肝毒性物質」は、それ自体が肝臓に毒性であるか、又は肝臓に毒性を持つ代謝物を形成するように処理できる化合物、ウイルス、又は他の物質である。肝毒性物質としては、四塩化炭素（CCl₄）、アセトアミノフェン（パラセタモール）、塩化ビニル、ヒ素、クロロホルム、及び非ステロイド系抗炎症剤（アスピリンやフェニルブタゾンなど）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0020】

肝臓の炎症：本明細書で使用しているように、用語「肝臓の炎症」又は「肝炎」は、特に損傷や感染の結果として肝臓が腫脹、機能障害、及び／又は疼痛を起こしている身体的状態を指し、肝毒性物質への暴露により引き起こされる場合もある。症状としては、黄疸（皮膚や目が黄色くなる）、疲労感、脱力感、吐き気、嘔吐、食欲不振、及び体重減少が挙げられる。肝臓の炎症は、治療せずに放置すると、線維症、硬変、肝不全、又は肝臓癌へと進行する恐れがある。

肝線維症：本明細書で使用しているように、用語「肝線維症」又は「肝臓の線維症」は、コラーゲン（Ⅰ、Ⅲ、及びⅤ）、フィブロネクチン、ウンジュリン（undulin）、エラスチン、ラミニン、ヒアルロナン、及びプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスタンパク質が肝臓内に過剰に蓄積することを意味し、炎症及び肝臓細胞死に起因する。肝線維症は、治療せずに放置すると、硬変、肝不全、肝臓癌へと進行する恐れがある。

10

ループ：本明細書で使用しているように、「ループ」は、適切なハイブリダイゼーション条件下（例えば、リン酸緩衝液中や、細胞内）で、不對領域に隣接する2つの逆平行領域がハイブリダイズして二重鎖（「ステム」と称する）を形成するように互いに十分に相補的な核酸の2つの逆平行領域に隣接した核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）の不對領域を指す。

【0021】

修飾ヌクレオチド間結合：本明細書で使用しているように、用語「修飾ヌクレオチド間結合」は、ホスホジエステル結合を含む基準ヌクレオチド間結合と比較して、1つ以上の化学修飾を有するヌクレオチド間結合を指す。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは天然には存在しない結合である。典型的には、修飾ヌクレオチド間結合は、修飾ヌクレオチド間結合が存在する核酸に1つ以上の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解耐性、ヌクレアーゼ耐性、溶解性、生物学的利用能、生物活性、免疫原性低下等を改善する可能性がある。

20

修飾ヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「修飾ヌクレオチド」は：アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド、アデニンデオキシリボヌクレオチド、グアニンデオキシリボヌクレオチド、シトシンデオキシリボヌクレオチド、及びチミジンデオキシリボヌクレオチドから選択される対応する基準ヌクレオチドと比較して、1つ以上の化学修飾を有するヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、天然には存在しないヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その糖、核酸塩基、及び／又はリン酸基に1つ以上の化学修飾を有する。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、対応する基準ヌクレオチドと共役した1つ以上の化学的部分を有する。典型的には、修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドが存在する核酸に1つ以上の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解耐性、ヌクレアーゼ耐性、溶解性、生物学的利用能、生物活性、免疫原性低下等を改善する可能性がある。

30

ニックドテトラループ構造：「ニックドテトラループ構造」は、別個のセンス（パッセージ）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖が存在することを特徴とするRNA iオリゴヌクレオチドの構造であって、ここでは、センス鎖はアンチセンス鎖と相補性のある領域を有し、また、鎖の少なくとも1つ、一般的にはセンス鎖は、少なくとも1つの鎖内に形成された隣接ステム領域を安定化するように構成したテトラループを有する。

40

【0022】

オリゴヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば100ヌクレオチド長未満の短い核酸を指す。オリゴヌクレオチドは一本鎖であっても二本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは二重鎖領域を有していても、有していてもよい。一連の非限定的な例として、オリゴヌクレオチドは低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ダイサー基質干渉RNA（dsiRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、短鎖siRNA

50

A、又は一本鎖 s i R N A が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは R N A i オリゴヌクレオチドである。

オーバーハング：本明細書で使用しているように、用語「オーバーハング」は、1つの鎖又は領域が二重鎖を形成する相補鎖の末端を超えて延びる1つの鎖又は領域に起因する末端非塩基対ヌクレオチド（単数又は複数）を指す。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、二本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の二重鎖領域から延びる1つ以上の非対合ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、オーバーハングは、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖又はセンス鎖上の3'又は5'オーバーハングである。

リン酸類似体：本明細書で使用しているように、用語「リン酸類似体」は、リン酸基の静電的及び／又は立体的特性を模倣する化学部分を指す。いくつかの実施形態では、リン酸類似体は、酵素除去されやすい5'-リン酸の代わりに、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドに配置される。いくつかの実施形態では、5'リン酸類似体はホスファターゼ抵抗性の結合を含む。リン酸類似体の例としては、5'メチレンホスホネート（5'-MP）及び5'-(E)-ビニルホスホネート（5'-VP）などの5'ホスホネートが挙げられる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'末端ヌクレオチドにおいて、糖の4'-炭素位置にリン酸類似体（「4'-リン酸類似体」と称する）を有する。4'-リン酸類似体の例としては、オキシメチル基の酸素原子が糖部分（例えば、その4'-炭素）に結合しているオキシメチルホスホネート又はその類似体が挙げられ（例えば、国際特許公開WO／2018／045317を参照）、リン酸類似体に関連するその内容は参照により本明細書に援用される。オリゴヌクレオチドの5'末端については、他の修飾が開発されている（例えば、WO2011／133871；米国特許第8,927,513号；及びPrakashら、Nucleic Acids Research、2015年、第43巻（6号）：p. 2993-3011、リン酸類似体に関連するそれぞれの内容は参照により本明細書に援用される）。

【0023】

発現低下：本明細書で使用しているように、遺伝子の「発現低下」という用語は、適切な基準細胞又は被験体と比較して、細胞又は被験体において、遺伝子にコードされたRNA転写物もしくはタンパク質量が減少すること、及び／又は遺伝子活性の量が減少することを指す。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、HMGB1 mRNA配列に相補的なアンチセンス鎖を有するもの）で細胞を処理することは、二本鎖オリゴヌクレオチドで処理していない細胞と比較して、（例えば、HMGB1遺伝子にコードされた）RNA転写産物、タンパク質及び／又は活性の量を減少させる可能性がある。同様に、本明細書で用いられる「発現低下」とは、遺伝子（例えば、HMGB1）の発現を低下させることを指す。

相補性の領域：本明細書で使用しているように、用語「相補性の領域」は、ヌクレオチドの逆平行配列に対して十分に相補的である核酸のヌクレオチド（例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド）の配列を指し、当該領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下で、例えばリン酸緩衝液中、細胞内等で、ヌクレオチドの2つの配列間でハイブリダイゼーションを可能にする。

リボヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「リボヌクレオチド」はその五炭糖としてリボースを有するヌクレオチドを指し、これはその2'位置にヒドロキシル基を含む。修飾リボヌクレオチドは、2'位置以外で原子の1つ以上の修飾又は置換を有するリボヌクレオチドであり、リボース、リン酸基、もしくは塩基中に修飾もしくは置換を含むか、又はリボース、リン酸基、もしくは塩基の修飾もしくは置換を含む。

R N A i オリゴヌクレオチド：本明細書で使用しているように、用語「R N A i オリゴヌクレオチド」は以下のいずれかを指す：（a）センス鎖（パッセンジャー）及びアンチセンス鎖（ガイド）を有し、該アンチセンス鎖又はその一部はアルゴノート2（Ag o 2）エンドヌクレアーゼによって標的mRNAの切断に使用される、二本鎖オリゴヌクレオチド；又は（b）単一のアンチセンス鎖を有し、該アンチセンス鎖（又はアンチセンス鎖の一部）はAg o 2エンドヌクレアーゼによって標的mRNAの切断に使用される、一本鎖

オリゴヌクレオチド。

【0024】

鎖：本明細書で使用しているように、用語「鎖」は、ヌクレオチド間結合（例えば、ホスホジエステル結合、ホスホロチオエート結合）を介して一緒に連結された複数のヌクレオチドの単一連続配列を指す。いくつかの実施形態では、鎖は2つの自由端、例えば5'末端及び3'末端を有する。

被験体：本明細書で使用しているように、用語「被験体」は、マウス、ウサギ、及びヒトなどの任意の哺乳類を意味する。いくつかの実施形態では、被験体はヒト又は非ヒト霊長類である。用語「個体」又は「患者」は「被験体」と互換的に使用してもよい。

合成：本明細書で使用しているように、用語「合成」は、人工的に合成された（例えば、機械（例えば、固体状核酸合成機）を使用）か、又はそうでなければ、分子を通常生成する天然源（例えば、細胞又は生物）に由来しない核酸又は他の分子を指す。

標的化リガンド：本明細書で使用しているように、用語「標的化リガンド」は、対象の組織又は細胞の同種分子（例えば、受容体）に選択的に結合する分子（例えば、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質）、及び他の物質を対象の組織又は細胞に標的として向ける目的で別の物質と共役できる分子を指す。例えば、いくつかの実施形態では、標的化リガンドは、オリゴヌクレオチドを対象の特異的組織又は細胞に標的として向ける目的で、オリゴヌクレオチドと共役してもよい。いくつかの実施形態では、標的化リガンドは細胞表面受容体に選択的に結合する。従って、いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドと共役すると、標的化リガンドは、細胞表面に発現した受容体への選択的結合、並びにオリゴヌクレオチド、標的化リガンド、及び受容体から成る複合体の細胞によるエンドソーム内部移行を経て、特定細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を促進する。いくつかの実施形態では、細胞内部移行後又は細胞内部移行中に切断されるリンカーを介してオリゴヌクレオチドに標的化リガンドを共役し、オリゴヌクレオチドは細胞内で標的化リガンドから放出されるようにする。

【0025】

テトラループ：本明細書で使用しているように、用語「テトラループ」は、ヌクレオチドの隣接配列のハイブリダイゼーションにより形成される隣接二重鎖の安定性を高めるループを指す。安定性の向上は、無作為に選択した複数のヌクレオチド配列から成る同等の長さのループ群から平均して予測される隣接ステム二重鎖の T_m より高い隣接ステム二重鎖の融解温度（ T_m ）の上昇として検出可能である。例えば、テトラループは、10 mMの NaHPO_4 中、少なくとも50℃、少なくとも55℃、少なくとも56℃、少なくとも58℃、少なくとも60℃、少なくとも65℃、又は少なくとも75℃の融解温度を少なくとも2塩基対長の二重鎖を含むヘアピンに対して付与できる。いくつかの実施形態では、テトラループは、スタッキング相互作用により隣接ステム二重鎖の塩基対を安定化する可能性がある。また、テトラループ内のヌクレオチド間の相互作用には、非ワトソン-クリック塩基対、スタッキング相互作用、水素結合、及び接触相互作用が挙げられるが、これらに限定されるものではない（Cheongら、Nature、1990年、第346巻（6285号）：p. 680-2；Heus及びPardi、Science、1991年、第253巻（5016号）：p. 191-4）。いくつかの実施形態では、テトラループは3～6個のヌクレオチド、典型的には4～5個のヌクレオチドを含むか、又はそれらから成る。特定の実施形態では、テトラループは3、4、5、又は6個のヌクレオチドから成り、これらは修飾されても修飾されなくてもよい（例えば、標的化部分と共役しても、しなくてもよい）。1実施形態では、テトラループは4個のヌクレオチドから成る。Cornish-Bowden、Nucleic Acids Research、1985年、第13巻：p. 3021-3030に記載されているように、どのようなヌクレオチドでもテトラループに使用してもよく、そのようなヌクレオチドに対して標準的なIUPAC-IUB記号を使用してもよい。例えば、文字「N」は、任意の塩基がその位置にあってもよいことを示すために使用してもよく、文字「R」は、A（アデニン）又はG（グアニン）がその位置にあってもよいことを示すために使用してもよく、「B」はC

10

20

30

40

50

(シトシン)、G (グアニン)、又はT (チミン) がその位置にあってもよいことを示すために使用してもよい。テトラループの例としては、UNC Gファミリーのテトラループ (例えば、UUCG)、GNRAファミリーのテトラループ (例えば、GAAA)、及びCUUGテトラループが挙げられる (Woeseら、米国科学アカデミー紀要、米国、1990年、第87巻 (21号) : p. 8467 - 71; Antaoら、Nucleic Acids Research、1991年、第19巻 (21号) : p. 5901 - 5)。DNAテトラループの例としては、d (GNNA) ファミリーのテトラループ (例えば、d (GTTA)、d (GNRA)) ファミリーのテトラループ、d (GNAB) ファミリーのテトラループ、d (CNNG) ファミリーのテトラループ、及びd (TNCG) ファミリーのテトラループ (例えば、d (TTCG)) が挙げられる。例えば、Nakanoら、Biochemistry、2002年、第41巻 (48号) : p. 14281 - 14292; Shinjiら、日本化学会講演予稿集、2000年、第78巻 (2号) : p. 731を参照されたい; これらの関連する開示内容は参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、テトラループは、ニックドテトラループ構造内に含まれる。

10

20

治療: 本明細書で使用しているように、用語「治療」は、存在する状態 (例えば、疾患、障害) に関して被験体の健康及び/又は福祉を改善する目的で、又は状態の発生可能性を予防もしくは減少させるために、例えば被験体への治療剤 (例えば、オリゴヌクレオチド) の投与を経て、それを必要とする被験体をケアする行為を指す。いくつかの実施形態では、治療には、少なくとも1つの徴候や症状の頻度又は重症度を低減すること、又は被験体が罹患した状態 (例えば、疾患、障害) の因子に寄与することが含まれる。

【0026】

II. オリゴヌクレオチドをベースとするHMGB1発現阻害剤

i. HMGB1標的配列

いくつかの実施形態では、治療上の利益を得るために使用できる、オリゴヌクレオチドをベースとするHMGB1発現阻害剤が本明細書で提供される。複数の異なる種 (ヒト、アカゲザル、及びマウス (例えば、実施例1を参照)) のmRNAを含むHMGB1 mRNAの検討、並びにインビトロ及びインビボ試験を経て、HMGB1 mRNAの特定の配列は他の配列よりもオリゴヌクレオチドベースの阻害をし易いため、標的配列として有用であることが発見された。いくつかの実施形態では、HMGB1標的配列は、配列番号1~13のいずれか1つに記載の配列を含むか、又はそれらから成る。HMGB1 mRNAのこれらの領域は、HMGB1 mRNAの発現を阻害する目的で、本明細書で延べられているようなオリゴヌクレオチドを用いて標的化してもよい。

30

従って、いくつかの実施形態では、細胞内のmRNAを標的とし、その発現を阻害する目的で、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドを、HMGB1 mRNAに相補的な領域 (例えば、HMGB1 mRNAの標的配列内) を有するように設計する。相補性の領域は一般的に、HMGB1 mRNAの発現を阻害する目的でオリゴヌクレオチド (又はその鎖) をHMGB1 mRNAにアニーリングできるようにする好適な長さ及び塩基含有量を有する。いくつかの実施形態では、相補性領域は少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、又は少なくとも20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、12~30 (例えば、12~30、12~22、15~25、17~21、18~27、19~27、又は15~30) ヌクレオチド長の範囲内にあるHMGB1相補性領域を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長のHMGB1相補性領域を有する。

40

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、配列番号1~13のいずれか1つに記載の配列に少なくとも部分的に相補的な相補性領域 (例えば、二本鎖

50

オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖上)を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、配列番号1~13のいずれか1つに記載の配列に完全に相補的な相補性領域(例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖上)を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの相補性領域(例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖上)は、12~20ヌクレオチド(例えば、12~20、12~18、12~16、12~14、14~20、14~18、14~16、16~20、16~18、又は18~20)長の範囲内である配列番号1~13のいずれか1つに記載の配列の連続したヌクレオチド配列に相補的である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの相補性領域(例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖上)は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20連続ヌクレオチド長である配列番号11~13のいずれか1つに記載の配列の連続したヌクレオチド配列に相補的である。

10

いくつかの実施形態では、配列番号:1~13のいずれか1つに記載の連続したヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の全長に及ぶ。いくつかの実施形態では、配列番号:1~13のいずれか1つに記載の配列の連続したヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の全長の一部に及ぶ。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、配列番号1~13のいずれか1つに記載の配列のヌクレオチド1~20にまたがるヌクレオチドの連続した伸長部に少なくとも部分的に(例えば、完全に)相補的な相補性領域(例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖上)を含む。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、HMGB1に相補的な領域はHMGB1 mRNAの対応する配列と比較して、1つ以上のミスマッチを有してもよい。オリゴヌクレオチド上の相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でHMGB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持していれば、最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個等のミスマッチを有してもよい。或いは、オリゴヌクレオチド上の相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でHMGB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持していれば、1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、又は5個以下のミスマッチを有してもよい。いくつかの実施形態では、相補性領域に複数のミスマッチがある場合、適切なハイブリダイゼーション条件下でオリゴヌクレオチドがHMGB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持していれば、ミスマッチは連続して(例えば、2個、3個、4個、又はそれ以上並んで)配置されていてもよいし、又は相補性領域全体に渡って間隔を置いて配置されてもよい。

30

【0029】

i i. オリゴヌクレオチドの種類

本開示の方法でHMGB1を標的にするために有用なオリゴヌクレオチドの構造には、RNAi、アンチセンス、miRNA等、様々なものがある。本明細書等に記載されている構造のいずれも、本明細書に記載の配列(例えば、配列番号1~13に示すようなHMGB1のホットスポット(hot spot)配列)を組み込む又は標的化するためのフレームワークとして使用してもよい。

40

いくつかの実施形態では、HMGB1発現を低減するためのオリゴヌクレオチドは、ダイサー関与部の上流又は下流にあるRNA干渉(RNAi)経路に関与する。例えば、RNAiオリゴヌクレオチドは、1~5ヌクレオチドの少なくとも1つの3'オーバーハングを有するサイズ19~25ヌクレオチドの各鎖を用いて開発されている(例えば、米国特許第8,372,968号参照)。より長いオリゴヌクレオチドも開発されており、これはダイサーにより処理し、活性なRNAi生成物を産生する(例えば、米国特許第8,883,996号参照)。更なる研究により、少なくとも1本の鎖の少なくとも一端が二重標的領域を超えて延長されている延長二本鎖オリゴヌクレオチドが生成され、このオリゴヌクレオチドには、鎖の1つが熱力学的安定化テトラループ構造を有する構造が含まれる(例えば、米国特許第8,513,207号及び同第8,927,705号、並びに国際

50

特許公開WO2010033225を参照。これらはそのオリゴヌクレオチドの構造及び形態の開示について参照により本明細書に援用される)。このような構造は、一本鎖(分子の片側又は両側)の延長だけでなく、二本鎖の延長も含んでもよい。

【0030】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、ダイサー関与部(例えば、ダイサー切断部)の下流でRNA干渉経路に関与するように設計している。そのようなオリゴヌクレオチドは、センス鎖の3'末端にオーバーハング(例えば、1、2、又は3ヌクレオチド長)を有していてもよい。そのようなオリゴヌクレオチド(例えば、siRNA)は、標的RNAに対するアンチセンスである21ヌクレオチドのガイド鎖、及び相補的パッセンジャー鎖を含んでもよく、ここではその両鎖がアニールして、その一方の、又は両方の3'末端で19bpの二重鎖及び2ヌクレオチドのオーバーハングを形成する。また、23ヌクレオチドのガイド鎖及び21ヌクレオチドのパッセンジャー鎖を含むオリゴヌクレオチドなど、より長いデザインのオリゴヌクレオチドも利用可能であり、分子の右側(パッセンジャー鎖の3'末端/ガイド鎖の5'末端)には平滑末端があり、分子の左側(パッセンジャー鎖の5'末端/ガイド鎖の3'末端)には2ヌクレオチドの3'ガイド鎖オーバーハングがある。このような分子では、21塩基対の二重鎖領域が存在する。例えば、米国特許第9,012,138号;第9,012,621号;及び第9,193,753号を参照されたい。これらの各特許の関連する開示内容は本明細書に援用される。

いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、共に17~26(例えば、17~26、20~25、又は21~23)ヌクレオチド長の範囲内のセンス鎖及びアンチセンス鎖を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、共に19~22ヌクレオチド長の範囲のセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖の長さは等しい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれか又は両方に3'オーバーハングが存在するような、センス鎖及びアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、共に21~23ヌクレオチド長の範囲内のセンス鎖及びアンチセンス鎖を有するオリゴヌクレオチドについて、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖とアンチセンス鎖との両方にある3'オーバーハングは1又は2ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、22ヌクレオチドのガイド鎖、及び20ヌクレオチドのパッセンジャー鎖を有し、ここでは、分子の右側(パッセンジャー鎖の3'末端/ガイド鎖の5'末端)には平滑末端があり、分子の左側(パッセンジャー鎖の5'末端/ガイド鎖の3'末端)には2ヌクレオチドの3'ガイド鎖オーバーハングがある。このような分子では、20塩基対の二重鎖領域が存在する。

【0031】

本明細書に開示された組成物及び方法を用いて使用するのための他のオリゴヌクレオチドの設計には、以下が含まれる:16量体siRNA(例えば、Nucleic Acids in Chemistry and Biology、Blackburn(編)、英国王立化学会、2006年参照)、shRNA(例えば、19bp以下のステムを含む;例えば、Mooreら、Methods in Molecular Biology、2010年、第629巻:p.141-158参照)、平滑siRNA(例えば、19bp長;例えば、Kraynack及びBaker、RNA、2006年、第12巻:p.163-176参照)、非対称siRNA(aiRNA;例えば、Sunら、Nature Biotechnology、2008年、第26巻:p.1379-1382参照)、非対称短二重鎖siRNA(例えば、Changら、Molecular Therapy、2009年、第17巻(4号):p.725-32参照)、フォークsiRNA(例えば、Hohjoh、FEBS Letters、2004年、第557巻(1-3号):p.193-198参照)、単鎖siRNA(Elsner、Nature Biotechnology、2012年、第30巻:p.1063)、ダンベル状円形siRNA(例えば、Abeら、米国化学会誌、2007年、第129巻:p.15108-15

109 参照)、及び内部にセグメント化した低分子干渉RNA (siRNA; 例えば、Bramsenら、Nucleic Acids Research、2007年、第35巻(17号): p. 5886 - 5897 参照)。前記参考文献の各々は、その中での関連開示内容について、その全体が参照により本明細書に援用される。HMGB1発現を低減又は阻害するためにいくつかの実施形態で使用可能なオリゴヌクレオチド構造の更なる非限定的例としては、マイクロRNA (miRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、及び短鎖siRNAが挙げられる(例えば、Hamiltonら、EMBO Journal、2002年、第21巻(17号): p. 4671 - 4679; 米国特許公開第20090099115号参照)。

また、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のHMGB1発現を低減するためのオリゴヌクレオチドは一本鎖である。このような構造には、一本鎖RNAi分子が挙げられるが、これに限定されるものではない。最近の取り組みでは、一本鎖のRNAi分子の活性が実証されている(例えば、Matsuiら、Molecular Therapy、2016年、第24巻(5号): p. 946 - 955 参照)。しかし、いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドはアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドであり、該核酸塩基配列は5'から3'方向に書き込まれた場合、特定の核酸の標的セグメントの逆相補体を含み、細胞内でその標的RNAのRNaseH媒介切断を誘発するように(例えばギャップマーとして)、又は細胞内で標的mRNAの翻訳を阻害するように(例えばミックスマーとして)好適に修飾されている。本開示で使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の任意の好適な方法で修飾してもよく、該方法には、例えば米国特許第9,567,587号に示すような方法が挙げられ、これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾に関する開示内容(例えば、長さ、核酸塩基(ピリミジン、プリン)の糖部分、及び核酸塩基の複素環部分の改変を含む)について参照により本明細書に援用される。更に、アンチセンス分子は特定の標的遺伝子の発現を低減するために数十年に渡って使用されてきた(例えば、Bennettら、「Pharmacology of Antisense Drugs」、Annual Review of Pharmacology and Toxicology、2017年、第57巻: p. 81 - 105 参照)。

【0032】

iii. 二本鎖オリゴヌクレオチド

HMGB1発現を(例えば、RNAi経路を介して)標的化するための二本鎖オリゴヌクレオチドは一般に、互いに二重鎖を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を有する。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖とは共有結合していない。しかし、いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖とは共有結合している。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成された二重鎖は、少なくとも15(例えば、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21)ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は15~30ヌクレオチド長(例えば、15~30、15~27、15~22、18~22、18~25、18~27、18~30、又は21~30ヌクレオチド長)の範囲にある。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二重鎖領域は20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖の間に形成される二重鎖は、センス鎖及び/又はアンチセンス鎖の全長に及ばない。いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間の二重鎖は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの全長に及ぶ。特定の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖の間の二重鎖はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方の全長に及ぶ。

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、表1に配列されて

いるように、配列番号 1～13 のいずれか 1 つに記載の配列を有するセンス鎖、及び配列番号 14～26 から選択される相補配列を含むアンチセンス鎖を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 1 に記載の配列から成り、アンチセンス鎖は配列番号 14 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 2 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 15 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 3 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 16 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 4 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 17 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 5 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 18 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 6 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 19 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 7 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 20 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号 8 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 21 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 9 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 22 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 10 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 23 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 11 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 24 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 12 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 25 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 13 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 26 に記載の配列を含む。

10

20

【0034】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、センス配列及びアンチセンス配列への修飾を含む表 2 にも配列されているように、配列番号 27～39 のいずれか 1 つに記載の配列を含むセンス鎖、及び配列番号 14～26 から選択される相補配列を含むアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 27 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 14 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 28 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 15 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 29 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 16 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 30 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 17 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 31 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 18 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 32 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 19 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 33 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 20 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 34 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 21 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 35 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 22 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 36 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 23 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 37 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 24 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 38 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 25 に記載の配列を含む。いくつかの実施形態では、センス鎖は配列番号 39 に記載の配列を含み、アンチセンス鎖は配列番号 26 に記載の配列を含む。

30

40

【0035】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド又は他の核酸の構造を記述する際に配列リストに示した配列を参照してもよいことは理解すべきである。そのような実施形態では、実際のオリゴヌクレオチド又は他の核酸は、指定した配列と基本的に同一又は類似の相補特性を保持しながら指定した配列と比較して、1 つ以上の代替ヌクレオチド（例えば、D

50

N AヌクレオチドのRNA対応ヌクレオチド又はRNAヌクレオチドのDNA対応ヌクレオチド)、及び／又は1つ以上の修飾ヌクレオチド、及び／又は1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合、及び／又は1つ以上の他の修飾を有してもよい。

いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは25ヌクレオチドのセンス鎖及び27ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含み、これらがダイサー酵素により作用されると、アンチセンス鎖が成熟したRISCに組み込まれる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖は、27ヌクレオチドより長い(例えば、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40ヌクレオチド)。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖は25ヌクレオチドより長い(例えば、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド)。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖との間に形成された二重鎖の長さは12~30ヌクレオチド(例えば、12~30、12~27、15~25、18~30、又は19~30ヌクレオチド)長であってもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖の間に形成された二重鎖の長さは、少なくとも12ヌクレオチド長(例えば、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも20、又は少なくとも25ヌクレオチド長)である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖の間に形成された二重鎖の長さは12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である。

【0036】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドの一方の5'末端は、他方の5'端と比較して熱力学的に安定性が低い。いくつかの実施形態では、センス鎖の3'末端に平滑末端、及びアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを含む非対称オリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の3'オーバーハングは1~8ヌクレオチド長(例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8ヌクレオチド長)である。典型的には、RNAi用のオリゴヌクレオチドは、アンチセンス(ガイド)鎖の3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有する。しかし、他のオーバーハングも可能である。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、1~6ヌクレオチド、任意に1~5、1~4、1~3、1~2、2~6、2~5、2~4、2~3、3~6、3~5、3~4、4~6、4~5、5~6ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、もしくは6ヌクレオチド長の3'オーバーハングである。しかし、いくつかの実施形態では、オーバーハングは、1~6ヌクレオチド、任意に1~5、1~4、1~3、1~2、2~6、2~5、2~4、2~3、3~6、3~5、3~4、4~6、4~5、5~6ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、もしくは6ヌクレオチド長の5'オーバーハングである。

【0037】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端上の2つの末端ヌクレオチドは修飾される。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端上の2つの末端ヌクレオチドは標的と相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端上の2つの末端ヌクレオチドは標的と相補的ではない。いくつかの実施形態では、ニックドテトラール構造中のオリゴヌクレオチドの各3'末端上の2つの末端ヌクレオチドはGGである。典型的には、オリゴヌクレオチドの各3'末端上の2つの末端GGヌクレオチドの一方又は両方は標的と相補的ではない。

いくつかの実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に1個以上(例えば、1個、2個、3個、4個、5個)のミスマッチが存在する。センス鎖とアンチセンス鎖との間に複数のミスマッチがある場合、ミスマッチは連続して配置されるか(例えば、一列に2個、3個又はそれ以上配置されている)、又は相補性の領域全体に散在していてもよい。いくつかの実施形態では、センス鎖の3'末端は、1つ以上のミスマッチを含む。1実施形態では、センス鎖の3'末端には2つのミスマッチが組み込まれている。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖の3'末端における塩基ミスマッチ又はセグメントの不安定化により、恐らくダイサーによる処理の促進を経て、RNAi内の合成二重

10

20

30

40

50

鎖の効力が向上した。

【0038】

a. アンチセンス鎖

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は「ガイド鎖」と称してもよい。例えば、アンチセンス鎖が、RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)と係合してアルゴノートタンパク質に結合するか、又は1つ以上の類似の因子と係合もしくは結合して標的遺伝子のサイレンシングを指示できる場合、そのアンチセンス鎖はガイド鎖と称してもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖と相補的なセンス鎖は「パッセンジャー鎖」と称してもよい。

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、最大50ヌクレオチド長(例えば、最大30、最大27、最大25、最大21、又は最大19ヌクレオチド長)であるアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチド長(例えば、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも25、又は少なくとも27ヌクレオチド長)のアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は12~50又は12~30(例えば、12~30、11~27、11~25、15~21、15~27、17~21、17~25、19~27、又は19~30)ヌクレオチド長の範囲内にある。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つのアンチセンス鎖は12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50ヌクレオチド長である。

いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは配列番号14~26のいずれか1つに記載の配列を含むアンチセンス鎖を含む。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14~26のいずれか1つに記載の配列のいずれかにおける12~20ヌクレオチド(例えば、12~20、12~18、12~16、12~14、14~20、14~18、14~16、16~20、16~18、又は18~20ヌクレオチド)長の範囲内にあるヌクレオチドの連続配列を含むアンチセンス鎖を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20連続ヌクレオチド長の配列番号14~26のいずれか1つに記載の配列におけるヌクレオチドの連続配列を含むアンチセンス鎖を含む。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14~26のいずれか1つに記載の配列から成るアンチセンス鎖を含む。

【0039】

b. センス鎖

いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは最大40ヌクレオチド長(例えば、最大40、最大35、最大30、最大27、最大25、最大21、最大19、最大17、又は最大12ヌクレオチド長)のセンス鎖を有してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチド長(例えば、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも25、少なくとも27、少なくとも30、少なくとも35、又は少なくとも38ヌクレオチド長)のセンス鎖を有してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12~50(例えば、12~40、12~36、12~32、12~28、15~40、15~36、15~32、15~28、17~21、17~25、19~27、19~30、20~40、22~40、25~40、又は32~40)ヌクレオチド長の範囲内にあるセンス鎖を有してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40ヌクレオチド長のセンス鎖を有してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖は27ヌクレオチド長を超える(例えば、28、29、30、31、32、33、34、35

、36、37、38、39、又は40ヌクレオチド）。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖は25ヌクレオチド長を超える（例えば、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は36ヌクレオチド）。いくつかの実施形態では、センス鎖は20ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、センス鎖は36ヌクレオチド長である。

いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは配列番号1～13及び27～39のいずれか1つに記載のセンス鎖配列を含む。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1～13及び27～39のいずれか1つに記載の配列の、少なくとも12（例えば、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、又は少なくとも23）連続ヌクレオチドを含むセンス鎖を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1～13及び27～39のいずれか1つに記載の配列のいずれかにおける7～36ヌクレオチド（例えば、12～30、12～27、12～22、15～25、17～21、18～27、19～27、20～36、又は15～36ヌクレオチド）長の範囲にあるヌクレオチドの連続配列を含むセンス鎖を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は36ヌクレオチド長の配列番号1～13及び27～39のいずれか1つに記載の配列のヌクレオチドの連続配列から成るセンス鎖を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号1～13及び27～39のいずれか1つに記載の配列から成るセンス鎖を有する。

10

20

【0040】

いくつかの実施形態では、センス鎖はその3'末端にステムループを含む。いくつかの実施形態では、センス鎖はその5'末端にステムループを含む。いくつかの実施形態では、ステムループを含む鎖は2～66ヌクレオチド長（例えば、2～66、10～52、14～40、2～30、4～26、8～22、12～18、10～22、14～26、又は14～30ヌクレオチド長）の範囲内にある。いくつかの実施形態では、ステムループを含む鎖は8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、ステムは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14ヌクレオチド長の二重鎖を含む。いくつかの実施形態では、ステムループは分子を分解（例えば、酵素分解）から良好に保護し、標的細胞への送達のための標的化特性を容易にする。例えば、いくつかの実施形態では、ループにより、オリゴヌクレオチドの遺伝子発現阻害活性にほぼ影響を与えることなく修飾できるヌクレオチドが追加される。特定の実施形態では、本明細書において、センス鎖が S_1-L-S_2 で表されるステムループを（例えば、その3'末端に）含むオリゴヌクレオチドを提供し：ここでは、 S_1 は S_2 に相補的であり、 L は S_1 と S_2 の間で最大10ヌクレオチド長（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド長）のループを形成する。

30

いくつかの実施形態では、ステムループのループ（ L ）はテトラループ（例えば、ニックドテトラループ構造内）である。テトラループはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及びこれらの組み合わせを含んでもよい。典型的には、テトラループは4～5個のヌクレオチドを有する。しかし、いくつかの実施形態では、テトラループは3～6個のヌクレオチドを含むか、又はそれらから成り、典型的には4～5個のヌクレオチドから成る。特定の実施形態では、テトラループは3個、4個、5個、又は6個のヌクレオチドを含むか、又はそれらから成る。

40

【0041】

i v. オリゴヌクレオチド修飾

オリゴヌクレオチドは、特異性、安定性、送達、生物学的利用能、ヌクレアーゼ分解への耐性、免疫原性、塩基対合特性、RNA分布及び細胞取り込み、並びに治療又は研究の使

50

用に関連する他の特徴を向上又は制御するために、様々な方法で修飾し得る（例えば、Bramsenら、Nucleic Acids Research、2009年、第37巻：p. 2867 - 2881；Bramsen及びKjems、Frontiers in Genetics、2012年、第3巻：p. 1 - 22参照）。従って、いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の好適な修飾を含んでもよい。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その塩基（又は核酸塩基）、糖（例えば、リボース、デオキシリボース）、又はリン酸基中に修飾を有する。

オリゴヌクレオチド上の修飾の数及びそのヌクレオチド修飾の位置は、オリゴヌクレオチドの特性に影響を与える可能性がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、脂質ナノ粒子（LNP）もしくは類似の担体と共役又は包含させることにより、インビボで送達してもよい。しかし、オリゴヌクレオチドがLNP又は類似の担体に保護されていない場合、保護されないことはヌクレオチドの少なくとも一部が修飾されることに有利である場合もある。従って、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドのいずれかの特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの全て又はほぼ全てのヌクレオチドが修飾される。特定の実施形態では、半分を超えるヌクレオチドが修飾される。特定の実施形態では、半分を下回るヌクレオチドが修飾される。典型的には、ネイキッド送達により、全ての糖が2'位置で修飾される。これらの修飾は可逆的であっても不可逆的であってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、所望の特徴（例えば、酵素分解からの保護、インビボ投与後に所望の細胞を標的とする能力、及び／又は熱力学的安定性）をもたらすに十分な数及び種類の修飾ヌクレオチドを有する。

10

20

【0042】

a. 糖修飾

いくつかの実施形態では、修飾糖（本明細書では糖類似体とも称する）は、例えば、糖の2'、3'、4'、及び／又は5'炭素位置で1つ以上の修飾が生じる修飾デオキシリボース又はリボース部分を含む。いくつかの実施形態では、修飾糖は、ロックド核酸（「LNA」）（例えば、Koshkinら、Tetrahedron、1998年、第54巻：p. 3607 - 3630参照）、非ロックド核酸（「UNA」）（例えば、Sneadら、Molecular Therapy - Nucleic Acids、2013年、第2巻、e103参照）、及び架橋核酸（「BNA」）（例えば、Imanishi及びObika、王立化学会、Chemical Communications、2002年、第16巻：p. 1653 - 1659参照）に存在するものなどの非天然代替的炭素構造も含んでよい。Koshkinら、Sneadら、及びImanishi及びObikaの文献は、糖修飾に関連するそれらの開示について参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、糖におけるヌクレオチド修飾は2' - 修飾を含む。2' - 修飾は、2' - アミノエチル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル、及び2' - デオキシ - 2' - フルオロ - β - d - アラビノ核酸であってもよい。典型的には、修飾は2' - フルオロ、2' - O - メチル、又は2' - O - メトキシメチルである。いくつかの実施形態では、糖における修飾は糖環の修飾を含み、糖環の1つ以上の炭素の修飾を含んでもよい。例えば、ヌクレオチドの糖の修飾は、糖の2' - 酸素が糖の1' - 炭素もしくは4' - 炭素に結合すること、又は2' - 酸素がエチレン又はメチレン架橋を介して1' - 炭素もしくは4' - 炭素に結合することを含んでもよい。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは2' - 炭素～3' - 炭素結合を欠く非環状の糖を有する。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは、例えば、糖の4'位にチオール基を有する。

30

40

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド（例えば、少なくとも1個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、少なくとも40個、少なくとも45個、少なくとも50個、少なくとも55個、少なくとも60個、又はそれ以上）を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖は少なくとも1個の修飾ヌクレオチド（例えば、少なくとも1個、少なくとも5

50

個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、又はそれ以上)を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は少なくとも1個の修飾ヌクレオチド(例えば、少なくとも1個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、又はそれ以上)を含む。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖の全てのヌクレオチドが修飾される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチド(即ち、センス鎖とアンチセンス鎖の両方)が修飾される。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドは2'-修飾(例えば、2'-フルオロ又は2'-O-メチル)を含む。本開示は、様々な修飾パターンを有するオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号27~39のいずれか1つに記載の配列を有するセンス鎖配列、及び配列番号14~26のいずれか1つに記載の配列を有するアンチセンス鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、これらのオリゴヌクレオチドでは、センス鎖の1位、2位、4位、6位、7位、12位、14位、16位、18~27位、及び31~36位のうち1つ以上、並びに/又はアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11位、13位、15位、18位、及び20~22位のうち1つ以上は2'-O-メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の1位、2位、4位、6位、7位、12位、14位、16位、18~27位、及び31~36位の全て、並びにアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11位、13位、15位、18位、及び20~22位の全ては、2'-O-メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の3位、5位、8~11位、13位、15位、及び17位のうち1つ以上、並びに/又はアンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、12位、14位、16位、17位、及び19位のうち1つ以上は2'-フルオロで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の3位、5位、8~11位、13位、15位、及び17位の全て、並びにアンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、12位、14位、16位、17位、及び19位の全ては2'-フルオロで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の1位、2位、4位、6位、7位、12位、14位、16位、18~27位、及び31~36位の全て、並びにアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11位、13位、15位、18位、及び20~22位の全ては2'-O-メチルで修飾され、センス鎖の3位、5位、8~11位、13位、15位、及び17位の全て、並びにアンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、12位、14位、16位、17位、及び19位の全ては2'-フルオロで修飾される。

【0044】

いくつかの実施形態では、配列番号27~39のいずれか1つに記載の配列を有するセンス鎖、及び配列番号14~26のいずれか1つに記載の配列を有するアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドでは、センス鎖の1~7位、12~27位、及び31~36位のうち1つ以上、並びに/又はアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11~13位、及び15~22位のうち1つ以上は2'-O-メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の1~7位、12~27位、及び31~36位の全て、並びにアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11~13位、及び15~22位の全ては2'-O-メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の8~11位のうち1つ以上、並びに/又は、アンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、及び14位のうち1つ以上は2'-フルオロで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の8~11位の全て、並びにアンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、及び14位の全ては2'-フルオロで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の1~7位、12~27位、及び31~36位の全て、並びにアンチセンス鎖の1位、4位、6位、8位、9位、11~13位、及び15~22位の全ては2'-O-メチルで修飾され、センス鎖の8~11位の全て、並びにアンチセンス鎖の2位、3位、5位、7位、10位、及び14位の全ては2'-フルオロで修飾される。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、配列番号 27～39 のいずれか 1 つに記載の配列を有するセンス鎖、並びに配列番号 14～26 のいずれか 1 つに記載の配列を有するアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドでは、センス鎖の 1 位、2 位、4～7 位、9 位、11 位、14～16 位、18～27 位、及び 31～36 位のうち 1 つ以上、並びに／又は、アンチセンス鎖の 1 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20～22 位のうち 1 つ以上は 2' - O - メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の 1 位、2 位、4～7 位、9 位、11 位、14～16 位、18～27 位、及び 31～36 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 1 位、6 位、8 位、9 位、11 位、13 位、15 位、18 位、及び 20～22 位の全ては 2' - O - メチルで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、8 位、10 位、12 位、13 位、及び 17 位のうち 1 つ以上、並びに／又はアンチセンス鎖の 2～5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位のうち 1 つ以上は 2' - フルオロで修飾される。いくつかの実施形態では、センス鎖の 3 位、8 位、10 位、12 位、13 位、及び 17 位の全て、並びにアンチセンス鎖の 2～5 位、7 位、10 位、12 位、14 位、16 位、17 位、及び 19 位の全ては 2' - フルオロで修飾される。

10

いくつかの実施形態では、リン酸基又は他の基を有する末端にある 3' 末端基（例えば、3' - ヒドロキシル）は、例えば、リンカー、アダプターもしくはラベルを付加するために、又はオリゴヌクレオチドを別の核酸に直接ライゲーションするために使用できる。

【0045】

20

b. 5' 末端リン酸

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの 5' 末端リン酸基は、アルゴノート 2 との相互作用を促進する。しかし、5' - リン酸基を含むオリゴヌクレオチドは、ホスファターゼ又は他の酵素を介して分解しやすく、インビボでの生物学的利用能を制限する可能性がある。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドには、そのような分解に対して抵抗性のある 5' リン酸の類似体が含まれる。いくつかの実施形態では、リン酸類似体はオキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートであってもよい。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖の 5' 末端は、天然 5' - リン酸基の静電的かつ立体的特性を模倣する化学部分（「リン酸模倣体」）に連結する（例えば、Prakashら、Nucleic Acids Research、2015 年、第 43 巻（6 号）：p. 2993 - 3011 参照。リン酸類似体に関する内容は参照により本明細書に援用される）。5' 末端に連結できる多数のリン酸模倣体が開発されている（例えば、米国特許第 8,927,513 号参照。リン酸類似体に関する内容は参照により本明細書に援用される）。オリゴヌクレオチドの 5' 末端については、他の修飾が開発されている（例えば、国際特許公開 WO 2011133871 参照。リン酸類似体に関する内容は参照により本明細書に援用される）。特定の実施形態では、ヒドロキシル基はオリゴヌクレオチドの 5' 末端に連結する。

30

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは糖の 4' - 炭素位置（「4' - リン酸類似体」と称する）にリン酸類似体を有する（例えば、「4' - Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Same」と題された国際特許公開 WO 2018045317 参照。リン酸類似体に関する内容は参照により本明細書に援用される）。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは 5' 末端ヌクレオチドに 4' - リン酸類似体を含む。いくつかの実施形態では、リン酸類似体は、オキシメチル基の酸素原子が（例えば、その 4' - 炭素での）糖部分又はその類似体に結合したオキシメチルホスホネートである。他の実施形態では、4' - リン酸類似体は、チオメチル基の硫黄原子又はアミノメチル基の窒素原子が糖部分又はその類似体の 4' - 炭素に結合しているチオメチルホスホネート又はアミノメチルホスホネートである。特定の実施形態では、4' - リン酸類似体はオキシメチルホスホネートである。いくつかの実施形態では、オキシメチルホスホネートは式 - O - CH₂ - PO(OH)₂ 又は - O - CH₂ - PO(OR)₂ で表し、式中、R は独立して H、CH₃、アルキル基、CH₂CH₂CN、CH₂OCOC(CH₃)₃、CH₂OCH₂CH₂S

40

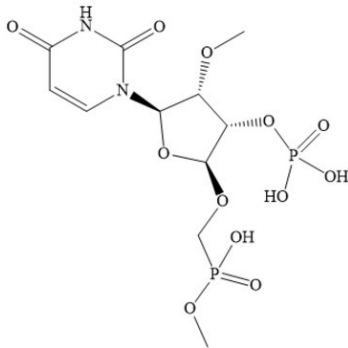
50

i (CH₃)₃、又は保護基から選択される。特定の実施形態では、アルキル基はCH₂CH₃である。より典型的には、Rは独立して、H、CH₃、又はCH₂CH₃から選択される。

【0046】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドに連結したリン酸類似体はメトキシホスホネート(MOP)である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドに連結したリン酸類似体は5'モノ-メチル保護されたMOPである。いくつかの実施形態では、リン酸類似体を含む以下のウリジンヌクレオチドを、例えば、ガイド(アンチセンス)鎖の第1位置で使用してもよい：

【化4】



式中、修飾ヌクレオチドは[Meホスホネート-4O-mU]又は5'-メトキシ、ホスホネート-4'オキシ-2'-O-メチルウリジンと称する。

【0047】

c. 修飾ヌクレオチド間結合

いくつかの実施形態では、リン酸修飾又は置換により、オリゴヌクレオチドが少なくとも1つ(例えば、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、又は少なくとも5個)の修飾ヌクレオチド間結合を含むようになる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1~10個(例えば、1~10個、2~8個、4~6個、3~10個、5~10個、1~5個、1~3個、又は1~2個)の修飾ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個の修飾ヌクレオチド間結合を含む。

修飾ヌクレオチド間結合はホスホロジチオエート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホトリエステル結合、チオノアルキル(thionoalkyl)ホスホネート結合、チオンアルキル(thionoalkyl)ホスホトリエステル結合、ホスホラミダイト結合、ホスホネート結合、又はボラノリン酸結合であってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つのうちの少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間結合はホスホロチオエート結合である。

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは以下の1つ以上の組み合わせの間：センス鎖の1位と2位との間、アンチセンス鎖の1位と2位との間、アンチセンス鎖の2位と3位との間、アンチセンス鎖の3位と4位との間、アンチセンス鎖の20位と21位との間、及びアンチセンス鎖の21位と22位との間にホスホロチオエート結合を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは以下の各組み合わせの間：センス鎖の1位と2位との間、アンチセンス鎖の1位と2位との間、アンチセンス鎖の2位と3位との間、アンチセンス鎖の20位と21位との間、及びアンチセンス鎖の21位と22位との間にホスホロチオエート結合を有する。

【0048】

d. 塩基修飾

いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドは1つ以上の修飾核酸塩基を有する。いくつかの実施形態では、修飾核酸塩基(本明細書では塩基類似体とも称

10

20

30

40

50

する)は、ヌクレオチド糖部分の1'位で結合する。特定の実施形態では、修飾核酸塩基は窒素塩基である。特定の実施形態では、修飾核酸塩基は窒素原子を含まない(例えば、米国特許公開第20080274462号を参照)。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドはユニバーサル塩基を含む。しかし、特定の実施形態では、修飾ヌクレオチドは核酸塩基を含まない(塩基脱落)。

いくつかの実施形態では、ユニバーサル塩基は、修飾ヌクレオチドにおけるヌクレオチド糖部分の1'位、又はヌクレオチド糖部分置換基における同等の位置に配置された複素環部分であり、これは、二重鎖に存在する場合、二重鎖の構造をほぼ変化させることなく、複数種の塩基の反対側に配置することが可能である。いくつかの実施形態では、標的核酸に完全に相補的な基準一本鎖核酸(例えば、オリゴヌクレオチド)と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、相補的核酸で形成された二重鎖より低い T_m を有する標的核酸と二重鎖を形成する。しかし、いくつかの実施形態では、ユニバーサル塩基が塩基で置換されて単一のミスマッチが生じている基準一本鎖核酸と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、ミスマッチ塩基を含む核酸で形成された二重鎖より高い T_m を有する標的核酸と二重鎖を形成する。

ユニバーサル結合ヌクレオチドの非限定的な例としては、イノシン、1- β -D-リボフラノシル-5-ニトロインドール、及び/又は1- β -D-リボフラノシル-3-ニトロピロールが挙げられる(米国特許公開第20070254362号; Van Aersc hotら、Nucleic Acids Research、1995年、第23巻(21号): p. 4363-70; Loakesら、Nucleic Acids Research、1995年、第23巻(13号): p. 2361-6; Loakes及びBrown、Nucleic Acids Research、1994年、第22巻(20号): p. 4039-43参照。前述の各文献は、塩基修飾に関する開示について、参照により本明細書に援用される)

【0049】

e. 可逆的修飾

標的細胞に到達する前にインビボ環境からオリゴヌクレオチドを保護するための特定の修飾を行うことが可能である一方で、その修飾は、オリゴヌクレオチドが標的細胞の細胞基質に到達するとオリゴヌクレオチドの効力又は活性を低下させる可能性がある。可逆的修飾は、分子が細胞外では望ましい特性を保持し、細胞の細胞基質環境に入るとその特性は無くなるように行うことが可能である。可逆的修飾は、例えば、細胞内酵素の作用、又は細胞内の化学的条件により(例えば、細胞内グルタチオンによる還元を経て)消すことが可能である。

いくつかの実施形態では、可逆的に修飾したヌクレオチドはグルタチオン感受性部位を含む。典型的には、核酸分子は、ヌクレオチドニリン酸間結合により生じる負電荷を覆い隠して細胞取り込み及びヌクレアーゼ耐性を改善するために環状ジスルフィド部分で化学修飾している(例えば、米国特許公開第20110294869号、国際特許公開WO2015188197; Meadeら、Nature Biotechnology、2014年、第32巻: p. 1256-1263; 国際特許公開WO2014088920参照; 各文献は、そのような修飾の開示について参照により援用される)。ヌクレオチドニリン酸間結合の可逆的修飾は、細胞基質の還元環境(例えば、グルタチオン)により細胞内で切断されるように設計している。先行例としては、細胞内で切断可能であると報告されている中和ホスホトリエステル修飾が挙げられる(Delling erら、米国化学会誌、2003年、第125巻: p. 940-950)。

【0050】

いくつかの実施形態では、このような可逆的な修飾により、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼや他の過酷な環境条件(例えば、pH)に曝されるインビボ投与(例えば、血液及び/又は細胞のリソソーム/エンドソーム区分の通過)中に保護が可能になる。細胞外空間と比較してグルタチオンレベルが高い細胞の細胞基質内に放出されると、修飾は打ち消され、結果としてオリゴヌクレオチドが切断される。可逆的なグルタチオン感受性部位を

用いると、不可逆的な化学修飾を用いることが可能な場合と比較して、対象のオリゴヌクレオチドに立体的に大型の化学基を導入することが可能となる。何故なら、これらの大型の化学基は細胞基質で除去されるため、細胞の細胞基質内におけるオリゴヌクレオチドの生物学的活性を妨げないはずだからである。その結果、これらの大型の化学基は、ヌクレアーゼ耐性、親油性、電荷、熱安定性、特異性、及び免疫原性低下など様々な利点をヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドへ付与するように設計できる。いくつかの実施形態では、グルタチオン感受性部位の構造は、その放出の動態を改変するように設計できる。いくつかの実施形態では、グルタチオン感受性部分はヌクレオチドの糖に連結している。いくつかの実施形態では、グルタチオン感受性部分は修飾ヌクレオチドの糖の2'炭素に連結している。いくつかの実施形態では、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドである場合に、グルタチオン感受性部分は糖の5'-炭素に位置する。いくつかの実施形態では、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの3'-末端ヌクレオチドである場合に、グルタチオン感受性部分は糖の3'-炭素に位置する。いくつかの実施形態では、グルタチオン感受性部分はスルホニル基を含む（例えば、国際特許公開WO2018039364参照。その内容は、その関連する開示内容について参照により本明細書に援用される）。

【0051】

v. 標的化リガンド

いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドを1つ以上の細胞又は1つ以上の器官に標的化することが望ましい場合もある。そのような戦略は、他の器官における望ましくない効果を回避することに役立つか、又はオリゴヌクレオチドにとって有益ではない細胞、組織もしくは器官に向かってオリゴヌクレオチドが過度に損失してしまうことを回避し得る。従って、いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、特定の組織、細胞又は器官への標的化を容易にするために、例えば、肝臓へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするために修飾してもよい。特定の実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするために修飾してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは1つ以上の標的化リガンドと共役したヌクレオチドを含む。

標的化リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質もしくはタンパク質の一部（例えば、抗体又は抗体フラグメント）、又は脂質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、標的化リガンドはアプタマーである。例えば、標的化リガンドは、腫瘍脈管構造又は神経膠腫細胞を標的とするために使用するRGDペプチド、腫瘍脈管構造又はストーマを標的とするCREKAペプチド、CNS脈管構造に発現するトランスフェリン受容体を標的とするトランスフェリン(transferring)、ラクトフェリンもしくはアプタマー、又は神経膠腫細胞上のEGFRを標的とする抗EGFR抗体であってもよい。特定の実施形態では、標的化リガンドは1つ以上のGalNAc部分である。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの1個以上（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、又は6個）のヌクレオチドはそれぞれ別の標的化リガンドと共役している。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの2～4個のヌクレオチドをそれぞれ別の標的化リガンドと共役している。いくつかの実施形態では、標的化リガンドはセンス又はアンチセンス鎖のいずれかの末端で2～4個のヌクレオチドと共役しており（例えば、リガンドは、センス又はアンチセンス鎖の5'又は3'末端上の2～4個のヌクレオチドオーバーハング又は延長部と共役している）、ここでは標的化リガンドは歯ブラシの毛に似ており、オリゴヌクレオチドは歯ブラシに似ている。例えば、オリゴヌクレオチドはセンス鎖の5'又は3'末端のいずれかにステム-ループを含んでもよく、ステムループの1個、2個、3個、又は4個のヌクレオチドは個別に標的化リガンドと共役してもよい。

【0052】

いくつかの実施形態では、HMG B1の発現を低下させるオリゴヌクレオチドを、被験体の肝臓の肝細胞に標的化することが望ましい。この目的のために好適な肝細胞標的化部分

であればどのような部分でも使用できる。

G a l N A c は、アシアロ糖タンパク質受容体（A S G P R）に高親和性のリガンドであり、主に肝細胞の類洞表面に発現し、末端ガラクトース又は N - アセチルガラクトサミン残基を含む循環糖タンパク質（アシアロ糖タンパク質）の結合、内在化、及びその後のクリアランスにおいて主要な役割を担う。本開示のオリゴヌクレオチドへの G a l N A c 部分のコンジュゲーション（間接的又は直接的のいずれか）は、これらの肝細胞上に発現する A S G P R にこれらのオリゴヌクレオチドを標的として向けるために利用してもよい。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは一価 G a l N A c に直接又は間接的と共役している。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、複数の一価 G a l N A c に直接又は間接的と共役している（例えば、2 個、3 個、又は 4 個の一価 G a l N A c 部分と共役し、典型的には 3 個又は 4 個の一価 G a l N A c 部分と共役している）。いくつかの実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の二価 G a l N A c 、三価 G a l N A c 、又は四価 G a l N A c 部分と共役している。

10

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの 1 個以上（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、又は 6 個）のヌクレオチドはそれぞれ G a l N A c 部分と共役している。いくつかの実施形態では、ステム - ループのループ（L）の 2 ～ 4 個のヌクレオチドはそれぞれ別の G a l N A c と共役している。いくつかの実施形態では、標的化リガンドはセンス又はアンチセンス鎖のいずれかの末端で 2 ～ 4 個のヌクレオチドと共役しており（例えば、リガンドを、センス又はアンチセンス鎖の 5 ' 又は 3 ' 末端上の 2 ～ 4 個のヌクレオチドオーバーハング又は延長部と共役している）、ここでは G a l N A c 部分は歯ブラシの毛に似ており、オリゴヌクレオチドは歯ブラシに似ている。例えば、オリゴヌクレオチドはセンス鎖の 5 ' 又は 3 ' 末端のいずれかにステム - ループを含んでもよく、ステムループの 1 個、2 個、3 個、又は 4 個のヌクレオチドは G a l N A c 部分に個別と共役してもよい。いくつかの実施形態では、G a l N A c 部分はセンス鎖のヌクレオチドと共役する。例えば、4 つの G a l N A c 部分は、各 G a l N A c 部分が 1 つのヌクレオチドと共役されているセンス鎖のテトラループのヌクレオチドと共役できる。

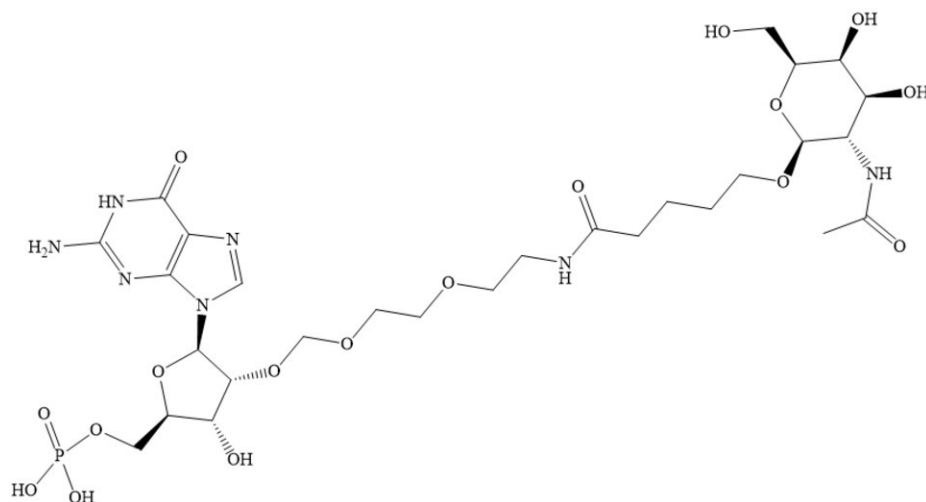
20

【0053】

いくつかの実施形態では、本明細書のオリゴヌクレオチドは、以下に示すような [a d e m G - G a l N A c] 又は 2 ' - アミノジエトキシメタノール - グアニジン - G a l N A c と称するグアニジンヌクレオチドに連結した一価 G a l N A c を含む。

30

【化 5】

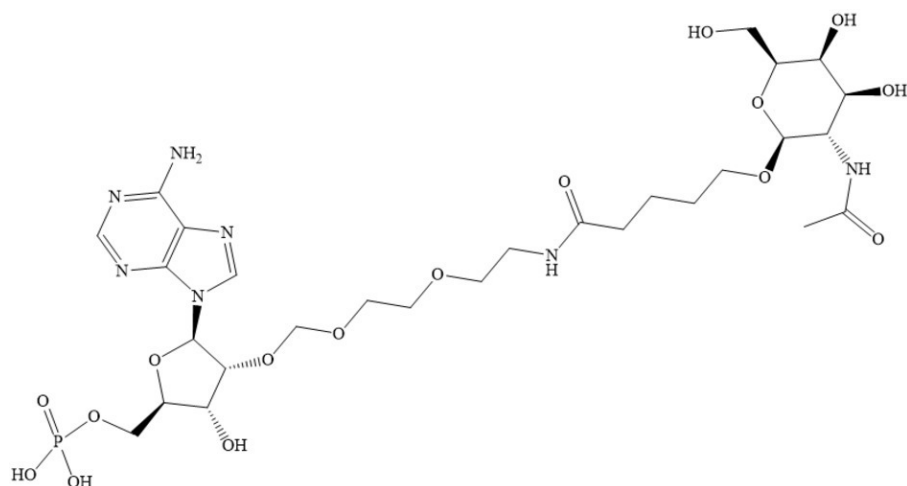


40

いくつかの実施形態では、本明細書のオリゴヌクレオチドは、以下に示すような [a d e m A - G a l N A c] 又は 2 ' - アミノジエトキシメタノール - アデニン - G a l N A c と称するアデニンヌクレオチドに連結した一価 G a l N A c を含む。

50

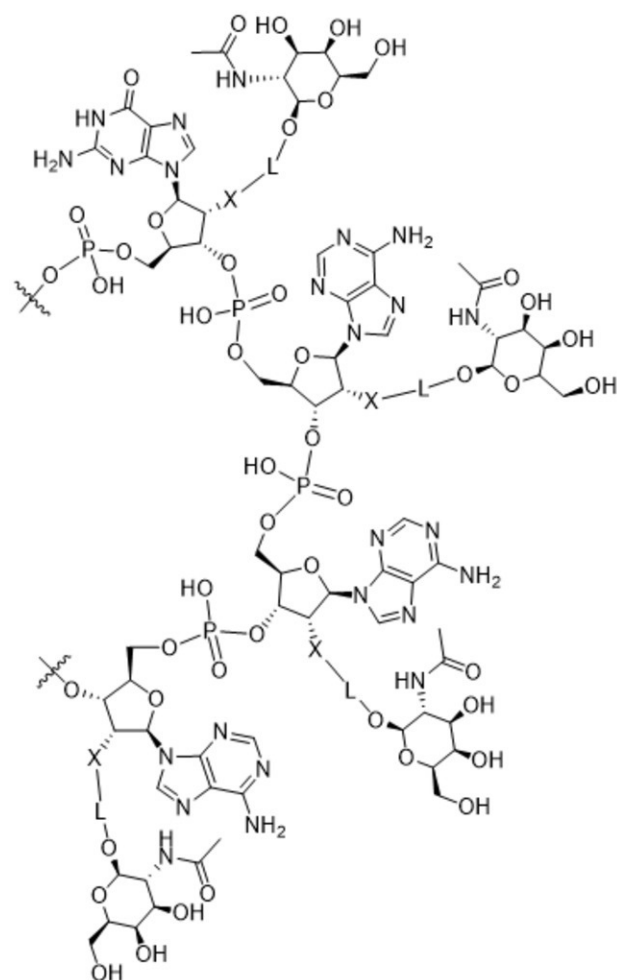
10



20

30

40



50

適切な方法又は化学反応（例えば、クリックケミストリー）を利用して、標的化リガンドをヌクレオチドに連結することが可能である。いくつかの実施形態では、クリックリンカーを用いて標的化リガンドをヌクレオチドと共役する。いくつかの実施形態では、標的化リガンドを本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つのヌクレオチドと共役するためにアセタール系リンカーを使用する。アセタール系リンカーは、例えば国際特許公開WO2016100401に開示されており、そのようなリンカーに関するその内容は参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、リンカーは不安定なリンカーである。しかし、他の実施形態では、リンカーは安定している。「不安定なリンカー」とは、例えば酸性pHにより切断できるリンカーを指す。安定したリンカー」とは、切断できないリンカーを指す。

10

5'～3'のヌクレオチドG A A Aを含むループについて一例を以下に示し、ここではG a l N A c部分はアセタールリンカーを用いたループのヌクレオチドに連結している。このようなループは、例えば、図10に記載の分子の27～30位に存在してもよい。化学式中、



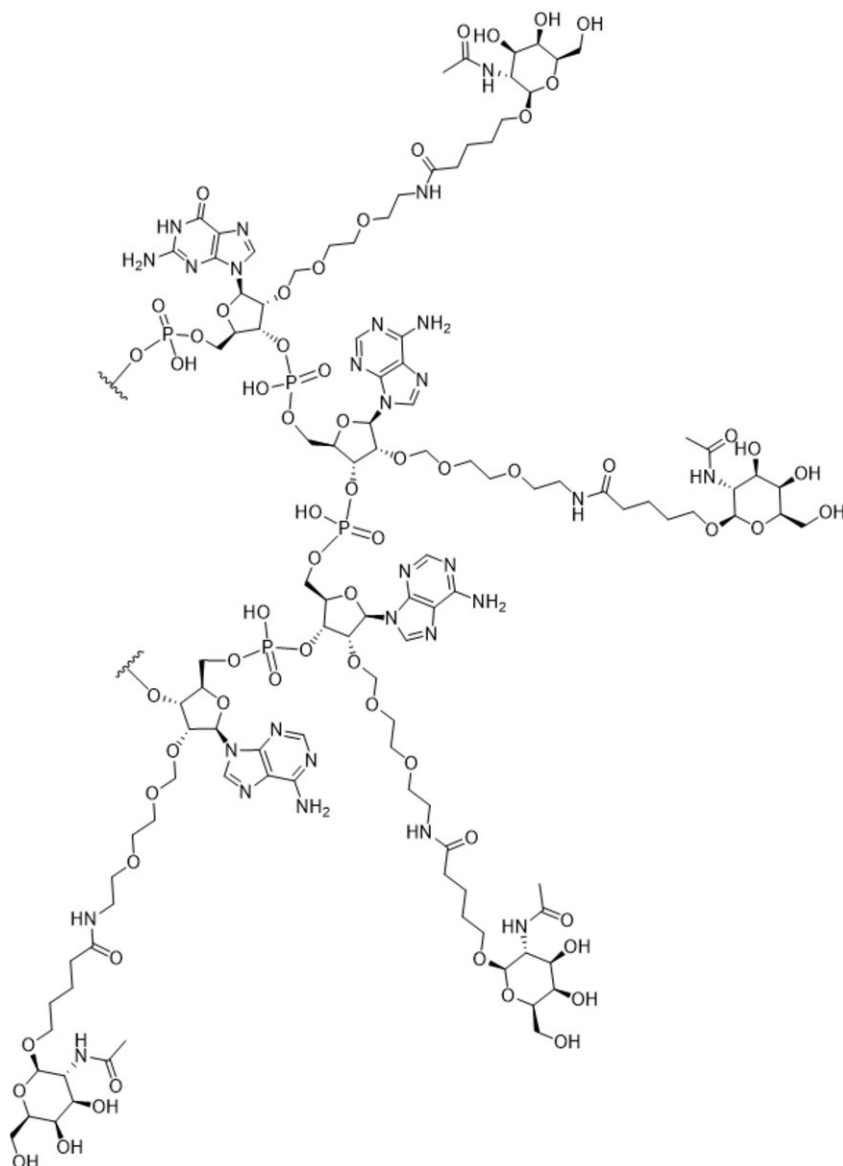
はオリゴヌクレオチド鎖への連結点である。

【化8】

20

30

40



標的化リガンドをヌクレオチドに連結するために、任意の適切な方法又は化学反応（例え

50

ば、クリックケミストリー）を利用することが可能である。いくつかの実施形態では、クリックリンカーを用いて標的化リガンドをヌクレオチドと共役する。いくつかの実施形態では、標的化リガンドを本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つのヌクレオチドと共役するためにアセタール系リンカーを使用する。アセタール系リンカーは、例えば国際特許公開WO2016100401に開示されており、そのようなリンカーに関するその内容は参照により本明細書に援用される。いくつかの実施形態では、リンカーは不安定なリンカーである。他の実施形態では、リンカーは安定している。

いくつかの実施形態では、標的化リガンド（例えば、GalNAc部分）と二本鎖オリゴヌクレオチドとの間に二重鎖延長部（例えば、最大3、4、5、又は6塩基対長）が存在する。

10

【0055】

III. 製剤

オリゴヌクレオチドの使用を容易にするために、様々な製剤が開発されている。例えば、分解を最小限に抑え、送達及び／もしくは取り込みを容易にし、又は製剤中のオリゴヌクレオチドに別の有益な特性を提供する製剤を用いて、オリゴヌクレオチドを被験体又は細胞環境に送達することが可能になる。いくつかの実施形態では、HMG B1発現を低減するためのオリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖又は二本鎖オリゴヌクレオチド）を含む組成物が本明細書で提供される。このような組成物は、被験体において標的細胞のごく近い環境に、又は全身に投与されたときに、十分量のオリゴヌクレオチドが細胞に入り、HMG B1発現を低減するように、好適に配合できる。本明細書に開示したHMG B1を低減するオリゴヌクレオチドを送達するために、任意の様々な好適なオリゴヌクレオチド製剤を使用できる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはリン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、リポソーム、ミセル構造体、及びカプシド中に配合する。

20

細胞へのオリゴヌクレオチドのトランスフェクションを促進するために、カチオン性脂質を含むオリゴヌクレオチドの製剤を使用できる。例えば、リポフェクチン、カチオン性グリセリン誘導体、及びポリカチオン性分子（例えば、ポリリジン）などのカチオン性脂質を使用できる。好適な脂質としては、Oligofectamine、Lipofectamine（Life Technologies社）、NC388（Ribozyme Pharmaceuticals社、コロラド州、Boulder）、又はFuGene6（Roche社）が挙げられ、これらは全てメーカー説明書に従って使用できる。

30

【0056】

従って、いくつかの実施形態では、製剤は脂質ナノ粒子を含む。いくつかの実施形態では、賦形剤は、リポソーム、脂質、脂質複合体、ミクロスフェア、マイクロ粒子、ナノスフィア、もしくはナノ粒子を含むか、又はそうでなければ、それを必要とする被験体の細胞、組織、器官、もしくは身体に投与するために配合してもよい（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Pharmaceutical Press、2013年参照）。

いくつかの実施形態では、本明細書に開示した製剤は賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、賦形剤により、組成物において安定性、吸収、溶解性が向上し、及び／又は有効成分による治療が促進される。いくつかの実施形態では、賦形剤は緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス塩基、又は水酸化ナトリウム）、又はビヒクル（例えば、緩衝液、ペトロラタム、ジメチルスルホキシド、又は鉱油）である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは貯蔵寿命を延長するために凍結乾燥し、その後、使用（例えば、被験体への投与）前に溶液にする。従って、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1種を含む組成物中の賦形剤は、凍結乾燥保護剤（lyoprotectant）（例えば、マンニトール、ラクトース、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドン）、又は崩壊温度調整剤（例えば、デキストラン、フィコール、又はゼラチン）であってもよい。

40

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、意図した投与経路に適合するように配合する。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、

50

経皮（局所）、経粘膜、及び直腸投与が挙げられる。

【0057】

注射用途に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び滅菌注射用液又は分散液を即席に調製するための滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与では、好適な担体として、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL, TM. (BASF社、米国、ニュージャージー州、Parsippany)、又はリン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液状ポリエチレングリコール等）、及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒体となり得る。多くの場合、等張剤、例えば糖類、マンニトールやソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましい。滅菌注射用溶液は、上述で列挙した成分の1つ又は組み合わせと共に、必要量のオリゴヌクレオチドを、選択した溶媒中に組み込み、次いで必要に応じて過滅菌することにより調製できる。

10

いくつかの実施形態では、組成物は、治療剤（例えば、HMGB1発現を低減するためのオリゴヌクレオチド）を少なくとも約0.1%、又はそれ以上を含有してもよいが、有効成分（単数又は複数）の割合は全組成物の重量又は体積の約1%～約80%以上であってもよい。溶解性、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、製品貯蔵寿命、並びに他の薬理学的考慮事項などの要因は、当業者がそのような医薬製剤を調製することにより検討され、よって様々な投与量及び治療レジメンが望ましいものとなる可能性がある。

多くの実施形態は、本明細書で開示したオリゴヌクレオチドのいずれかの肝臓標的送達を意図しているが、他の組織の標的化も検討されている。

20

【0058】

IV. 使用方法

i. 細胞内HMGB1発現の低減

いくつかの実施形態では、細胞内HMGB1発現を低減する目的で、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つを有効量で細胞に送達するための方法を提供する。本明細書で提供する方法は、任意の適切な細胞型において有用である。いくつかの実施形態では、細胞はHMGB1を発現する任意の細胞（例えば、肝細胞、マクロファージ、単球由来細胞、前立腺癌細胞、脳細胞、内分泌組織、骨髄、リンパ節、肺、胆嚢、肝臓、十二指腸、小腸、脾臓、腎臓、消化管、膀胱、脂肪組織及び軟部組織、及び皮膚）である。いくつかの実施形態では、細胞は、被験体から得た初代培養細胞、及び限られた回数の継代を経てもよい初代培養細胞であり、よって細胞は天然の表現型特性をほぼ維持している。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドを送達する細胞は、エキスピボ又はインビトロ細胞である（例えば、培養液中の細胞、又は細胞が存在する生物に送達できる細胞）。具体的な実施形態では、肝細胞におけるHMGB1発現のみを低減する目的で、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1つを有効量で細胞に送達する方法が提供される。

30

いくつかの実施形態では、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは適切な核酸送達方法を用いて導入可能であり、該方法には、オリゴヌクレオチドを含有する溶液の注入、オリゴヌクレオチドで覆われた粒子による衝撃、オリゴヌクレオチドを含有する溶液への細胞又は生物の曝露、又はオリゴヌクレオチドの存在下での細胞膜の電気穿孔が含まれる。オリゴヌクレオチドを細胞に送達するための他の適切な方法も使用してよく、例えば脂質媒介担体輸送、化学物質媒介輸送、リン酸カルシウムなどのカチオン性リポソームトランスフェクション等が挙げられる。

40

阻害の結果は、細胞又は被験体の1つ以上の特性を評価する適切なアッセイにより、又はHMGB1発現の指標となる分子（例えば、RNA、タンパク質）を評価する生化学的技術により確認できる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供するオリゴヌクレオチドがHMGB1発現レベルを低下させる程度は、HMGB1の発現レベル（例えば、mRNA又はタンパク質レベル）を適切な対照（例えば、オリゴヌクレオチドが送達されていない細胞もしくは細胞集団、又は陰性対照が送達された細胞もしくは細胞集団におけるHM

50

G B 1 発現レベル)と比較することにより評価する。いくつかの実施形態では、H M G B 1 発現の適切な対照レベルは、対照レベルを毎回測定する必要がないような所定のレベル又は数値であってもよい。所定のレベル又は数値は様々な形態をとることが可能である。いくつかの実施形態では、所定のレベル又は数値は、中央値又は平均値などの単一のカットオフ値とすることが可能である。

【0059】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの投与により、細胞内 H M G B 1 発現レベルが低下する。いくつかの実施形態では、H M G B 1 発現レベルの低下は、H M G B 1 の適切な対照レベルと比較して、1 % 以下、5 % 以下、10 % 以下、15 % 以下、20 % 以下、25 % 以下、30 % 以下、35 % 以下、40 % 以下、45 % 以下、50 % 以下、55 % 以下、60 % 以下、70 % 以下、80 % 以下、又は90 % 以下の低下であってもよい。適切な対照レベルは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドと接触していない細胞又は細胞集団におけるH M G B 1 発現レベルであってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示した方法に従った細胞へのオリゴヌクレオチドの送達効果は有限期間後に評価する。例えば、H M G B 1 レベルは、細胞へのオリゴヌクレオチドの導入から少なくとも8時間、12時間、18時間、24時間；又は少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、もしくは14日後に、細胞内で分析してもよい。

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド（例えば、そのセンス鎖及びアンチセンス鎖）を細胞内で発現するように設計した導入遺伝子の形態で送達する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示した任意のオリゴヌクレオチドを発現するように設計した導入遺伝子を用いて送達する。導入遺伝子はウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス又は単純ヘルペスウイルス）又は非ウイルスベクター（例えば、プラスミド又は合成mRNA）を用いて送達してもよい。いくつかの実施形態では、導入遺伝子を被験体に直接注入できる。

【0060】

i i . 治療方法

本開示の態様は、被験体における肝線維症の発症又は進行を抑制するための、H M G B 1 発現を低減する方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法には、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドのいずれか1種を有効量で、それを必要とする被験体に投与することが含まれてもよい。そのような治療は、例えば任意のタイプの肝線維症を遅延又は停止するために使用できる。本開示は、肝線維症及び／又は肝臓の炎症に伴う疾患又は障害のリスクがある（又は罹患し易い）被験体を治療する予防的方法及び治療的方法の両方を提供する。

本発明の化合物は、肝臓においてのみH M G B 1 mRNAを選択的に標的とする。他のN A S H 治療薬と比較して、この選択性は、非特異的な相互作用及び潜在的な副作用を減少させながら、本発明のH M G B 1 阻害剤の効力を増加させることが期待される。

特定の態様では、本開示は、治療剤（例えば、オリゴヌクレオチド又はそれをコードするベクターもしくは導入遺伝子）を被験体に投与することにより、被験体において本明細書に記載の疾患又は障害を予防する方法を提供する。いくつかの実施形態では、治療対象の被験体は、例えば肝臓でのH M G B 1 タンパク質の量の減少から治療上の利益が得られる対象である。疾患又は障害のリスクがある被験体は、例えば、当技術分野で公知の診断又は予後アッセイのうちの1つ又は組み合わせにより同定できる（例えば、肝線維症及び／又は肝臓の炎症の同定）。予防薬の投与は、疾患又は障害に特徴的な症状の検出又は顕在化に先立って行うことが可能であり、その結果、疾患又は障害が予防されるか、或いはその進行を遅らせる。

【0061】

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば胆汁うっ滞性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患（N A F L D）及び非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）などの肝臓状態にあるか、又はその疑いのある被験体を治療するための本発明のRNA i オリゴヌクレオチドを

使用する方法を提供する。

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば胆汁うっ滞性肝疾患、N A F L D 及び N A S H などの肝臓状態にあるか、又はその疑いのある被験体を治療するために使用するための本明細書に記載の R N A i オリゴヌクレオチドを提供する。

いくつかの実施形態では、本開示は、例えば胆汁性肝疾患、N A F L D 及び非アルコール性脂肪性肝炎 N A S H などの肝臓状態にあるか、又はその疑いのある被験体を治療するための薬剤を調製するための R N A i を提供する。

本明細書に記載の方法は典型的には、オリゴヌクレオチドを有効量、即ち、望ましい治療結果をもたらし得る量を被験体に投与することを含む。治療的に許容可能な量とは、疾患又は障害を治療し得る量であってもよい。任意の1被験体のための適切な投与量は、被験体の体格、体表面積、年齢、投与する特定の組成物、組成物中の有効成分（単数又は複数）、投与期間及び投与経路、健康全般、及び併用投与している他の薬剤など、特定の要因によって異なる。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、被験体には、本明細書に開示した組成物のいずれか1種を、経腸（例えば、経口、経胃栄養管、経十二指腸栄養管、経胃瘻、又は経直腸）、非経口（例えば、皮下注射、静脈内注射又は輸液、動脈内注射又は輸液、骨内注入、筋肉内注射、脳内注射、脳室内注射、髄腔内投与）、局所投与（経皮、吸入、点眼、又は経粘膜）、又は標的器官（例えば、被験体の肝臓）への直接注射、のいずれかで投与する。典型的には、本明細書に開示したオリゴヌクレオチドは静脈内又は皮下に投与する。

20

非限定的な一連の例として、本開示のオリゴヌクレオチドは典型的には、四半期ごとに（3か月に1回）、隔月で（2か月に1回）、毎月、又は毎週投与する。例えば、オリゴヌクレオチドは、毎週、又は2週間ごとに、又は3週間ごとに投与してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは毎日投与してもよい。

いくつかの実施形態では、治療対象の被験体は、ヒト又は非ヒトの霊長類又は他の哺乳類被験体である。他の例示的な被験体としては、イヌ及びネコなどの飼育慣らされた動物；ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、及びニワトリなどの家畜；並びにマウス、ラット、モルモット、及びハムスターなどの動物が挙げられる。

【実施例】

【0063】

実施例1：G a l N A c 共役 H M G B 1 オリゴヌクレオチドのインビボ活性

本実施例で使用した H M G B 1 オリゴヌクレオチドは、ヒト、サル（本例での2匹のサルは両方ともアカゲザル）、及びマウスの配列においてアルゴリズムにより同定した保存配列（「3種共通」配列）に結合するように設計した。本研究では、3つの3種共通オリゴヌクレオチド配列（S 3 1 - A S 1 8、S 3 5 - A S 2 2、及び S 3 6 - A S 2 3）を、3つの異なる修飾パターン（M 1、M 2、及び M 3、図 1 A 及び 1 B 参照）で試験した。オリゴヌクレオチドを 1 m g / k g で C D - 1 マウスに皮下投与し、投与後5日目にマウスを安楽死させた。肝臓試料を採取し、R N A を抽出し、H M G B 1 m R N A レベルを q P C R（H P R T 1 - F 5 7 6（ハウスキーピング遺伝子）に正規化）により評価した。残留した H M G B 1 m R N A のレベルは、T A Q M A N（登録商標）をベースとする q P C R アッセイを利用して調べた。

40

H M G B 1 m R N A の異なる領域に特異的な2つの異なるプライマーを用いて q P C R を行った。他のプライマーを用いず5'末端のプライマーを用いて実行する q P C R を「5' q P C R」と指定した。同様に、他のプライマーを用いず3'末端のプライマーを用いて実行する q P C R を「3' q P C R」と指定した。この実験では、3' q P C R アッセイ（プライマー M m H M G B 1 - F 1 5 4 1 を使用）を使用した。そのデータから、（P B S 対照処理に正規化した）マウス肝臓に残留している H M G B 1 m R N A の量が減少したことで示されているように、試験した全ての H M G B 1 オリゴヌクレオチドは、投与5日後に H M G B 1 を強力にノックダウンしたことが分かった（図 1 A）。

【0064】

50

異なる修飾パターンを持つ2つのGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(S31-AS18-M3、及びS35-AS22-M2)を、ツール化合物S36-AS23-M2を対照として、用量反応分析で更に試験した。3種類のオリゴヌクレオチドを3種類の異なる投与量(0.5mg/kg、1mg/kg、及び2mg/kg)でCD-1マウスに皮下投与した。投与後5日目にマウスを安楽死させた。肝臓試料を採取し、RNAを抽出し、HMGB1 mRNAレベルをqPCR(Hprt1-F576(ハウスキーピング遺伝子)に正規化)により評価した。残留したHMGB1 mRNAのレベルを、TAQMAN(登録商標)をベースとするqPCRアッセイ(上述の3'アッセイを使用)を利用して調べた。その結果から、試験した2種類のGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドは、両修飾パターンにおいてマウス肝臓のHMGB1 mRNAレベルを低下させたことが分かる(図2)。特に非肝細胞の「底値」を考慮した場合、全てのオリゴヌクレオチドは約0.5~1.0mg/kgのED50を示した。

10

次に、修飾パターンが異なる2つのGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(S31-AS18-M3及びS35-AS22-M2)を、持続研究においてインビボで試験し、マウスにおけるHMGB1発現を阻害する際の活性を評価した。この実験では、PBSを陰性対照とし、ツール化合物S36-AS23-M2を陽性対照とした。オリゴヌクレオチドを1mg/kgでCD-1マウスに皮下投与し、投与後7日目、14日目、21日目、及び28日目にマウスを安楽死させた。肝臓試料を採取し、RNAを抽出し、HMGB1 mRNAレベルをqPCR(Hprt1-F576ハウスキーピング遺伝子に正規化)により評価した。上述した3'アッセイを利用した。そのデータから、(PBS対照処理に正規化した)7、14、21、及び28日目のマウス肝臓に残留しているHMGB1 mRNAの量が減少したことで示されているように、1mg/kg単回投与でも、注射から3週間後に全ての試験したHMGB1オリゴヌクレオチドがHMGB1を強力にノックダウンしたことが分かった(図3)。

20

【0065】

実施例2: HMGB1発現を阻害する追加のRNAiオリゴヌクレオチドを同定するための新規HMGB1 RNAiオリゴヌクレオチド配列の追加的インビトロスクリーニング追加の288個の3種共通HMGB1 RNAiオリゴヌクレオチド(配列については表4参照)をインビトロ活性アッセイでスクリーニングし、HMGB1発現を阻害する際に有効な追加のRNAiオリゴヌクレオチド配列を同定した(図4A~4F)。このアッセイでは、Hu h-7細胞を、上記に示したオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。トランスフェクト後24時間、細胞を維持し、iScript RT-qPCR試料調製緩衝液を用いてRNAを単離した。HMGB1 mRNAは、TAQMAN(登録商標)をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた。2種のqPCRアッセイ、5'アッセイ及び3'アッセイを利用し、それぞれHEX(ハウスキーピング遺伝子—Hprt1-F576/SFRS9-F594)及びFAMプローブにより測定したmRNAレベルを決定した。

30

残留mRNAの割合を、5'アッセイ(赤)及び3'アッセイ(青)のそれぞれについて示す。mockトランスフェクション対照と比較して、残留mRNAの割合が最も低いオリゴヌクレオチドを成功(hit)とした。ヒトゲノムとの相補性が低いオリゴヌクレオチドを陰性対照とした。

40

【0066】

スクリーニングで同定した22個の新規配列から、2つの異なる修飾パターン(それぞれM2及びM3)を有する複数のGalNAc共役テトラループオリゴヌクレオチド(配列については表2及び表5参照)を作成し、肝臓HMGB1 mRNAレベルを低下させるオリゴヌクレオチドのインビボ活性を試験した。この実験では、PBSを陰性対照とし、2つの異なる修飾パターンを持つツール化合物(S36-AS23-M2及びS36-AS23-M3)を陽性対照とした。オリゴヌクレオチドを、1mg/kgでCD-1マウスに皮下投与し、投与後5日目にマウスを安楽死させた。肝臓試料を採取し、RNAを抽出し、HMGB1 mRNAレベルをqPCR(Hprt1-F576(ハウスキーピング

50

グ遺伝子)に正規化)により評価した。残留したHMGB1 mRNAのレベルは、TAQMAN (登録商標)をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた(3'アッセイを利用した)。その結果、新規GalNAc共役リゴヌクレオチドは肝臓HMGB1を阻害する際の活性レベルが異なり、7種の新規GalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(矢印で示す、S27-AS14、S28-AS15、S29-AS16、S30-AS17、S32-AS19、S33-AS20、及びS34-AS21)は、もしマウスに3~5mg/kgを単回投与してから3週間後にHMGB1 mRNAが少なくとも50%抑制されていれば、ノックダウン持続研究に含めるように選択した(図5)。

ノックダウン持続アッセイでは、異なる修飾パターン(M2又はM3)を有する7種の新規GalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(S27-AS14、S28-AS15、S29-AS16、S30-AS17、S32-AS19、S33-AS20、及びS34-AS21)を試験し、事前に同定した2種のGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(S31-AS18-M3及びS35-AS22-M2)と比較した。PBSを陰性対照とし、ツール化合物S36-AS23-M2を陽性対照とした。オリゴヌクレオチドを、4mg/kgでCD-1マウスに皮下投与し、投与後21日目にマウスを安楽死させた。肝臓試料を採取し、RNAを抽出し、HMGB1 mRNAレベルをqPCR(Hprt1-F576(ハウスキーピング遺伝子)に正規化)により評価した。残留したHMGB1 mRNAのレベルは、TAQMAN (登録商標)をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた(3'アッセイを利用した)。オリゴヌクレオチド投与から21日後の肝臓における残留HMGB1 mRNAの割合を、PBS対照処理に正規化して図6に示す。試験した全てのHMGB1オリゴヌクレオチドは、注射から3週間後にHMGB1を強力にノックダウンした。

10

20

【0067】

実施例3：初代培養サル又はヒト肝細胞におけるGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドの試験

本実験で試験したGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドを図7に示した。また、図7には、陽性対照として使用するためのGalNAc共役LDHAオリゴヌクレオチドも示す。このアッセイでは、GalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドを、ASGPR受容体を介した取り込みにより、初代培養サル肝細胞(図8A及び8B)又はヒト肝細胞(図8C)細胞に送達した。

30

オリゴヌクレオチドの送達から24時間、細胞を維持した。RNAを抽出し、qPCR(サル肝細胞についてはRhPP1B(ハウスキーピング遺伝子)に正規化し、ヒト肝細胞についてはHprt1-F576(ハウスキーピング遺伝子)に正規化した)によりHMGB1 mRNAレベルを評価した。残留HMGB1 mRNAのレベルは、TAQMAN (登録商標)をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた。RhHMGB1-F457 qPCRアッセイ(図8A及び8B)及びHsHMGB1-F81アッセイ(図8C)を利用した。GalNAc共役LDHA-1360オリゴヌクレオチドをアッセイ対照とし(図8D)、残留LDHA mRNAのレベルをRhLDHA-F887 qPCRアッセイにより測定した。Mock処理に正規化したRhHMGB1のIC50曲線を示す。

40

【0068】

4つの例示的なGalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチド(S27-AS14-M2、S33-AS20-M2、S35-AS22-M2、及びS37-AS24-M2)を、HMGB1ノックダウンの際の活性について、非ヒト霊長類(サル)においてインビボで更に試験した。この実験では、PBSを陰性対照とし、ツール化合物S36-AS23-M2を陽性対照とした。S27-AS14-M2、S33-AS20-M2、S35-AS22-M2、及びS36-AS23-M2の構造を図7に示す。

オリゴヌクレオチドを、単回投与4mg/kgで、又は2mg/kg量を4回繰り返して、非ヒト霊長類に皮下投与した。投与後の各時点でサルの肝生検を行った。肝臓試料を採取し、RNAを抽出し、qPCRによりHMGB1 mRNAレベルを評価した。投与後

50

7日、14日、25日、54日、81日、112日目のサル肝臓における残留HMGB1 mRNAの割合を、PBS対照処理に正規化し、示す（図9A～9B）。その結果、試験した全てのオリゴヌクレオチドは、投与後25日目に肝臓のHMGB1 mRNAレベルを有意に低下させた。2mg/kg用量を4回繰り返して投与したところ、HMGB1ノックダウン効果は112日間持続した（図9B）。

【0069】

実施例4：初代培養サル／ヒト肝細胞でのHMGB1 RNAiオリゴヌクレオチドの比較5種類のHMGB1二本鎖RNAiオリゴヌクレオチド（表4のS866-AS887、S869-AS878、S116-AS490、S117-AS491、S871-AS880、及びS872-AS881）の活性を、マウス、サル、及びヒトの細胞株で比較した。この実験では、PBSを陰性対照とし、ツール化合物S36-AS23-M2を陽性対照とした。このアッセイでは、マウス細胞（Hepa1-6細胞、図10A及び10B）、サル細胞（LLC-MK2細胞、図10C及び10D）、及びヒト細胞（Huh-7、図10E及び10F）をそれぞれ、上記で示したオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。トランスフェクト後24時間、細胞を維持し、iScript RT-qPCR試料調製緩衝液を用いてRNAを単離した。HMGB1 mRNAは、TAQMAN（登録商標）をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた。2種のqPCRアッセイ、5'アッセイ（図10A、10C、及び10E）及び3'アッセイ（図10B、10D、及び10F）を利用し、それぞれHEX（ハウスキーピング遺伝子 — HPRT-F576）及びFAMプローブにより測定したmRNAレベルを決定した。オリゴヌクレオチド210、840、852、853は、0.1nM及び1nM濃度で、マウス細胞株における3'アッセイ及び5'アッセイの両方で、80%を超えるノックダウンを示した（図10A及び10B）。全てのRNAiオリゴヌクレオチドは、0.1nM及び1nMの濃度で80%を超えるKDを示す（図10C及び10D）。オリゴヌクレオチド210、840、852、853、932は、ヒト細胞株において0.1nM及び1nMの濃度で、より強力な約90%超のKDを示す（図10E及び10F）。

【0070】

実施例5：HMGB1選択性についてのGalXC-HMGB1試験

GalNAc共役HMGB1オリゴヌクレオチドS27-AS14-M2、S33-AS20-M2、S35-AS22-M2、及びS36-AS23-M2の、HMGB1、HMGB2、及びHMGB3に対する選択性を、ヒト肝細胞で試験した。S27-AS14-M2、S33-AS20-M2、S35-AS22-M2、及びS36-AS23-M2の構造を図7に示す。GalNAc共役LDHAオリゴヌクレオチドを陽性対照とする。Huh-7細胞を、8つの異なる濃度（8時点で4倍希釈、最高濃度は1nM）の上記で示したオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。トランスフェクト後24時間、細胞を維持し、iScript RT-qPCR試料調製緩衝液を用いてRNAを単離した。HMGB1 mRNAは、TAQMAN（登録商標）をベースとするqPCRアッセイを利用して調べた。5'アッセイを利用し、それぞれHEX（ハウスキーピング遺伝子 - SFRS9）及びFAMプローブにより測定したmRNAレベルを決定した。HMGB1（図11A）、HMGB2（図11B）及びHMGB3（図11C）のIC50曲線を、mock処理に正規化して示す。試験した4種の共役体は全て、HMGB1に対して同様のIC50値を示した（図11A）。どの共役体（LDHA対照オリゴヌクレオチドを含む）も、HMGB2 mRNAレベル（図11B）又はHMGB3 mRNAレベル（図11C）に影響を及ぼさなかった。

【0071】

実施例6：材料及び方法

トランスフェクション

最初のスクリーンでは、効率的なトランスフェクションのために、リポフェクタミンRNAiMAX（商標）を使用してオリゴヌクレオチドを複合化した。オリゴヌクレオチドRNAiMAX及びOpti-MEMをプレートに添加し、トランスフェクションに先立つ

て室温で20分間インキュベートした。活発に継代する細胞のフラスコから培養液を吸引し、トリプシン存在下、37℃で3～5分間インキュベートする。細胞がフラスコに付着しなくなったら、細胞増殖培養液（ペニシリン及びストレプトマイシンを含まない）を加え、トリプシンを中和して細胞を懸濁させた。10μLのアリコートを取り出し、血球計数器で細胞数を計数し、1mm単位で細胞を定量化した。HeLa細胞では、100μLの培養液中、1ウェル当たり20,000個の細胞を播種した。この懸濁液を既知の細胞濃度で希釈し、トランスフェクションを行うための細胞数に必要な総量にした。希釈した細胞懸濁液を、オリゴヌクレオチドを含むOpti-MEMが既に入っている96ウェルのトランスフェクションプレートに添加した。その後、トランスフェクションプレートを37℃で24時間インキュベートした。24時間インキュベートした後、各ウェルから培養液を吸引した。Promega RNA Isolationキットの溶解緩衝液を用いて細胞を溶解した。溶解緩衝液を各ウェルに添加した。次いで、溶解した細胞を、RNA単離用Corbett Xtractor GENE (QIAxtractor)に移すか、又は-80℃で保存した。

10

その後のスクリーンや実験、例えば二次スクリーンでは、リポフェクタミンRNAiMAXを用いてリバーストランスフェクション用のオリゴヌクレオチドを複合化した。RNAiMAXとsiRNAとをOptiMEM培地中で15分間混合することで複合体を作製した。トランスフェクション混合物をマルチウェルプレートに移し、細胞懸濁液をウェルに添加した。24時間インキュベートした後、細胞をPBSで一回洗浄した後、Promega SV96キットの溶解緩衝液を用いて溶解した。SV96プレートを用い、真空マニホールド中でRNAを精製した。次いで4マイクロリットルの精製RNAを65℃で5分間加熱し、4℃まで冷却した。次に、High Capacity Reverse Transcriptionキット (Life Technologies社)を用い、10マイクロリットルの反応液中で、RNAを逆転写に供した。その後、cDNAをヌクレアーゼフリー水で50μLに希釈し、5'-エンドヌクレアーゼアッセイとSSoFast qPCR master mix (Bio-Rad laboratories社)とを複合化した定量的PCRに供した。

20

【0072】

cDNA合成

Corbett X-tractor Gene (商標) (QIAxtractor)を用いて、組織培養液中の哺乳類細胞からRNAを単離した。改変SuperScript IIプロトコルを使用し、単離したRNAからcDNAを合成した。単離したRNA (約5ng/μL)を65℃で5分間加熱し、dNP、ランダムヘキサマー、オリゴdT、及び水と共にインキュベートした。この混合液を15秒間冷却した。水、5倍第一鎖緩衝液、DTT、SUPERase-In (商標) (RNA阻害剤)、及びSuperScript II RTaseから成る「酵素混合物」を混合液に添加した。内容物を42℃で1時間、次いで70℃で15分間加熱した後、熱サイクラーを用いて4℃まで冷却した。次いで、得られたcDNAをSYBR (登録商標)をベースとするqPCRに供した。1反応あたり2つの5'-エンドヌクレアーゼアッセイが含まれるようにqPCR反応を複合化した。

30

40

qPCRアッセイ

初めに、SYBR (登録商標)をベースとするqPCRを利用してプライマーセットをスクリーニングした。アッセイ特異性は、「マイナスRT」対照と共に融解曲線の評価することで検証した。ヒト(Hs)及びマウス(Mm)アッセイ試験のためにそれぞれ、HeLa及びHepa1-6細胞からのcDNAテンプレートの希釈(1反応あたり20ng～0.02ngまでの10倍連続希釈)を利用する。qPCRアッセイ分析物を384ウェルプレートにセットし、MicroAmpフィルムで覆い、Applied Biosystems社製7900HTで処理した。試薬濃度及びサイクル条件としては、2倍SYBR混合物、10μMのフォワードプライマー、10μMのリバースプライマー、DDH₂O、及びcDNAテンプレートを含み、これらは総体積が10μLになるようにメス

50

アップしている。

いくつかの例では、前述のように、T A Q M A N（登録商標）をベースとする q P C R アッセイにより q P C R を行った。分析における m R N A レベルを更に確認するため、一般的に標的 m R N A（例えば、H M G B 1）のコード領域内の 2 つの異なる位置（互いに 5' 及び 3'）を標的とする T A Q M A N（登録商標）プローブを使用した。

【0073】

クローニング

メーカー説明書に従って、単一の融解曲線を示した P C R 単位複製配列を P r o m e g a 社製 p G E M（登録商標）- T E a s y ベクターキットにライゲーションした。メーカーのプロトコルに従って、J M 1 0 9 H i g h E f f i c i e n c y 細胞を、新たにライゲーションしたベクターで形質転換した。その後、アンピシリンを含む L B プレートに細胞を播種し、コロニー増殖のために 37℃で一晩インキュベートした。

10

P C R スクリーニング及びプラスミドミニプレップ

対象の、ライゲーションした単位複製配列を含むベクターで形質転換した大腸菌のコロニーを同定するために P C R を利用した。P C R 反応にはインサートに隣接するベクター特異性プライマーを使用した。次いで、染色後に、全ての P C R 生成物を 1% アガロースゲルに流し、トランスイルミネーターで画像化した。ゲルを定性評価し、どのプラスミドが、予想サイズのライゲーションした単位複製配列を含むように見えるかを判定した（約 300bp、単位複製配列及び使用したプライマーに特異的な隣接ベクター配列を含む）。次いで、P C R スクリーニングにより形質転換体であることが確認されたコロニーを、アンピシリンを含む 2 mL の L B ブロスから成る培養液中で、振盪しながら 37℃で一晩インキュベートした。その後、大腸菌細胞を溶解し、P r o m e g a 社製 M i n i - P r e p キットを用いて対象のプラスミドを単離した。プラスミド濃度は 260nm での UV 吸光度により決定した。

20

【0074】

プラスミドの配列決定及び定量

B i g D y e（登録商標）T e r m i n a t o r 配列決定キットを用いて、精製プラスミドを配列決定した。ベクター特異性プライマー T 7 を使用して、インサートにまたがる読み取り長さを得た。配列決定反応には、体積を 10 µL にした以下の試薬：水、5 倍配列決定緩衝液、B i g D y e ターミネータ混合物、T 7 プライマー、及びプラスミド（100 ng / µL）を使用した。この混合物を 96℃で 1 分間保持した後、96℃で 10 秒、50℃で 5 秒、60℃で 1 分 15 秒を 15 サイクル；96℃で 10 秒、50℃で 5 秒、60℃で 1 分 30 秒を 5 サイクル；96℃で 10 秒、50℃で 5 秒、60℃で 2 分を 5 サイクル保持した。A p p l i e d B i o s y s t e m s 社製キャピラリー電気泳動配列決定装置を用いて染色停止反応物の配列決定を行った。

30

次に、配列が検証されたプラスミドを定量した。それらプラスミドを、単一の切断制限エンドヌクレアーゼを用いて線状化した。アガロースゲル電気泳動を用いて線状性を確認した。1 mL 当たり 100 µg の t R N A を含む T E 緩衝液（pH 7.5）中で全プラスミドを希釈し、ポリプロピレン製バイアルへプラスミドが非特異的結合することを低減した。

40

次に、線状化したプラスミドを 1 µL 当たり 1,000,000 コピー数から 0.1 コピー数になるまで連続的に希釈し、q P C R に供した。アッセイ効率を計算し、効率が 90 ~ 110% の範囲であれば、アッセイは許容可能であるとした。

【0075】

複合化アッセイ

各標的について、2 つの 5' ヌクレアーゼアッセイにより m R N A レベルを定量した。一般に、各標的に対して数個のアッセイ分析物をスクリーニングする。選択した 2 つのアッセイ分析物では、高い効率、低い検出限界、対象の遺伝子（G O I）の広い 5' → 3' 範囲が組み合わさっていた。それぞれのプローブに異なるフルオロフォアを使用した場合、1 つの反応で、1 つの G O I に対して両アッセイを併用できた。このように、アッセイ確認

50

の最終段階では、選択した複数のアッセイを同じ q P C R で組み合わせた場合、又は「複合化」した場合の、選択したアッセイの効率を判定した。

10 倍希釈した両アッセイ用線状化プラスミドを組み合わせ、q P C R を実施した。各アッセイの効率を上述のように判定した。許容可能な効率範囲は 90 ~ 110 % であった。線状化プラスミド基準を利用して複合化反応を確認する一方で、テンプレートとして c D N A を用いて対象の標的に対する C_q 値も評価した。ヒト又はマウス標的には、それぞれ H e L a 及び H e p a 1 - 6 の c D N A を使用した。この場合、c D N A は、トランスフェクトしていない細胞から C o r b e t t 上に単離した R N A (水中、約 5 n g / μ L) に由来していた。このように、この試料 c D N A から観察された C_q 値は、96 ウェルプレートでのトランスフェクションから予想される C_q 値を表していた。C_q 値が 30 を超える場合、より高い対象遺伝子発現レベルを示す他の細胞株を探した。ハイスループット法によりヒト及びマウス株の各々から C o r b e t t 上に単離した総 R N A のライブラリを作成し、標的発現が許容可能なレベルであるかをスクリーニングするために使用した。

10

【0076】

オリゴヌクレオチド命名法の説明

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは全て、S N₁ - A S N₂ - M N₃ のいずれかに指定されている。以下の指定が適用される：

- N₁：センス鎖配列の配列識別子番号
- N₂：アンチセンス鎖配列の配列識別子番号
- N₃：修飾パターンの参照番号であり、各番号はオリゴヌクレオチドにおける修飾ヌクレオチドのパターンを表す。

20

例えば、S 1 - A S 1 4 - M 1 は、配列番号 1 に記載のセンス配列、及び配列番号 1 4 に記載のアンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチドを表し、修飾パターン番号 1 に適合する。

【0077】

30

40

50

【表 1】

リードHMGB1 RNA iオリゴヌクレオチド配列

センス (S) - アンチセンス (A) 指定	センス配列/mRNA配列	S配列番号	アンチセンス配列	AS配列番号
S1 - AS14	UGGGCAAAGGAGAU CCUAAA	1	UUUAGGAUCUCCUU UGCCCAGG	14
S2 - AS15	AAAGAGAAAUGAAA ACCUAA	2	UUAGGUUUUCAUUU CUCUUUGG	15
S3 - AS16	AAGAAGAUGAUGAU GAUGAA	3	UUCAUCAUCAUCAU CUUCUUGG	16
S4 - AS17	AUGAUGAUGAUGAA UAAGUA	4	UACUUAUUCAUCAU CAUCAUGG	17
S5 - AS18	GAUGAUGAAUAAGU UGGUUC	5	GAACCAACUUAUUC AUCAUCGG	18
S6 - AS19	UGAAUAAGUUGGUU CUAGCA	6	UGCUGAAGCAACU UAUUCAGG	19
S7 - AS20	AAUAAGUUGGUUCU AGCGCA	7	UGCGCUAGAACCAA CUUAUUGG	20
S8 - AS21	AUAAGUUGGUUCUA GCGCAA	8	UGCGCUAGAACCAA ACUUAUGG	21
S9 - AS22	AGAAAAAAAUUGAA AUGUAA	9	UUACAUUUCAAUUU UUUUCUGG	22
S10 - AS23	UUGUUGUUCUGUUA ACUGAA	10	UUCAGUUAACAGAA CAACAAGG	23
S11 - AS24	UUCUGAUGCUUCU AAGUAA	11	UUACUUAGAAGCAU UCAGAAGG	24
S12 - AS25	CUGAUGCUUCUAA GUAAAA	12	UUUUACUUAGAAGC AUUCAGGG	25
S13 - AS26	GAAUGCUUCUAAGU AAAUAA	13	UUAUUUACUUAGAA GCAUUCGG	26

【0078】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

修飾を加えたリード G a l N A c 共役 H M G B 1 オリゴヌクレオチド配列

G a l N A c 共役 オリ ゴヌ クレ オチ ド	センス配列 (非修飾)	センス配列 (修飾)	アンチセン ス配列 (非 修飾)	アンチセンス配列 (修 飾)
S 2 7 - A S 1 4 - M 2	UGGGC AAAGG AGAUC CUAAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 2 7)	[mUs] [mG] [mG] [m G] [mC] [mA] [mA] [fA] [fG] [fG] [fA] [mG] [mA] [mU] [mC] [mC] [mU] [mA] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l N A c] [adema - Ga l N A c] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 7 8 8)	UUUAG GAUCU CCUUU GCCCA GG (配列番号 1 4)	[MePhospho nate - 4 O - mU s] [fUs] [fU] [mA] [fG] [mG] [fA] [mU] [mC] [fU] [mC] [mC] [mU] [fU] [mU] [mG] [mC] [mC] [mC] [mAs] [mGs] [mG] (配列番号 8 1 4)
S 2 7 - A S 1 4 - M 3	UGGGC AAAGG AGAUC CUAAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 2 7)	[mUs] [mG] [fG] [m G] [mC] [mA] [mA] [fA] [mG] [fG] [mA] [fG] [fA] [mU] [mC] [mC] [fU] [mA] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l N A c] [adema - Ga l N A c] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 7 8 9)	UUUAG GAUCU CCUUU GCCCA GG (配列番号 1 4)	[MePhospho nate - 4 O - mU s] [fUs] [fU] [fA] [fG] [mG] [fA] [mU] [mC] [fU] [mC] [fC] [mU] [fU] [mU] [fG] [fC] [mC] [fC] [mAs] [mGs] [mG] (配列番号 8 1 5)
S 2 8 - A S	AAAGA GAAAU GAAAA	[mAs] [mA] [mA] [m G] [mA] [mG] [mA] [fA] [fA] [fU] [fG]	UUAGG UUUUC AUUUC	[MePhospho nate - 4 O - mU s] [fUs] [fA]

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

15 - M 2	CCUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号28)	[mA] [mA] [mA] [mA]] [mC] [mC] [mU] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l NAc c] [adema - Ga l NAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号790)	UCUUU GG (配列番号 15)	] [mG] [fG] [mU] [fU] [mU] [mU] [fC] [mA] [mU] [mU] [fU] [mC] [mU] [mC] [mU] [mU] [mUs]] [mGs] [mG] (配列番号816)
S2 8 - AS 15 - M 3	AAAGA GAAAU GAAAA CCUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号28)	[mAs] [mA] [fA] [m G] [mA] [mG] [mA] [fA] [mA] [fU] [mG]] [fA] [fA] [mA] [mA] [mC] [fC] [mU] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l NAc c] [adema - Ga l NAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号791)	UUAGG UUUUC AUUUC UCUUU GG (配列番号 15)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fA] [fG] [fG] [mU] [fU] [mU] [mU] [fC] [mA] [fU] [mU] [fU] [mC] [fU] [fC] [mU] [fU] [mUs]] [mGs] [mG] (配列番号817)
S2 9 - AS 16 - M 2	AAGAA GAUGA UGAUG AUGAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号29)	[mAs] [mA] [mG] [m A] [mA] [mG] [mA] [fU] [fG] [fA] [fU]] [mG] [mA] [mU] [mG] [mA] [mU] [mG] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l NAc c] [adema - Ga l NAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号792)	UUCAU CAUCA UCAUC UUCUU GG (配列番号 16)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fC] [mA] [fU] [mC] [fA] [mU] [mC] [fA] [mU] [mC] [mA] [fU] [mC] [mU] [mU] [mC] [mU] [mUs]] [mGs] [mG] (配列番号818)
S2 9 - AS 16 - M 3	AAGAA GAUGA UGAUG AUGAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号29)	[mAs] [mA] [fG] [m A] [mA] [mG] [mA] [fU] [mG] [fA] [mU]] [fG] [fA] [mU] [mG] [mA] [fU] [mG] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mG] [adema - Ga l N Ac] [adema - Ga l NAc c] [adema - Ga l NAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号793)	UUCAU CAUCA UCAUC UUCUU GG (配列番号 16)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fC] [fA] [fU] [mC] [fA] [mU] [mC] [fA] [mU] [fC] [mA] [fU] [mC] [fU] [fU] [mC] [fU] [mUs]] [mGs] [mG] (配列番号819)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

		] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 793)		[mGs] [mG] (配列番号 819)
S3 0- AS 17 -M 2	AUGAU GAUGA UGAAU AAGUA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 30)	[mAs] [mU] [mG] [mA] [mU] [mG] [mA] [fU] [fG] [fA] [fU] [mG] [mA] [mA] [mU] [mA] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 794)	UACUU AUUCA UCAUC AUCAU GG (配列番号 17)	[MePhosphate-4O-mUs] [fAs] [fC] [mU] [fU] [mA] [fU] [mU] [mC] [fA] [mU] [mC] [mA] [fU] [mC] [mA] [mU] [mC] [mA] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 820)
S3 0- AS 17 -M 3	AUGAU GAUGA UGAAU AAGUA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 30)	[mAs] [mU] [fG] [mA] [mU] [mG] [mA] [fU] [mG] [fA] [mU] [fG] [fA] [mA] [mU] [mA] [fA] [mG] [mU] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 795)	UACUU AUUCA UCAUC AUCAU GG (配列番号 17)	[MePhosphate-4O-mUs] [fAs] [fC] [fU] [fU] [mA] [fU] [mU] [mC] [fA] [mU] [fC] [mA] [fU] [mC] [fA] [fU] [mC] [fA] [fU] [mC] [fA] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 821)
S3 1- AS 18 -M 1	GAUGA UGAAU AAGUU GGUUA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 31)	[mGs] [mA] [fU] [mG] [fA] [mU] [mG] [fA] [fA] [fU] [fA] [mA] [fG] [mU] [fU] [mG] [fG] [mU] [mU] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 796)	GAACC AACUU AUUCA UCAUC GG (配列番号 18)	[MePhosphate-4O-mUs] [fAs] [fA] [mC] [fC] [mA] [fA] [mC] [mU] [fU] [mA] [fU] [mU] [fC] [mA] [fU] [fC] [mA] [fU] [mCs] [mGs] [mG] (配列番号 822)
S3 1- AS 18	GAUGA UGAAU AAGUU GGUUA	[mGs] [mA] [mU] [mG] [mA] [mU] [mG] [fA] [fA] [fU] [fA] [mA] [mG] [mU] [mU]	GAACC AACUU AUUCA UCAUC	[MePhosphate-4O-mUs] [fAs] [fA] [mC] [fC] [

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

- M 2	GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 31)	] [mG] [mG] [mU] [m U] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 797)	GG (配列番号 18)	mA] [fA] [mC] [mU] [fU] [mA] [mU] [mU] [fC] [mA] [mU] [mC] [mA] [mU] [mCs] [mGs] [mG] (配列番号 823)
S3 1 - AS 18 - M 3	GAUGA UGAAU AAGUU GGUUA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 31)	[mGs] [mA] [fU] [m G] [mA] [mU] [mG] [fA] [mA] [fU] [mA] [fA] [fG] [mU] [mU] [mG] [fG] [mU] [m U] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 798)	GAACC AACUU AUUCA UCAUC GG (配列番号 18)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fAs] [fA] [fC] [fC] [mA] [fA] [mC] [mU] [fU] [mA] [fU] [mU] [fC] [mA] [fU] [fC] [mA] [fU] [mCs] [mGs] [mG] (配列番号 824)
S3 2 - AS 19 - M 2	UGAAU AAGUU GGUUC UAGCA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 32)	[mUs] [mG] [mA] [m A] [mU] [mA] [mA] [fG] [fU] [fU] [fG] [mG] [mU] [mU] [mC] [mU] [mA] [mG] [m C] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 799)	UGCUA GAACC AACUU AUUCA GG (配列番号 19)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fGs] [fC] [mU] [fA] [mG] [fA] [mA] [mC] [fC] [mA] [mA] [mC] [fU] [mU] [mA] [mU] [mU] [mC] [mAs] [mGs] [mG] (配列番号 825)
S3 2 - AS 19 - M 3	UGAAU AAGUU GGUUC UAGCA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 32)	[mUs] [mG] [fA] [m A] [mU] [mA] [mA] [fG] [mU] [fU] [mG] [fG] [fU] [mU] [mC] [mU] [fA] [mG] [m C] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 799)	UGCUA GAACC AACUU AUUCA GG (配列番号 19)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fGs] [fC] [fU] [fA] [mG] [fA] [mA] [mC] [fC] [mA] [fA] [mC] [fU] [mU] [fA] [fU] [mU] [fC] [mAs] [mGs] [mG]

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

		U] [mG] [mC] (配列番号 800)		(配列番号 826)
S 3 3 - AS 20 - M 2	AAUAA GUUGG UUCUA GCGCA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 33)	[mAs] [mA] [mU] [m A] [mA] [mG] [mU] [fU] [fG] [fG] [fU] [mU] [mC] [mU] [mA] [mG] [mC] [mG] [m C] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GaIN Ac] [adema - GaINAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 801)	UGCGC UAGAA CCAAC UUAUU GG (配列番号 20)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fGs] [fC] [mG] [fC] [mU] [fA] [mG] [mA] [fA] [mC] [mC] [mA] [fA] [mC] [mU] [mU] [mA] [mU] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 827)
S 3 3 - AS 20 - M 3	AAUAA GUUGG UUCUA GCGCA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 33)	[mAs] [mA] [fU] [m A] [mA] [mG] [mU] [fU] [mG] [fG] [mU] [fU] [fC] [mU] [mA] [mG] [fC] [mG] [m C] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GaIN Ac] [adema - GaINAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 802)	UGCGC UAGAA CCAAC UUAUU GG (配列番号 20)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fGs] [fC] [fG] [fC] [mU] [fA] [mG] [mA] [fA] [mC] [fC] [mA] [fA] [mC] [fU] [fU] [mA] [fU] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 828)
S 3 4 - AS 21 - M 2	AUAAG UUGGU UCUAG CGCAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 34)	[mAs] [mU] [mA] [m A] [mG] [mU] [mU] [fG] [fG] [fU] [fU] [mC] [mU] [mA] [mG] [mC] [mG] [mC] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GaIN Ac] [adema - GaINAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 803)	UUGCG CUAGA ACCAA CUUAU GG (配列番号 21)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fG] [mC] [fG] [mC] [fU] [mA] [mG] [fA] [mA] [mC] [mC] [fA] [mA] [mC] [mU] [mU] [mA] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 829)
S 3 4 - AS 21 - M	AUAAG UUGGU UCUAG CGCAA GCAGC	[mAs] [mU] [fA] [m A] [mG] [mU] [mU] [fG] [mG] [fU] [mU] [fC] [fU] [mA] [mG] [mC] [fG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 804)	UUGCG CUAGA ACCAA CUUAU GG	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fG] [fC] [fG] [mC] [fU] [mA] [mG] [fA] [mA] [mC] [mC] [fA] [mA] [mC] [mU] [mU] [mA] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 830)

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

3	CGAAA GGCUG C (配列 番号 34)	A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 804)	(配列番号 21)	] [mG] [fA] [mA] [fC] [mC] [fA] [mA] [fC] [fU] [mU] [fA] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 830)
S3 5- AS 22 -M 1	AGAAA AAAAU UGAAA UGUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 35)	[mAs] [mG] [fA] [mA] [fA] [mA] [mA] [fA] [fA] [fU] [fU] [mG] [fA] [mA] [fA] [mU] [fG] [mU] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 805)	UUACA UUUCA AUUUU UUUCU GG (配列番号 22)	[MePhosphate-4O-mUs] [fUs] [fA] [mC] [fA] [mU] [fU] [mU] [mC] [fA] [mA] [fU] [mU] [fU] [mU] [fU] [fU] [mU] [fC] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 831)
S3 5- AS 22 -M 2	AGAAA AAAAU UGAAA UGUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 35)	[mAs] [mG] [mA] [mA] [mA] [mA] [fA] [fA] [fU] [fU] [mG] [mA] [mA] [mA] [mU] [mG] [mU] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 806)	UUACA UUUCA AUUUU UUUCU GG (配列番号 22)	[MePhosphate-4O-mUs] [fUs] [fA] [mC] [fA] [mU] [fU] [mU] [mC] [fA] [mA] [mU] [mU] [fU] [mU] [mU] [mU] [mC] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 832)
S3 5- AS 22 -M 3	AGAAA AAAAU UGAAA UGUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 35)	[mAs] [mG] [fA] [mA] [mA] [mA] [mA] [fA] [mA] [fU] [mU] [fG] [fA] [mA] [mA] [mU] [fG] [mU] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC] (配列番号 807)	UUACA UUUCA AUUUU UUUCU GG (配列番号 22)	[MePhosphate-4O-mUs] [fUs] [fA] [fC] [fA] [mU] [fU] [mU] [mC] [fA] [mA] [fU] [mU] [fU] [mU] [fU] [fU] [mU] [fC] [mUs] [mGs] [mG] (配列番号 833)

10

20

30

40

50

40

50

【表 2 - 8】

	GGCUG C (配列 番号 37)	mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 811)	24)	mG] [mC] [mA]] [fU] [mU] [mC] [mA] [mG] [mA] [mAs] [mGs] [mG] (配列番号 837)
S 3 8 - AS 25 - M 2	CUGAA UGCUU CUAAG UAAAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 38)	[mCs] [mU] [mG] [m A] [mA] [mU] [mG] [fC] [fU] [fU] [fC] [mU] [mA] [mA] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 812)	UUUUA CUUAG AAGCA UUCAG GG (配列番号 25)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fU] [mU] [fA] [mC] [fU] [mU] [mA] [fG] [mA] [mA] [mG] [fC] [mA] [mU] [mU] [mC] [mA] [mGs] [mGs] [mG] (配列番号 838)
S 3 9 - AS 26 - M 2	GAAUG CUUCU AAGUA AAUAA GCAGC CGAAA GGCUG C (配列 番号 39)	[mGs] [mA] [mA] [m U] [mG] [mC] [mU] [fU] [fC] [fU] [fA] [mA] [mG] [mU] [mA] [mA] [mA] [mU] [m A] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - GalN Ac] [adema - GalNA c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC] [m U] [mG] [mC] (配列番号 813)	UUAUU UACUU AGAAG CAUUC GG (配列番号 26)	[MePhospho nate - 4O - mU s] [fUs] [fA] [mU] [fU] [mU] [fA] [mC] [mU] [fU] [mA] [mG] [mA] [fA] [mG] [mC] [mA] [mU] [mU] [mCs] [mGs] [mG] (配列番号 839)

【0079】

10

20

30

40

50

【表 3】

RNA i オリゴヌクレオチドの修飾記号表

記号	修飾説明
a d e m A - G a l N A c	2' - アミノジエトキシメタノール - G a l N A c アデノシン
f A	2' - フルオロ - デオキシアデノシン
f A s	2' - フルオロ - デオキシアデノシン、次いでホスホロチオエート結合
f C	2' - フルオロ - デオキシシトシン
f G	2' - フルオロ - デオキシグアノシン
f G s	2' - フルオロ - デオキシグアノシン、次いでホスホロチオエート結合
f U	2' - フルオロ - ウリジン
f U s	2' - フルオロ - ウリジン、次いでホスホロチオエート結合
m A	2' - O - メチルアデノシン
m A s	2' - O - メチルアデノシン、次いでホスホロチオエート結合
m C	2' - O - メチルシトシン
m C s	2' - O - メチルシトシン、次いでホスホロチオエート結合
M e ホスホネート - 4 O - m U	メチル - 4' - O - メチルホスホネート - 2' - O - メチルウリジン
M e ホスホネート - 4 O - m U s	メチル - 4' - O - メチルホスホネート - 2' - O - メチルウリジン、次いでホスホロチオエート結合
m G	2' - O - メチルグアノシン
m G s	2' - O - メチルグアノシン、次いでホスホロチオエート結合
m U	2' - O - メチルウリジン
m U s	2' - O - メチルウリジン、次いでホスホロチオエート結合
s	ホスホロチオエート結合

10

20

30

【 0 0 8 0 】

40

50

【表 4 - 1】

RNA i オリゴヌ クレオチド	センス配列／mRNA配列	S 配列番号	アンチセンス配列	AS 配列番号
S40- AS414	AACUAAACAUGGGCAAA GGAGAUC	40	GGAUCUCCUUUGCCCAUGUU UAGUUAU	414
S41- AS415	ACUAAACAUGGGCAAAG GAAAUCC	41	AGGAUUUCCUUUGCCCAUG UUUAGUUA	415
S42- AS416	CUAAACAUGGGCAAAGG AGAUCC	42	UAGGAUCUCCUUUGCCCAUG UUUAGUU	416
S43- AS417	UAAACAUGGGCAAAGGA GAACCUAA	43	UUAGGUUCUCCUUUGCCCAU GUUUAGU	417
S44- AS418	AAACAUGGGCAAAGGAG AUACUAAG	44	CUUAGUAUCUCCUUUGCCCA UGUUUAG	418
S45- AS419	AACAUGGGCAAAGGAGA UCAUAAGA	45	UCUUAUGAUCUCCUUUGCCC AUGUUUA	419
S46- AS420	ACAUGGGCAAAGGAGAU CCAAAGAA	46	UUCUUUGGAUCUCCUUUGCC CAUGUUU	420
S47- AS421	CAUGGGCAAAGGAGAU CUAAGAAG	47	CUUCUUAGGAUCUCCUUUGC CCAUGUU	421
S48- AS422	AUGGGCAAAGGAGAUCC UAAGAAGC	48	GCUUCUUAGGAUCUCCUUU GCCCAUGU	422
S49- AS423	AAGCCGAGAGGCAAAAU GUAAUCAT	49	AUGAUUACAUUUUGCCUCU CGGCUUCU	423
S50- AS424	AGCCGAGAGGCAAAAU UCAUCATA	50	UAUGAUGACAUUUUGCCUC UCGGCUUC	424
S51- AS425	AAUGUCAUCAUAUGCA UUUUUUGT	51	ACAAUAAUGCAUAUGAUG ACAUUUUG	425

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

S52- AS426	CAUCAUAUGCAUUUUUU GUACAAAC	52	GUUUGUACAAAAAUGCAU AUGAUGAC	426
S53- AS427	AUCAUAUGCAUUUUUUUG UGAAAACT	53	AGUUUUCACAAAAAUGCA UAUGAUGA	427
S54- AS428	AUAUGCAUUUUUUUGUGC AAACUUGT	54	ACAAGUUUGCACAAAAAU GCAUAUGA	428
S55- AS429	GUCAACUUCUCAGAGUU UUUAAGA	55	UCUUUAUAAAACUCUGAGAA GUUGACUG	429
S56- AS430	AAGAAGUGCUCAGAGAG GUAGAAGA	56	UCUUCUACCUCUCUGAGCAC UUCUUAG	430
S57- AS431	AGAAGUGCUCAGAGAGG UGAAAGAC	57	GUCUUUCACCUCUCUGAGCA CUUCUUA	431
S58- AS432	GAAGUGCUCAGAGAGGU GGAAGACC	58	GGUCUUCACCUCUCUGAGC ACUUCUU	432
S59- AS433	AAGUGCUCAGAGAGGUG GAAGACCA	59	UGGUCUUCACCUCUCUGAG CACUUCU	433
S60- AS434	AGUGCUCAGAGAGGUGG AAAACCAT	60	AUGGUUUUCCACCUCUCUGA GCACUUC	434
S61- AS435	GUGCUCAGAGAGGUGGA AGACCATG	61	CAUGGUCUUCACCUCUCUG AGCACUU	435
S62- AS436	UGCUCAGAGAGGUGGAA GAACAUGT	62	ACAUGUUCUUCACCUCUCU GAGCACU	436
S63- AS437	GCUCAGAGAGGUGGAAG ACAAUGTC	63	GACAUUGUCUUCACCUCUC UGAGCAC	437
S64- AS438	CUCAGAGAGGUGGAAGA CCAUGUCT	64	AGACAUGGUCUUCACCUCU CUGAGCA	438
S65- AS439	UCAGAGAGGUGGAAGAC CAAGUCTG	65	CAGACUUGGUCUUCACCUC UCUGAGC	439
S66- AS440	CAGAGAGGUGGAAGACC AUUCUGC	66	GCAGAUUUGGUCUUCACCUC CUCUGAG	440
S67- AS441	AGAGAGGUGGAAGACCA UGACUGCT	67	AGCAGUCAUGGUCUUCACC UCUCUGA	441
S68- AS442	GAGAGGUGGAAGACCAU GUAUGCTA	68	UAGCAUACAUGGUCUUCACC CUCUCUG	442
S69- AS443	AGAGGUGGAAGACCAUG UCAGCUAA	69	UUAGCUGACAUGGUCUUC ACCUCUCU	443
S70- AS444	GAGGUGGAAGACCAUGU CUACUAAA	70	UUUAGUAGACAUGGUCUUC CACCUCUC	444
S71- AS445	AGGUGGAAGACCAUGUC UGAUAAAG	71	CUUUUUCAGACAUGGUCU CCACCUCU	445
S72- AS446	GGUGGAAGACCAUGUCU GCAAAAAGA	72	UCUUUUGCAGACAUGGUCU UCCACCUC	446
S73- AS447	GUGGAAGACCAUGUCUG CUAAAGAG	73	CUCUUUAGCAGACAUGGUC UCCACCUC	447
S74- AS448	UGGAAGACCAUGUCUGC UAAAGAGA	74	UCUCUUUAGCAGACAUGGU CUUCCACC	448
S75- AS449	GGAAGACCAUGUCUGCU AAAGAGAA	75	UUCUCUUUAGCAGACAUGG UCUCCACC	449
S76- AS450	GAAGACCAUGUCUGCUA AAAAGAAA	76	UUUCUUUUUAGCAGACAUG GUCUCCA	450
S77- AS451	AAGACCAUGUCUGCUAA AGAGAAAG	77	CUUUCUCUUUAGCAGACA GGUCUCC	451
S78- AS452	AGACCAUGUCUGCUAAA GAAAAAGG	78	CCUUUUUCUUUAGCAGACA UGGUCUUC	452

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

S79- AS453	AAAUUUGAAGAUUUGGC AAAAGCGG	79	CCGCUUUUGCCAUAUCUUA AAUUUUC	453
S80- AS454	AAUUUGAAGAUUUGGCA AAAGCGGA	80	UCCGCUUUUGCCAUAUCUUC AAUUUUU	454
S81- AS455	GAAAGAGAAAUGAAAAC CUAUAUCC	81	GGAUAUAGGUUUUCAUUUC UCUUUCAU	455
S82- AS456	AAAAAAGAAGUUAAGG AUACCAAT	82	AUUGGUUCCUUGAACUUC UUUUUUUGU	456
S83- AS457	CCCAUUGCACCCAAGAG GCAUCCTT	83	AAGGAUGCCUCUUGGGUGC AUUGGGAU	457
S84- AS458	CCAUUGCACCCAAGAGG CCACCUTC	84	GAAGGUUGCCUCUUGGGUG CAUUGGGA	458
S85- AS459	CAUUGCACCCAAGAGGC CUACUUCG	85	CGAAGUAGGCCUCUUGGGU GCAUUGGG	459
S86- AS460	AAUGCACCCAAGAGGCC UCAUUCGG	86	CCGAAUGAGGCCUCUUGGG UGCAUUGG	460
S87- AS461	AUGCACCCAAGAGGCCU CCAUCGGC	87	GCCGAUGGAGGCCUCUUGG GUGCAUUG	461
S88- AS462	UGCACCCAAGAGGCCUCC UACGGCC	88	GGCCGUAGGAGGCCUCUUG GGUGCAU	462
S89- AS463	GCACCCAAGAGGCCUCCU UAGGCCT	89	AGGCCUAAGGAGGCCUCU GGUGCAU	463
S90- AS464	CACCCAAGAGGCCUCCU CAGCCTT	90	AAGGCUGAAGGAGGCCUCU UGGGUGCA	464
S91- AS465	ACCCAAGAGGCCUCCUUC GACCUTC	91	GAAGGUCGAAGGAGGCCUC UUGGGUGC	465
S92- AS466	CCCAAGAGGCCUCCUUCG GACUUCT	92	AGAAGUCCGAAGGAGGCCU CUUGGGUG	466
S93- AS467	CCAAGAGGCCUCCUUCG GCAUUCTT	93	AAGAAUGCCGAAGGAGGCC UCUUGGGU	467
S94- AS468	CAAGAGGCCUCCUUCGG CCAUCUTC	94	GAAGAUGGCCGAAGGAGGC CUCUUGG	468
S95- AS469	AAGAGGCCUCCUUCGGC CUACUUC	95	GGAAGUAGGCCGAAGGAGG CCUCUUG	469
S96- AS470	AGAGGCCUCCUUCGGCC UUAUUCCT	96	AGGAAUAAGGCCGAAGGAG GCCUCUUG	470
S97- AS471	GAGGCCUCCUUCGGCCU UCAUCCTC	97	GAGGAUGAAGGCCGAAGGA GGCCUCU	471
S98- AS472	AGGCCUCCUUCGGCCUUC UACCUCT	98	AGAGGUAGAAGGCCGAAGG AGGCCUCU	472
S99- AS473	GGCCUCCUUCGGCCUUCU UACUCTT	99	AAGAGUAAGAAGGCCGAAG GAGGCCUC	473
S100- AS474	GCCUCCUUCGGCCUUCU CAUCUTC	100	GAAGAUGAAGAAGGCCGAA GGAGGCCU	474
S101- AS475	GGAAUAACACUGCUGCA GAAGACAA	101	UUGUCUUCUGCAGCAGUGU UAUUCCAC	475
S102- AS476	GAUGACAAGCAGCCUUA UGAAAAGA	102	UCUUUUAUAAGGCGUCU GUCAUCUG	476
S103- AS477	GGAUAUUGCUGCAUAUC GAACUAAA	103	UUUAGUUCGAUAUGCAGCA AUAUCCU	477
S104- AS478	AGCAAGAAAAAGAAGGA AGAGGAGG	104	CCUCCUCUCCUUCUUUUUC UUGCUUU	478
S105- AS479	GCAAGAAAAAGAAGGAA GAAGAGGA	105	UCCUCUUCUCCUUCUUUUU CUUGCUU	479

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

S106- AS480	CAAGAAAAAGAAGGAAG AGAAGGAA	106	UCCUUCUCUCCUUCUUUU UCUUGCU	480
S107- AS481	AAGAAAAAGAAGGAAGA GGAGGAAG	107	CUCCUCCUCUCCUUCUUU UUCUUGC	481
S108- AS482	AGAAAAAGAAGGAAGAG GAAGAAGA	108	UCUUCUCCUCUCCUUCUU UUUCUUG	482
S109- AS483	GAAGAAGAUGAUGAUGA UGAAUAAAG	109	CUUAUUCAUCAUCAUCU UCUUCUU	483
S110- AS484	GAUGAUGAUGAUGAAUA AGAUGGTT	110	AACCAUCUUAUUCAUCAU UCAUCUU	484
S111- AS485	GAUGAUGAUGAAUAAGU UGAUUCTA	111	UAGAAUCAACUUAUUCAU AUCAUCAU	485
S112- AS486	AUGAUGAUGAAUAAGUU GGAUCUAG	112	CUAGAUGCAACUUAUUCAU AUCAUCA	486
S113- AS487	GAUGAAUAAGUUGGUUC UAACGCAG	113	CUGCGUAGAACCAACUUA UUCAUCAU	487
S114- AS488	UGAAUAAGUUGGUUCUA GCACAGTT	114	AACUGUGCUAGAACCAACU UAUUCAU	488
S115- AS489	GAAUAAGUUGGUUCUAG CGAAGUTT	115	AAACUUCGCUAGAACCAACU UAUUCAU	489
S116- AS490	AAUAAGUUGGUUCUAGC GCAGUUTT	116	AAAACUGCGCUAGAACCAAC UUAUUA	490
S117- AS491	AUAAGUUGGUUCUAGCG CAAUUUTT	117	AAAAUUGCGCUAGAACCA ACUUAUUC	491
S118- AS492	UAAGUUGGUUCUAGCGC AGAUUUTT	118	AAAAAUCUGCGCUAGAACC AACUUAUU	492
S119- AS493	AAGUUGGUUCUAGCGCA GUAUUUTT	119	AAAAUACUGCGCUAGAACC CAACUUAU	493
S120- AS494	UUUUUCUUGUCUAUAAA GCAUUUAA	120	UUAAAUGCUUUAUAGACAA GAAAAAAA	494
S121- AS495	UUUUCUUGUCUAUAAAAG CAAUUAAC	121	GUAAAUGCUUUAUAGACA AGAAAAAA	495
S122- AS496	UUUCUUGUCUAUAAAAGC AUUAUACC	122	GGUUAUAGCUUUAUAGAC AAGAAAAA	496
S123- AS497	UUCUUGUCUAUAAAAGCA UUAAAACCC	123	GGGUUAAUAGCUUUAUAGA CAAGAAAA	497
S124- AS498	UCUUGUCUAUAAAAGCAU UUAACCCC	124	GGGUUAAUAGCUUUAUAG ACAAGAAA	498
S125- AS499	CAACUCACUCCUUUUAA AGAAAAAA	125	UUUUUUCUUUAAAAGGAGU GAGUUGUG	499
S126- AS500	AACUCACUCCUUUUAAA GAAAAAAA	126	UUUUUUUCUUUAAAAGGAG UGAGUUGU	500
S127- AS501	ACUCACUCCUUUUAAAG AAAAAAAT	127	AUUUUUUCUUUAAAAGGA GUGAGUUG	501
S128- AS502	CUCACUCCUUUUAAAGA AAAAAATT	128	AAUUUUUUCUUUAAAAGG AGUGAGUU	502
S129- AS503	UCACUCCUUUUAAAGAA AAAAAUTG	129	CAUUUUUUCUUUAAAAG GAGUGAGU	503
S130- AS504	CACUCCUUUUAAAGAAA AAAAUUGA	130	UCAUUUUUUCUUUAAA GGAGUGAG	504
S131- AS505	ACUCCUUUUAAAGAAAA AAAUUGAA	131	UUCAAUUUUUUCUUUAAA AGGAGUGA	505
S132- AS506	CUCCUUUUAAAGAAAA AAAUUGAA	132	UUUCAUUUUUUCUUUAA AAGGAGUG	506

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

S133- AS507	UCCUUUUAAAAGAAAAAA AUAGAAAT	133	AUUUCUAUUUUUUUCUUUA AAAGGAGU	507
S134- AS508	CCUUUUAAAAGAAAAAA UUAAAATG	134	CAUUUUAAUUUUUUUCUUU AAAAGGAG	508
S135- AS509	CUUUUAAAAGAAAAAAU UGAAAUGT	135	ACAUUUCAAUUUUUUUCUU UAAAAGGA	509
S136- AS510	UUUUAAAAGAAAAAAU GAAAUGTA	136	UACAUUCAAUUUUUUUCU UUAAAAGG	510
S137- AS511	UUUAAAAGAAAAAAUUG AAAUGUAA	137	UUACAUUCAAUUUUUUUC UUUAAAAG	511
S138- AS512	UUAAAAGAAAAAAUUGA AAAGUAAG	138	CUUACUUUCAAUUUUUUU CUUUAAAA	512
S139- AS513	UAAAGAAAAAAAUUGAA AUUAUAGG	139	CCUUAUUAUUCAAUUUUU UCUUUAAA	513
S140- AS514	AAAGAAAAAAAUUGAAA UGAAAGGC	140	GCCUUUCAUUUCAAUUUU UUCUUUAA	514
S141- AS515	GAAAAAAAUUGAAAUGU AAAGCUGT	141	ACAGCUUUACAUUUCAUU UUUUUCUU	515
S142- AS516	AAAAAAAUUGAAAUGUA AGACUGTG	142	CACAGUCUUACAUUUCAU UUUUUCU	516
S143- AS517	GUAAGAUUUGUUUUUAA ACAGUACA	143	UGUACUGUUUAAAAACAAA UCUUACAC	517
S144- AS518	UAAGAUUUGUUUUUAAA CUAUACAG	144	CUGUAUAGUUUAAAAACAA AUCUUACA	518
S145- AS519	AAGAUUUGUUUUUAAAC UGAACAGT	145	ACUGUUCAGUUUAAAAACA AAUCUUAC	519
S146- AS520	AUUUGUUUUUAAACUGU ACAGUGTC	146	GACACUGUACAGUUUAAAA ACAAAUCU	520
S147- AS521	UUGUUUUUAAACUGUAC AGAGUCTT	147	AAGACUCUGUACAGUUUAA AAACAAAU	521
S148- AS522	UGUUUUUAAACUGUACA GUAUCUTT	148	AAAGAUACUGUACAGUUUA AAAACAAA	522
S149- AS523	GUUUUUUAAACUGUACAG UGACUUTT	149	AAAAGUCACUGUACAGUUU AAAAACAA	523
S150- AS524	UUUUUAAACUGUACAGU GUAUUUTT	150	AAAAUACACUGUACAGUU UAAAAACA	524
S151- AS525	UUUUUAAACUGUACAGUG UCAUUUTT	151	AAAAUAGACACUGUACAGU UUAAAAAC	525
S152- AS526	UUUAAACUGUACAGUGU CUAUUUTT	152	AAAAUAGACACUGUACAG UUUAAAAA	526
S153- AS527	UUAAACUGUACAGUGUC UUAUUUTG	153	CAAAUUAAGACACUGUACA GUUUAAAA	527
S154- AS528	UAAACUGUACAGUGUCU UUAUUUGT	154	ACAAUUAAGACACUGUAC AGUUUAAA	528
S155- AS529	AAACUGUACAGUGUCUU UUAUUUGTA	155	UACAAUUAAGACACUGUA CAGUUUAA	529
S156- AS530	AACUGUACAGUGUCUUU UUAUGUAT	156	AUACAUAAAAAGACACUGU ACAGUUUA	530
S157- AS531	ACUGUACAGUGUCUUUU UUAGUATA	157	UAUACUAAAAAGACACUG UACAGUUU	531
S158- AS532	CUGUACAGUGUCUUUUU UUAUAUAG	158	CUAUUAUAAAAAGACACU GUACAGUU	532
S159- AS533	UGUACAGUGUCUUUUUU UGAAUAGT	159	ACUAUUCAAAAAAGACAC UGUACAGU	533

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

S160- AS534	UACAGUGUCUUUUUUUG UAAAGUTA	160	UAACUUUACAAAAAAGAC ACUGUACA	534
S161- AS535	CAGUGUCUUUUUUUGUA UAAUUAAC	161	GUUAAUUUACAAAAAAG ACACUGUA	535
S162- AS536	GUGGUUUUUUCAAUAGC CAAUAACC	162	GGUUUUUGGCUAUUGAAAA UACCACCA	536
S163- AS537	UGGUUUUUUCAAUAGCC ACAAACCT	163	AGGUUUUGGCUAUUGAAA AUACCACC	537
S164- AS538	GGUUUUUUCAAUAGCCA CUAACCTT	164	AAGGUUAGUGGCUAUUGAA AAUACCAC	538
S165- AS539	UAUUUUCAAUAGCCACU AAACUUGC	165	GCAAGUUUAGUGGCUAUUG AAAAUACC	539
S166- AS540	AUUUUCAAUAGCCACUA ACAUUGCC	166	GGCAAUGUUAGUGGCUAUU GAAAAUAC	540
S167- AS541	UUUUCAAUAGCCACUAA CCAUGCCT	167	AGGCAUGGUUAGUGGCUAU UGAAAAUA	541
S168- AS542	UUUCAAUAGCCACUAAC CUAGCCTG	168	CAGGCUAGGUUAGUGGCUA UUGAAAAU	542
S169- AS543	UUCAAUAGCCACUAACC UUACCUGG	169	CCAGGUAAGGUUAGUGGCU AUUGAAAA	543
S170- AS544	UCAAUAGCCACUAACCU UGACUGGT	170	ACCAGUCAAGGUUAGUGGC UAUUGAAA	544
S171- AS545	CAAUAGCCACUAACCUU GCAUGGTA	171	UACCAUGCAAGGUUAGUGG CUAUUGAA	545
S172- AS546	AAUAGCCACUAACCUUG CCAGGUAC	172	GUACCUGGCAAGGUUAGUG GCUAUUGA	546
S173- AS547	AUAGCCACUAACCUUGC CUAGUACA	173	UGUACUAGGCAAGGUUAGU GGCUAUUG	547
S174- AS548	UAGCCACUAACCUUGCC UGAUACAG	174	CUGUAUCAGGCAAGGUUAG UGGCUAUU	548
S175- AS549	AGCCACUAACCUUGCCU GGAACAGT	175	ACUGUUCAGGCAAGGUUA GUGGCUAU	549
S176- AS550	GCCACUAACCUUGCCUG GUACAGTA	176	UACUGUACCAGGCAAGGUU AGUGGCUA	550
S177- AS551	CCACUAACCUUGCCUGG UAAAGUAT	177	AUACUUUACCAGGCAAGGU UAGUGGCU	551
S178- AS552	CACUAACCUUGCCUGGU ACAGUATG	178	CAUACUGUACCAGGCAAGG UUAGUGGC	552
S179- AS553	ACUAACCUUGCCUGGUA CAUAUUGG	179	CCAUUUUUGUACCAGGCAAG GUUAGUGG	553
S180- AS554	GGGUUGUAAAUUGGCAU GGAAAUTT	180	AAAUUUCCAUGCCAAUUUA CAACCCCC	554
S181- AS555	GGUUGUAAAUUGGCAUG GAAAUUTA	181	UAAAUUUCCAUGCCAAUUU ACAACCCC	555
S182- AS556	GUUGUAAAUUGGCAUGG AAAUUUUA	182	UUAAAUUUCCAUGCCAAUU UACAACCC	556
S183- AS557	UUGUAAAUUGGCAUGGA AAAUUUAA	183	UUUAAUUUUCCAUGCCAAU UUACAACC	557
S184- AS558	UGUAAAUUGGCAUGGAA AUUAAAG	184	CUUUUAUUUUCCAUGCCAA UUUACAAC	558
S185- AS559	GUAAAUUGGCAUGGAAA UUAAAAGC	185	GCUUUUAAUUUUCCAUGCCA AUUUACAA	559
S186- AS560	UAAAUUGGCAUGGAAAU UUAAAGCA	186	UGCUUUAAAUUUCCAUGCC AAUUUACA	560

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

S187- AS561	AAAUUGGCAUGGAAAUU UAAAGCAG	187	CUGCUUUAAAUUCCAUGCC AAUUUAC	561
S188- AS562	AAUUGGCAUGGAAAUUU AAAGCAGG	188	CCUGCUUUAAAUUCCAUGC CAAUUUA	562
S189- AS563	AUUGGCAUGGAAAUUUA AAACAGGT	189	ACCUGUUUUAAAUUCCA GCCAAUUU	563
S190- AS564	UUGGCAUGGAAAUUUA AGAAGGTT	190	AACCUUCUUUAAAUUCCA UGCCAAUU	564
S191- AS565	UGGCAUGGAAAUUUA GCAGGUTC	191	GAACCUUCUUUAAAUUCC AUGCCAAU	565
S192- AS566	GGCAUGGAAAUUUAAG CAAGUUCT	192	AGAACUUGCUUUAAAUUUC CAUGCCAA	566
S193- AS567	GCAUGGAAAUUUAAGC AGAUUCTT	193	AAGAAUCUGCUUUAAAUUU CCAUGCCA	567
S194- AS568	CAUGGAAAUUUAAGCA GGAUCUTG	194	CAAGAUCUGCUUUAAAUU UCCAUGCC	568
S195- AS569	AUGGAAAUUUAAGCAG GUACUUGT	195	ACAAGUACCUUCUUUAAAU UCCAUGC	569
S196- AS570	UGGAAAUUUAAGCAGG UUAUUGTT	196	AACAUAACCUUCUUUAAAU UUCCAUG	570
S197- AS571	GGAAAUUUAAGCAGGU UCAUGUTG	197	CAACAUGAACCUUCUUUAA AUUCCA	571
S198- AS572	GAAAUUUAAGCAGGUU CUAGUUGG	198	CCAACUAGAACCUUCUUUAA AUUCCA	572
S199- AS573	AAAUUUAAGCAGGUUC UUAUUGGT	199	ACCAUAAGAACCUUCUUU AAAUUCC	573
S200- AS574	AAUUUAAGCAGGUUCU UGAUGGTG	200	CACCAUCAAGAACCUUCUUU AAAUUUC	574
S201- AS575	AUUUAAGCAGGUUCUU GUAGGUGC	201	GCACCUACAAGAACCUUCUU UAAAUUU	575
S202- AS576	UUUAAGCAGGUUCUUG UUAGUGCA	202	UGCACUAACAAGAACCUUCU UUAAAUU	576
S203- AS577	UUAAAGCAGGUUCUUGU UGAUGCAC	203	GUGCAUCAACAAGAACCUUC UUUAAAU	577
S204- AS578	UAAAGCAGGUUCUUGUU GGAGCACA	204	UGUGCUCCAACAAGAACCUG CUUUAAA	578
S205- AS579	AAAGCAGGUUCUUGUUG GUACACAG	205	CUGUGUACCAACAAGAACCU GCUUUAA	579
S206- AS580	AAGCAGGUUCUUGUUGG UGAACAGC	206	GCUGUUCACCAACAAGAACC UGCUUUA	580
S207- AS581	AGCAGGUUCUUGUUGGU GCACAGCA	207	UGCUGUGCACCAACAAGAAC CUGCUUU	581
S208- AS582	GCAGGUUCUUGUUGGUG CAAAGCAC	208	GUGCUUUGCACCAACAAGA ACCUGCUU	582
S209- AS583	CAGGUUCUUGUUGGUGC ACAGCACA	209	UGUGCUGUGCACCAACAAG AACCUGCU	583
S210- AS584	AGGUUCUUGUUGGUGCA CAACACAA	210	UUGUGUUGUGCACCAACAA GAACCUGC	584
S211- AS585	GGUUCUUGUUGGUGCAC AGAACAAA	211	UUUGUUCUGUGCACCAACA AGAACCUG	585
S212- AS586	GUUCUUGUUGGUGCACA GCACAAAT	212	AUUUGUGCUGUGCACCAAC AAGAACC	586
S213- AS587	UUCUUGUUGGUGCACAG CAAAAATT	213	AAUUUUUGCUGUGCACCA CAAGAACC	587

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

S214- AS588	UCUUGUUGGUGCACAGC ACAAAUTA	214	UAAUUUGUGCUGGCACCA ACAAGAAC	588
S215- AS589	CUUGUUGGUGCACAGCA CAAAUUAAG	215	CUAAUUUGUGCUGGCACC AACAAGAA	589
S216- AS590	UUGUUGGUGCACAGCAC AAAUUAGT	216	ACUAAUUUGUGCUGGCAC CAACAAGA	590
S217- AS591	UGUUGGUGCACAGCACA AAAUAGTT	217	AACUAAUUUGUGCUGGCA CCAACAAG	591
S218- AS592	GUUGGUGCACAGCACAA AUAAGUTA	218	UAACUUAUUUGUGCUGGC ACCAACAA	592
S219- AS593	UUGGUGCACAGCACAAA UUAGUUAT	219	AUAACUAAUUUGUGCUGUG CACCAACA	593
S220- AS594	UGGUGCACAGCACAAAU UAAUUATA	220	UAUAAUUAAUUUGUGCUGU GCACCAAC	594
S221- AS595	GGUGCACAGCACAAAUU AGAUUAUT	221	AUAUAUCUAAUUUGUGCUG UGCACCAA	595
S222- AS596	UUUUUUAUCUUCAGUU GUAUCUGA	222	UCAGAUACAACUGAAGAUG AAAAAACU	596
S223- AS597	UUUUUAUCUUCAGUUG UCACUGAT	223	AUCAGUGACAACUGAAGAU GAAAAAAC	597
S224- AS598	UUUUAUCUUCAGUUGU CUAUGATG	224	CAUCAUAGACAACUGAAGA UGAAAAAA	598
S225- AS599	UUUCAUCUUCAGUUGUC UCAGAUGC	225	GCAUCUGAGACAACUGAAG AUGAAAAA	599
S226- AS600	UUCAUCUUCAGUUGUCU CUAAUGCA	226	UGCAUUAGAGACAACUGAA GAUGAAAA	600
S227- AS601	UCAUCUUCAGUUGUCUC UGAUGCAG	227	CUGCAUCAGAGACAACUGA AGAUGAAA	601
S228- AS602	CAUCUUCAGUUGUCUCU GAAGCAGC	228	GCUGCUUCAGAGACAACUG AAGAUGAA	602
S229- AS603	AUCUUCAGUUGUCUCUG AUACAGCT	229	AGCUGUAUCAGAGACAACU GAAGAUGA	603
S230- AS604	UCUGAUGCAGCUUAUAC GAAUAAT	230	AUUUUUUCGUUAUAGCUGC AUCAGAGA	604
S231- AS605	CUGAUGCAGCUUAUACG AAAUAAAT	231	AAUUUUUCGUUAUAGCUG CAUCAGAG	605
S232- AS606	CAGCUUAUACGAAAUAA UUAUUGTT	232	AACAAUAAUUAUUUCGUU AAGCUGCA	606
S233- AS607	AGCUUAUACGAAAUAAU UGAUGUTC	233	GAACAUCAAUUUUUCGUA UAAGCUGC	607
S234- AS608	GCUUAUACGAAAUAAUU GUAGUUCT	234	AGAACUACAUUUAUUUCGU AUAAGCUG	608
S235- AS609	CUUAUACGAAAUAAUUG UUAUUCTG	235	CAGAAUAAUUAUUUUCG UAUAAGCU	609
S236- AS610	UAUACGAAAUAAUUGUU GUACUGTT	236	AACAGUACAACAAUUAUU CGUAUAAG	610
S237- AS611	AUACGAAAUAAUUGUUG UUAUGUTA	237	UAACUAACAACAAUUAUU UCGUUAUA	611
S238- AS612	UACGAAAUAAUUGUUGU UCAGUUAU	238	UUAACUGAACAACAAUUAU UUCGUUAU	612
S239- AS613	ACGAAAUAAUUGUUGUU CUAUUAAC	239	GUUAAUAGAACAACAAUUA UUUCGUUA	613
S240- AS614	CGAAAUAAUUGUUGUUC UGAUAACT	240	AGUUAUCAGAACAACAAUU AUUUCGUA	614

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

S241- AS615	GAAUAAUUGUUGUUCU GUAAACTG	241	CAGUUUACAGAACAACAAU UAUUUCGU	615
S242- AS616	AAAUAAUUGUUGUUCUG UUAACUGA	242	UCAGUUAACAGAACAACAA UUUUUUCG	616
S243- AS617	AAUAAUUGUUGUUCUGU UAAACUGAA	243	UUCAGUUAACAGAACAACA AUUUUUUC	617
S244- AS618	AAUUGUUGUUCUGUUA CUAAAUAC	244	GUUUUUAGUUAACAGAACA ACAAUUUAU	618
S245- AS619	AUUGUUGUUCUGUUAAC UGAAUACC	245	GGUAUUCAGUUAACAGAAC AACAAUUA	619
S246- AS620	UGUUGUUCUGUUAACUG AAAACCAC	246	GUGGUUUUCAGUUAACAGA ACAACAAU	620
S247- AS621	GUUGUUCUGUUAACUGA AUACCACT	247	AGUGGUUUUCAGUUAACAG ACAACAA	621
S248- AS622	UGUUCUGUUAACUGAAU ACAACUCT	248	AGAGUUGUAUUCAGUUAAC AGAACAAC	622
S249- AS623	UCUGUUAACUGAAUACC ACACUGTA	249	UACAGUGUGGUUAUUCAGUU AACAGAAC	623
S250- AS624	CUGUUAACUGAAUACCA CUAUGUAA	250	UUACAUAGUGGUUAUUCAGU UACAGAA	624
S251- AS625	GUUAACUGAAUACCACU CUAUAATT	251	AAUUUAUAGAGUGGUUAUCA GUUAACAG	625
S252- AS626	AACUGAAUACCACUCUG UAAUUGCA	252	UGCAUUUACAGAGUGGUUAU UCAGUUA	626
S253- AS627	ACUGAAUACCACUCUGU AAAUGCAA	253	UUGCAUUUACAGAGUGGUA UUCAGUUA	627
S254- AS628	CUGAAUACCACUCUGUA AUAGCAAA	254	UUUGCUAUUACAGAGUGGU AUUCAGUU	628
S255- AS629	UGAAUACCACUCUGUAA UUACAAAA	255	UUUUGUAAUUACAGAGUGG UAUUCAGU	629
S256- AS630	GAAUACCACUCUGUAAU UGAAAAAA	256	UUUUUUCAAUUACAGAGUG GUAUUCAG	630
S257- AS631	AAUACCACUCUGUAAUU GCAAAAAA	257	UUUUUUUGCAAUUACAGAGU GGUAUUCA	631
S258- AS632	AAAAAGUUGCAGCUGUU UUUUUGAC	258	GUCAAUAAAACAGCUGCAA CUUUUUUU	632
S259- AS633	AAAGUUGCAGCUGUUUU GUAGACAT	259	AUGUCUACAAAACAGCUGC AACUUUUU	633
S260- AS634	AAGUUGCAGCUGUUUUUG UUAACATT	260	AAUGUUAACAAAACAGCUG CAACUUUU	634
S261- AS635	AGUUGCAGCUGUUUUUGU UGACAUTC	261	GAAUGUCAACAAAACAGCU GCAACUUU	635
S262- AS636	GUUGCAGCUGUUUUUGUU GAAAUUCT	262	AGAAUUUCAACAAAACAGC UGCAACUU	636
S263- AS637	UGCAGCUGUUUUUGUUGA CAAUCUGA	263	UCAGAUUGUCAACAAAACA GCUGCAAC	637
S264- AS638	GCAGCUGUUUUUGUUGAC AUACUGAA	264	UUCAGUAUGUCAACAAAAC AGCUGCAA	638
S265- AS639	CAGCUGUUUUUGUUGACA UUAUGAAT	265	AUUCAUAAUGUCAACAAA CAGCUGCA	639
S266- AS640	AGCUGUUUUUGUUGACAU UCAGAATG	266	CAUUCUGAAUGUCAACAAA ACAGCUGC	640
S267- AS641	GCUGUUUUUGUUGACAUU CUAAAUUGC	267	GCAUUUAGAAUGUCAACAA AACAGCUG	641

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 0】

S268- AS642	UGUUUUGUUGACAUUCU GAAUGCTT	268	AAGCAUUCAGAAUGUCAAC AAAACAGC	642
S269- AS643	UUUGUUGACAUUCUGAA UGAUUCTA	269	UAGAAUCAUUCAGAAUGUC AACAAAAC	643
S270- AS644	UUUGUUGACAUUCUGAAU GCAUCUAA	270	UUAGAUGCAUUCAGAAUGU CAACAAAA	644
S271- AS645	UGUUGACAUUCUGAAUG CUACUAAG	271	CUUAGUAGCAUUCAGAAUG UCAACAAA	645
S272- AS646	GUUGACAUUCUGAAUGC UUAUAAAGT	272	ACUUUAUAGCAUUCAGAAU GUCAACAA	646
S273- AS647	UUGACAUUCUGAAUGCU UCAAAGTA	273	UACUUUGAAGCAUUCAGAA UGUCAACA	647
S274- AS648	UGACAUUCUGAAUGCUU CUAAGUAA	274	UUACUUAGAAGCAUUCAGA AUGUCAAC	648
S275- AS649	GACAUUCUGAAUGCUUC UAAGUAAA	275	UUUACUUAGAAGCAUUCAG AAUGUCA	649
S276- AS650	CAUUCUGAAUGCUUCUA AGAAAATA	276	UAUUUUCUUAGAAGCAUUC AGAAUGUC	650
S277- AS651	AUUCUGAAUGCUUCUAA GUAAAUAC	277	GUUUUACUUAGAAGCAUUC CAGAAUGU	651
S278- AS652	UCUGAAUGCUUCUAAAGU AAAUACAA	278	UUGUAUUUACUUAGAAGCA UUCAGAAU	652
S279- AS653	UGAAUGCUUCUAAAGUAA AUACAATT	279	AAUUGUAUUUACUUAGAAG CAUUCAGA	653
S280- AS654	AAUGCUUCUAAAGUAAA ACAAUUTT	280	AAAAUUGUAUUUACUUAGA AGCAUUCA	654
S281- AS655	AUGCUUCUAAAGUAAAUA CAAUUUTT	281	AAAAUUGUAUUUACUUAG AAGCAUUC	655
S282- AS656	GCUUCUAAAGUAAAUACA UAUUUUTT	282	AAAAUUAUUGUAUUUACUU AGAAGCAU	656
S283- AS657	UUUUUAUUGUAUUGUU GUACUUTT	283	AAAAGUACAACAAUACUAA UAAAAAA	657
S284- AS658	UUUUUAUUGUAUUGUUG UCAUUTC	284	GAAAAUGACAACAAUACUA AUAAAAA	658
S285- AS659	UUUAUUGUAUUGUUGU CCAUUUCA	285	UGAAUUGGACAACAAUACU AAUAAAA	659
S286- AS660	UUUAUUGUAUUGUUGUC CUAUUCAT	286	AUGAAUAGGACAACAAUAC UAAUAAAA	660
S287- AS661	UAUUAGUAUUGUUGUCC UUAUCATA	287	UAUGAUAGGACAACAAUA CUAAUAAA	661
S288- AS662	AUUAGUAUUGUUGUCCU UUACAUAG	288	CUAUGUAAAAGGACAACAAU ACUAAUAA	662
S289- AS663	UUAGUAUUGUUGUCCUU UUAAUAGG	289	CCUAUUAAAAGGACAACAA UACUAAUA	663
S290- AS664	UAGUAUUGUUGUCCUUU UCAUAGGT	290	ACCUAUGAAAAGGACAACA AUACUAAU	664
S291- AS665	GUUUUGUUGUCCUUUUC AUAGGUCT	291	AGACCUAUGAAAAGGACAA CAAUACUA	665
S292- AS666	UUGUUGUCCUUUUCAU GGACUGAA	292	UUCAGUCCUAUGAAAAGGA CAACAAUA	666
S293- AS667	UGUUGUCCUUUUCAUAG GUAUGAAA	293	UUUCAUACCUAUGAAAAGG ACAACAAU	667
S294- AS668	UUGUCCUUUUCAUAGGU CUAAAATT	294	AAUUUUAGACCUAUGAAAA GGACAACA	668

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

S295- AS669	UGUCCUUUUCAUAGGUC UGAAAUUTT	295	AAAUUUCAGACCUAUGAAA AGGACAAC	669
S296- AS670	GUCCUUUUCAUAGGUCU GAAAUUTT	296	AAAAUUUCAGACCUAUGAA AAGGACAA	670
S297- AS671	UCCUUUUCAUAGGUCUG AAAUUUTT	297	AAAAUUUCAGACCUAUGA AAAGGACA	671
S298- AS672	CCUUUUCAUAGGUCUGA AAAUUUTC	298	GAAAAUUUCAGACCUAUG AAAAGGAC	672
S299- AS673	AUAGGUCUGAAAUUUUU CUACUUGA	299	UCAAGUAGAAAAUUUCAG ACCUAUGA	673
S300- AS674	AGGGGAAGCUAGUCUUU UGAUUUTG	300	CAAAAUCAAAAGACUAGCU UCCCCUCA	674
S301- AS675	GGGGAAGCUAGUCUUUU GCAUUUGC	301	GCAAAUGCAAAAGACUAGC UUCCCCUC	675
S302- AS676	GGGAAGCUAGUCUUUUG CUAUUGCC	302	GGCAAUAGCAAAAGACUAG CUUCCCCU	676
S303- AS677	GGAAGCUAGUCUUUUGC UUAUGCCC	303	GGGCAUAAGCAAAAGACUA GCUUCCCC	677
S304- AS678	GAAGCUAGUCUUUUGCU UUAGCCCA	304	UGGGCUAAAAGCAAAAGACU AGCUUCCC	678
S305- AS679	CAGUGUUUAUCCUUUCA UAAAGUTA	305	UAACUUUAUGAAAGGAUAA ACACUGUA	679
S306- AS680	GUGUUUAUCCUUUCAUA UAAUUAGC	306	GCUAAUUUAUGAAAGGAU AAACACUG	680
S307- AS681	UUAUCCUUUCAUAUAGU UAACUAAT	307	AUUAGUUAAACUAUAUGAAA GGAUAAAC	681
S308- AS682	GCUAAUAAAAAGCUUUU GUUAACAC	308	GUGUAUACAAAAGCUUUUU AUUAGCUA	682
S309- AS683	GUAAAGUUAAGUUGAGA UAAUUUTC	309	GAAAAUUUUCUCAACUUAA CUUUACCC	683
S310- AS684	AAAGUUAAGUUGAGAU GUAUUCAT	310	AUGAAUACUAUCUCAACUU AACUUUAC	684
S311- AS685	GUUAAGUUGAGAUAGUU UUAUCCA	311	UGGAUUAAAACUAUCUCAA CUUAACUU	685
S312- AS686	UAAGUUGAGAUAGUUUU CAACCATA	312	UAUGGUUGAAAACUAUCUC AACUUAAAC	686
S313- AS687	AAGUUGAGAUAGUUUUC AUACAUAA	313	UUAUGUAUGAAAACUAUCU CAACUUAA	687
S314- AS688	AGUUGAGAUAGUUUUCA UCAUAAC	314	GUUAUUGAUGAAAACUAUC UCAACUUA	688
S315- AS689	GUUGAGAUAGUUUUCAU CCAUAAC	315	AGUUAUGGAUGAAAACUAU CUCAACUU	689
S316- AS690	UGAGAUAGUUUUCAUCC AUAACUGA	316	UCAGUUUUGGAUGAAAACU AUCUCAAC	690
S317- AS691	GAGAUAGUUUUCAUCCA UAACUGAA	317	UUCAGUUUUGGAUGAAAAC UAUCUCAA	691
S318- AS692	AGAUAGUUUUCAUCCA AAAUGAAC	318	GUUCAUUUUGGAUGAAAA CUAUCUCA	692
S319- AS693	GUUUUCAUCCAUAACUG AAAAUCCA	319	UGGAUUUUCAGUUUUGGAU GAAAACUA	693
S320- AS694	UUCAUCCAUAACUGAAC AUACAAAA	320	UUUUGUAUGUUCAGUUUUG GAUGAAAA	694
S321- AS695	UUGAUCAGUUAAGAAAU UUAACATA	321	UAUGUUAAAUTUCUUAACU GAUCAAGA	695

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

S322- AS696	GAUCAGUUAAGAAUUU CAAAUAGC	322	GCUAUUUGAAAUUUCUAA CUGAUCAA	696
S323- AS697	CAUUUACAAACUGAAGA GUAAUCAA	323	UUGAUUACUCUUCAGUUUG UAAAUGUA	697
S324- AS698	AUUUACAAACUGAAGAG UAAUCAAT	324	AUUGAUUACUCUUCAGUUU GUAAAUGU	698
S325- AS699	ACAAACUGAAGAGUAAU CAAUCUAC	325	GUAGAUUGAUUACUCUUA GUUUUGUA	699
S326- AS700	AAACAUUUUGAAAGUCU GUACUUGA	326	UCAAGUACAGACUUUCAA AUGUUUGA	700
S327- AS701	AAGGACUAAUAGAAAAG UAAGUUCT	327	AGAACUUACUUUUUAUUA GUCCUUA	701
S328- AS702	ACUAAUAGAAAAGUAUG UUAUAACC	328	GGUUAUAACAUACUUUUCU AUUAGUCC	702
S329- AS703	AGAAAAGUAUGUUCUAA CCAUUACA	329	UGUAAUGGUUAGAACAUA UUUUCUAU	703
S330- AS704	GAAGAGUAUGUUCUAA CUAUACAT	330	AUGUAUAGGUUAGAACA CUUUUCUA	704
S331- AS705	AAGUAUGUUCUAACCUU UAAAUGAG	331	CUCAUUUAAAGGUUAGA AUACUUU	705
S332- AS706	GUAAUGGCAGUUUAUUU UUACAGTT	332	AACUGUAAAAUUAACUG CAUUACAU	706
S333- AS707	UAAUGGCAGUUUAUUU UGAAGUTC	333	GAACUUCAAAAUUAACUG CCAUUACA	707
S334- AS708	UAAAGAAGACCUGAGAA UGAAUCCC	334	GGGAUUAUUCUCAGGUCU UCUUUAAU	708
S335- AS709	AAAGAAGACCUGAGAAU GUUCCCC	335	GGGGAUACAUCUCAGGUC UUCUUUAA	709
S336- AS710	GAAGACCUGAGAAUGUA UCACCAA	336	UUUGGUGAUACAUCUCAG GUCUUCU	710
S337- AS711	AAGACCUGAGAAUGUAU CCACAAA	337	UUUUGUGGAUACAUCUCA GGUCUUCU	711
S338- AS712	AGACCUGAGAAUGUAUC CCAAAAAG	338	CUUUUUGGGAUACAUCUC AGGUCUUC	712
S339- AS713	GACCUGAGAAUGUAUCC CCAAAAAGC	339	GCUUUUGGGGAUACAUCU CAGGUCU	713
S340- AS714	ACCUGAGAAUGUAUCCC CAAAAGCG	340	CGCUUUUGGGGAUACAUC UCAGGUCU	714
S341- AS715	CCUGAGAAUGUAUCCCC AAAAGCGT	341	ACGCUUUUGGGGAUACAUC CUCAGGUC	715
S342- AS716	CUGAGAAUGUAUCCCCA AAAGCGTG	342	CACGCUUUUGGGGAUACA UCUCAGGU	716
S343- AS717	UGAGAAUGUAUCCCCAA AAACGUGA	343	UCACGUUUUUGGGGAUACA UUCUCAGG	717
S344- AS718	GAGAAUGUAUCCCCAAA AGAGUGAG	344	CUCACUCUUUUGGGGAUAC AUUCUCAG	718
S345- AS719	GCCAUAUUAAAUUUUUU GUAGACAT	345	AUGUCUACAAAAAUUUA UAUGGCAG	719
S346- AS720	CCAUAUUAAAUUUUUUG UUAACATT	346	AAUGUUAACAAAAAUUUA AUAUGGCA	720
S347- AS721	CAUAUUAAAUUUUUUGU UGACAUTA	347	UAAUGUCAACAAAAAUU AAUAGGC	721
S348- AS722	AUAUUAAAUUUUUUGUU GAAAUUAG	348	CUAAUUUCAACAAAAAUU UAAUAUGG	722

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

S349- AS723	AUUAAAUUUUUUGUUGA CAAUAGTC	349	GACUAUUGUCAACAAAAAA UUUAAUUAU	723
S350- AS724	AAAUUUUUUUGUUGACAU UAAUCUCA	350	UGAGAUUAAUGUCAACAAA AAAUUUAA	724
S351- AS725	AAUUUUUUUGUUGACAUU AGACUCAG	351	CUGAGUCUAAUGUCAACAA AAAAUUUA	725
S352- AS726	AUUUUUUUGUUGACAUUA GUAUCAGT	352	ACUGAUACUAAUGUCAACA AAAAUUUU	726
S353- AS727	GAAAGACUUGAAAAUGC UGACUATA	353	UAUAGUCAGCAUUUUCUAU GUCUUCAC	727
S354- AS728	AGACUUUCCAUAACAAG UAAUUUTA	354	UAAAAUUACUUGUAAUGGA AAGUCUCG	728
S355- AS729	ACUUUGCAUCUCAGUAU GAAUUATT	355	AAUAAUUCAUACUGAGAUG CAAAGUUU	729
S356- AS730	CUUUGCAUCUCAGUAUG AAAUAUTC	356	GAAUAUUUCAUACUGAGAU GCAAAGUU	730
S357- AS731	UUGCAUCUCAGUAUGAA UUAUUCAA	357	UUGAAUAAUUCAUACUGAG AUGCAAAG	731
S358- AS732	GCAUCUCAGUAUGAAUU AUACAATT	358	AAUUGUAUAAUUCAUACUG AGAUGCAA	732
S359- AS733	CAUCUCAGUAUGAAUUA UUAUUATT	359	AAAUUUAAUAAUUCAUACU GAGAUGCA	733
S360- AS734	GAAUGAUUUUUCUUUAC AAAACAAA	360	UUUGUUUUUAAAAGAAAAA UCAUUCAA	734
S361- AS735	AGUUUAGGGAACAAUUU GGAAAUTT	361	AAAUUUCCAAAUGUUCUU UAAACUCC	735
S362- AS736	GUUUAGGGAACAAUUUG GCAAUUTT	362	AAAAUUGCCAAAUGUUCU CUAAACUC	736
S363- AS737	UUUAGGGAACAAUUUGG CAAUUUTG	363	CAAAAUUGCCAAAUGUUC CCUAAACU	737
S364- AS738	UUAGGGAACAAUUUGGC AAAUUUGT	364	ACAAAUUGCCAAAUGUU CCCUAAAC	738
S365- AS739	UAGGGAACAAUUUGGCA AUUUUGTG	365	CACAAUAAUUGCCAAAUGU UCCCUAAA	739
S366- AS740	AGGGAACAAUUUGGCAA UUAUGUGG	366	CCACAUAUUUGCCAAAUG UCCCCUAA	740
S367- AS741	GGGAACAAUUUGGCAAU UUAGUGGT	367	ACCACUAAAUGCCAAAUU GUUCCCUA	741
S368- AS742	GGAACAAUUUGGCAAUU UUAUGGTT	368	AACCAUAAAAUUGCCAAU UGUUCUUU	742
S369- AS743	GAACAAUUUGGCAAUUU UGAGGUTT	369	AAACCUCAAAAUUGCCAAA UUGUUCUU	743
S370- AS744	AACAAUUUGGCAAUUUU GUAGUUTT	370	AAAACUACAAAUUGCCAA AUUGUUCU	744
S371- AS745	ACAAUUUGGCAAUUUUG UGAUUUUC	371	GAAAAUCACAAAUUGCCA AAUUGUUC	745
S372- AS746	CAAUUUUGGCAAUUUUGU GGAUUUCG	372	CGAAAUCCACAAAUUGCCA AAUUGUUU	746
S373- AS747	AAAUAGCGUUCUUGUAA UUUAUACAC	373	GUGUAUAAUACAAGAACG CUAUUUUA	747
S374- AS748	AAUAGCGUUCUUGUAAU UUAACACG	374	CGUGUUAAAUAACAAGAAC GCUAUUUU	748
S375- AS749	GCGUUCUUGUAAUUUUA CAAGCUTT	375	AAAGCUUGUAAAAUACAA GAACGCUA	749

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

S376- AS750	UAAUUUUACACGCUUUU GUAAUGGA	376	UCCAUUACAAAAGCGUGUA AAAUUACA	750
S377- AS751	CGCUUUUGUGAUGGAGU GCAGUUTT	377	AAAACUGCACUCCAUCACAA AAGCGUG	751
S378- AS752	GCUUUUUGUGAUGGAGUG CUAUUUTG	378	CAAAAUAGCACUCCAUCACA AAAGCGU	752
S379- AS753	CUUUUGUGAUGGAGUGC UGAUUUGT	379	ACAAAUCAGCACUCCAUCAC AAAAGCG	753
S380- AS754	UUUUGUGAUGGAGUGCU GUUUUGTT	380	AACAAUACAGCACUCCAUCA CAAAAAGC	754
S381- AS755	UUUGUGAUGGAGUGCUG UUAUGUTA	381	UAACAUAAACAGCACUCCAUC ACAAAAG	755
S382- AS756	UGUGAUGGAGUGCUGUU UUAUUATA	382	UAUAAUAAAAACAGCACUCC AUCACAAA	756
S383- AS757	UGAUGGAGUGCUGUUUU GUAAUATA	383	UAUAAUACAAAACAGCACU CCAUCACA	757
S384- AS758	GAUGGAGUGCUGUUUUUG UUUAUUA	384	UUUAUUAACAAAACAGCAC UCCAUCAC	758
S385- AS759	AUGGAGUGCUGUUUUUGU UAAAUAAAT	385	AUUUUUUAAACAAAACAGCA CUCCAUCA	759
S386- AS760	UGGAGUGCUGUUUUUGUU AUUAUAATT	386	AAUUUAUUAACAAAACAGC ACUCCAUC	760
S387- AS761	GGAGUGCUGUUUUUGUUA UAAAAUTT	387	AAUUUUUUAUACAAAACAG CACUCCA	761
S388- AS762	GAGUGCUGUUUUUGUUAU AUAAUUTA	388	UAAAUUAUUAACAAAACA GCACUCCA	762
S389- AS763	AGUGCUGUUUUUGUUAUA UAAUUUAG	389	CUAAAUUAUUAACAAAAC AGCACUCC	763
S390- AS764	GUGCUGUUUUUGUUAUUA AAAUUAGA	390	UCUAAUUUAUUAACAAA CAGCACUC	764
S391- AS765	UGCUGUUUUUGUUAUUA AUUAAGAC	391	GUCUUAUUAUUAACAAA ACAGCACU	765
S392- AS766	GCUGUUUUUGUUAUUAUA UUAAGACT	392	AGUCUUAUUUAUUAACAA AACAGCAC	766
S393- AS767	CUGUUUUUGUUAUUAUAU UUAGACTT	393	AAGUCUAAUUUAUUAACA AAACAGCA	767
S394- AS768	AUUUGCAUUUGUUUAUG UAAUUUCA	394	UGAAAUUACAUAACAAA GCAAAUGG	768
S395- AS769	GUUUUAUGUAAUUAUCAGG AGAAAUAC	395	GUUUUUCUCCUGAAAUUAC AUAAACAA	769
S396- AS770	AUGUAAUUUCAGGAGGA AUACUGAA	396	UUCAGUAAUCCUCCUGAAA UUACAUAA	770
S397- AS771	GAUACUGAACAUUCUGA GUACUGGA	397	UCCAGUACUCAGAUGUUA GUUUUCCU	771
S398- AS772	CAUCUGAGUCCUGGAUG AUACUAAT	398	AUUAGUAUUAUCCAGGACU CAGAUGUU	772
S399- AS773	AUCUGAGUCCUGGAUGA UAAUAATA	399	UAUUUAUUAUUAUCCAGGAC UCAGAUGU	773
S400- AS774	UGAGUCCUGGAUGAUAC UAAUAAAC	400	GUUUUAUUAUUAUCCAG GACUCAGA	774
S401- AS775	AGUCCUGGAUGAUACUA AUAAACTA	401	UAGUUUAUUAUUAUCC AGGACUCA	775
S402- AS776	GUCCUGGAUGAUACUAA UAAACUAA	402	UUAGUUUAUUAUUAUCC CAGGACUC	776

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 5】

S403- AS777	UCCUGGAUGAUACUAAU AAACUAAT	403	AUUAGUUUUAUUAGUAUCAU CCAGGACU	777
S404- AS778	CCUGGAUGAUACUAAUA AAAUAATA	404	UAUUUUUUUAUUAGUAUCA UCCAGGAC	778
S405- AS779	CUGGAUGAUACUAAUAA ACAAAUAA	405	UUUUUUUUUAUUAGUAUC AUCCAGGA	779
S406- AS780	UGGAUGAUACUAAUAAA CUAAUAAT	406	AUUUUUAGUUUAUUAGUAU CAUCCAGG	780
S407- AS781	GGAUGAUACUAAUAAAC UAAUAATT	407	AAUUUUAGUUUAUUAGUA UCAUCCAG	781
S408- AS782	GAUGAUACUAAUAAACU AAAAAUTG	408	CAUUUUUAGUUUAUUAGU AUCAUCCA	782
S409- AS783	AUGAUACUAAUAAACUA AUAAUUGC	409	GCAUUUUUAGUUUAUUAG UAUCAUCC	783
S410- AS784	UGAUACUAAUAAACUAA UAAUUGCA	410	UGCAUUUAUUAGUUUAUA GUAUCAUC	784
S411- AS785	GAUACUAAUAAACUAAU AAAUGCAG	411	CUGCAUUUAUUAGUUUAU AGUAUCAU	785
S412- AS786	AUACUAAUAAACUAAUA AUAGCAGA	412	UCUGCUUUUAUUAGUUUAU UAGUAUCA	786
S413- AS787	UACUAAUAAACUAAUAA UUACAGAG	413	CUCUGUAAUUUAUUAGUUUA UUAGUAUC	787
S866- AS887	UGGGCAAAGGAGAUCU AAAAAGCC	866	GGCUUUUUAGGAUCUCCUU UGCCCAUG	887
S867- AS876	AAAGAGAAAUGAAAACC UAAAUCCC	867	GGGAUUUAGGUUUUCAUUU CUCUUUCA	876
S868- AS877	AAGAAGAUGAUGAUGAU GAAUAAGT	868	ACUUUUUCAUCAUCAUCAU UUCUUCU	877
S869- AS878	AUGAUGAUGAUGAAUAA GUAGGUTC	869	GAACCUACUUUAUUCAUCAU CAUCAUCU	878
S870- AS879	GAUGAUGAAUAAGUUGG UUAUAGCG	870	CGCUAUAACCAACUUAUUC UCAUCAU	879
S871- AS880	AGAAAAAAAUUGAAAUG UAAGGCTG	871	CAGCCUUACAUUUCAAUUU UUUUCUUU	880
S872- AS881	UUGUUGUUCUGUUAACU GAAUACCA	872	UGGUUUUCAGUUAACAGAA CAACAAUU	881
S873- AS882	UUCUGAAUGCUUCUAAG UAAAUACA	873	UGUUUUUACUUAGAAGCAU UCAGAAUG	882
S874- AS883	CUGAUGCUUCUAAGUA AAAACAAT	874	AUUGUUUUUACUUAGAAGC AUUCAGAA	883
S875- AS884	GAAUGCUUCUAAGUAAA UAAAAUTT	875	AAUUUUUAUUUACUUAGAA GCAUUCAG	884

【0081】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

修飾を加えた追加的G a l N A c 共役HMGB1オリゴヌクレオチド配列（図5における試験）

G a l N A c 共役オリゴヌクレオチド	センス配列（非修飾）	センス配列（修飾）	配列番号	アンチセンス配列（非修飾）	アンチセンス配列（非修飾）	配列番号
S 8 4 0 - A S 8 5 3 - M 2	CUA AAC AUG GGC AAA GGA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mCs] [mU] [mA] [mA] [mA] [mC] [mA] [mA] [fU] [fG] [fG] [mC] [mA] [mA] [mA] [mA] [mG] [mG] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mA] [mG] [mC] [mC] [mC] [mG] [adema - G a l N A c] [adema - G a l N A c] [adema - G a l N A c] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 0	UCUC CUUU GCCC AUGU UUAG GG	[MePhosphate - 4O - mUs] [fCs] [fU] [mC] [fC] [mU] [fU] [mG] [fC] [mC] [mC] [mA] [fU] [mG] [mU] [mU] [mA] [mGs] [mGs] [mG]	8 5 3
S 8 4 0 - A S 8 5 3 - M 3	CUA AAC AUG GGC AAA GGA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mCs] [mU] [fA] [mA] [mA] [mC] [mA] [mG] [fU] [mG] [mG] [fC] [fA] [mA] [mA] [mA] [mG] [fG] [fG] [mA] [mG] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mA] [mG] [mC] [mC] [mC] [mG] [adema - G a l N A c] [adema - G a l N A c] [adema - G a l N A c] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 0	UCUC CUUU GCCC AUGU UUAG GG	[MePhosphate - 4O - mUs] [fCs] [fU] [fC] [fC] [fC] [mU] [fU] [mU] [mU] [mG] [fC] [mC] [fC] [mA] [fU] [mG] [fU] [mU] [fU] [fU] [mU] [fA] [mGs] [mGs] [mG]	8 5 3

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

		GalNAc] [mG] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]				
S 8 4 1 - A S 8 5 4 - M 2	UAA ACA UGG GCA AAG GAG AAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mUs] [mA] [mA] [mA] [mC] [mA] [mU] [fG] [fG]] [fG] [fC] [mA] [mA] [mA] [mG] [mG] [mG]] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [adema - GalNAc] [adema - GalNAc] c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 4 1	UUCU CCUU UGCC CAUG UUUA GG	[MePhosphonate - 4O - mUs] [fUs] [fC] [mU] [fC] [mC] [fC] [mU] [mU] [mU] [fG] [mC] [mC] [fA] [mU] [mG] [mU] [mU] [mAs]] [mGs] [mG]	8 5 4
S 8 4 1 - A S 8 5 4 - M 3	UAA ACA UGG GCA AAG GAG AAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mUs] [mA] [fA] [mA] [mC] [mA] [mU] [fG] [mG]] [fG] [mC] [fA] [fA] [mA] [mG] [mG] [mG]] [fA] [mG]] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mG] [mC]] [adema - GalNAc] [adema - GalNAc] c] [adema - GalNAc] [mG] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 4 1	UUCU CCUU UGCC CAUG UUUA GG (配列番号: 8 5 4)	[MePhosphonate - 4O - mUs] [fUs] [fC] [fU] [fC] [mC] [fC] [mU] [mU] [mU] [fG] [mC] [mC] [fA] [mU] [fG] [fU] [mU] [fU] [mAs]] [mGs] [mG]	8 5 4

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

		emA - Ga l N A c] [a d e m A - G a l N A c] [m G] [m G] [m C] [m U] [m G] [m C]				
S 8 4 2 - A S 8 5 5 - M 2	A G C C G A G A G G C A A A A U G U C A G C A G C C G A A A G G C U G C	[m A s] [m G] [m C] [m C] [m G] [m A] [m G] [f A] [f G]] [f G] [f C] [m A] [m A] [m A] [m A] [m U] [m G] [m U]] [m C] [m A] [m G] [m C] [m A] [m G] [m C] [m C] [m G]] [a d e m A - G a l N A c] [a d e m A - G a l N A c] [a d e m A - G a l N A c] [m G] [m G] [m C]] [m U] [m G] [m C]	8 4 2	U G A C A U U U U G C C U C U C G G C U G G	[M e P h o s p h o n a t e - 4 O - m U s] [f G s] [f A] [m C] [f A] [m U] [f U] [m U] [m U]] [f G] [m C] [m C] [m U] [f C] [m U] [m C] [m G] [m G]] [m C] [m U s]] [m G s] [m G]]	8 5 5
S 8 4 2 - A S 8 5 5 - M 3	A G C C G A G A G G C A A A A U G U C A G C A G C C G A A A G G C U G C	[m A s] [m G] [f C] [m C] [m G] [m A] [m G] [f A] [m G]] [f G] [m C] [f A] [f A] [m A] [m A] [m U] [f G] [m U]] [m C] [m A] [m G] [m C] [m A] [m G] [m C] [m C] [m G]] [a d e m A - G a l N A c] [a d e m A - G a l N A c] [a d e m A - G a l N A c] [m G] [m G] [m C]] [m U] [m G] [m C]	8 4 2	U G A C A U U U U G C C U C U C G G C U G G	[M e P h o s p h o n a t e - 4 O - m U s] [f G s] [f A] [f C] [f A] [m U] [f U] [m U] [m U]] [f G] [m C] [f C] [m U] [f C] [m U] [f C] [f G] [m G]] [f C] [m U s]] [m G s] [m G]]	8 5 5
S 8 4 3	A A G	[m A s] [m A]	8 4 3	U A C C	[M e P h o s p h	8 5 6

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

- AS 8 56 - M 2	AAG UGC UCA GAG AGG UAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mG] [mA] [m A] [mG] [m U] [fG] [fC] [fU] [fC]] [mA] [mG] [m A] [mG] [mG A] [mG] [mG] [mU] [mA]] [mG] [mC] [m A] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]		UCUC UGAG CACU UCUU GG	onate - 4O - mUs] [fAs] [fC] [mC] [f U] [mC] [mU] [fG] [mA] [mG] [mC] [f A] [mC] [m U] [mU] [mC] [mU] [mUs] [mGs] [mG]	
S 843 - AS 8 56 - M 3	AAG AAG UGC UCA GAG AGG UAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mA] [fG] [mA] [m A] [mG] [m U] [fG] [mC] [fU] [mC]] [fA] [fG] [m A] [mG] [m A] [fG] [mG] [mU] [mA]] [mG] [mC] [m A] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	843	UACC UCUC UGAG CACU UCUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fAs] [fC] [fC] [f U] [mC] [f U] [mC] [mU] [fG] [mA]] [fG] [mC] [f A] [mC] [f U] [fU] [mC] [fU] [mUs] [mGs] [mG]	856
S 844 - AS 8 57 - M 2	CUC AGA GAG GUG GAA GAC CAG CAG	[mCs] [mU] [mC] [mA] [m G] [mA] [m G] [fA] [fG] [fG] [fU]] [mG] [mG] [m A] [mA] [m G] [mA] [mC]	844	UGGU CUUC CACC UCUC UGAG GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fGs] [fG] [mU] [f C] [mU] [f U] [mC] [mC] [fA] [mC] [mC] [mU] [	857

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

	CCG AAA GGC UGC	] [mC] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA c] [adema - Ga lNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]			fC] [mU] [m C] [mU] [mG] [mA] [mGs] [mGs] [mG]	
S 8 4 4 - AS 8 5 7 - M 3	CUC AGA GAG GUG GAA GAC CAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mCs] [mU] [fC] [mA] [mG] [mA] [m G] [fA] [mG] [fG] [mU] [fG] [fG] [mA] [mA] [m G] [fA] [mC] [mC] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA c] [adema - Ga lNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 4	UGGU CUUC CACC UCUC UGAG GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fGs] [fG] [fU] [fC] [mU] [f U] [mC] [mC] [fA] [mC] [fC] [mU] [fC] [fU] [mG] [fA] [mGs] [mGs] [mG]	8 5 7
S 8 4 5 - AS 8 5 8 - M 2	AGG UGG AAG ACC AUG UCU GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mG] [mG] [mU] [mG] [mG] [m A] [fA] [fG] [fA] [fC] [mC] [mA] [mU] [mG] [m U] [mC] [mU] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA	8 4 5	UCAG ACAU GGUC UUCC ACCU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fA] [mG] [fA] [mC] [f A] [mU] [mG] [fG] [mU] [mC] [mU] [fU] [mC] [m C] [mA] [mC] [mC] [mUs] [mGs] [mG]	8 5 8

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

		c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]				
S 8 4 5 - AS 8 5 8 - M 3	AGG UGG AAG ACC AUG UCU GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mG] [fG] [mU] [m G] [mG] [m A] [fA] [mG]] [fA] [mC] [fC] [fA] [m U] [mG] [m U] [fC] [mU]] [mG] [mA] [mG] [mC] [m A] [mG] [m C] [mC] [mG]] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 5	UCAG ACAU GGUC UUC ACCU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fA] [fG] [f A] [mC] [f A] [mU] [mG]] [fG] [mU] [fC] [mU] [f U] [mC] [f C] [fA] [mC]] [fC] [mUs]] [mGs] [mG]]	8 5 8
S 8 8 5 - AS 8 8 6 - M 2	AAG ACC AUG UCU GCU AAA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mA] [mG] [mA] [m C] [mC] [mA]] [fU] [fG]] [fU] [fC] [mU] [mG] [m C] [mU] [mA]] [mA] [mA]] [mG] [mA] [mG] [mC] [m A] [mG] [m C] [mC] [mG]] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 8 5	UCUU UAGC AGAC AUGG UCUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fU] [mU] [f U] [mA] [f G] [mC] [mA]] [fG] [mA] [mC] [mA] [f U] [mG] [m G] [mU] [mC]] [mU] [mUs]] [mGs] [mG]]	8 8 6
S 8 8 5 - AS 8	AAG ACC	[mAs] [mA] [fG] [mA] [	8 8 5	UCUU UAGC	[MePhosph onate - 4O -	8 8 6

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

86 - M 3	AUG UCU GCU AAA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	mC] [mC] [m A] [fU] [mG] [fU] [mC] [fU] [fG] [mC] [mU] [m A] [fA] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]		AGAC AUGG UCUU GG	mUs] [fCs] [fU] [fU] [fU] [mA] [f G] [mC] [mA] [fG] [mA] [fC] [mA] [fU] [mG] [f G] [fU] [mC] [fU] [mUs] [mGs] [mG]	
S846 - AS8 59 - M 2	AAA UUU GAA GAU AUG GCA AAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mA] [mA] [mU] [mU] [mU] [m G] [fA] [fA] [fG] [fA] [mU] [mA] [mU] [mG] [m A] [mC] [mA] [mA] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	846	UUUG CCAU AUCU UCAA AUUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fUs] [fU] [mG] [fC] [mC] [f A] [mU] [mA] [fU] [mC] [mU] [mU] [fC] [mA] [m A] [mA] [mU] [mU] [mUs] [mGs] [mG]	859
S846 - AS8 59 - M 3	AAA UUU GAA GAU AUG GCA AAG CAG CCG	[mAs] [mA] [fA] [mU] [mU] [mU] [m G] [fA] [mA] [fG] [mA] [fU] [fA] [mU] [mG] [m G] [fC] [mA] [mA] [mA] [fU] [mU] [fC] [mA] [f	846	UUUG CCAU AUCU UCAA AUUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fUs] [fU] [fG] [fC] [mC] [f A] [mU] [mA] [fU] [mC] [fU] [mU] [fC] [mA] [f	859

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

	AAA GGC UGC	[mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]			A] [fA] [mU] [fU] [mUs] [mGs] [mG]	
S 8 4 7 - AS 8 6 0 - M 2	AGC AAG AAA AAG AAG GAA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mG] [mC] [mA] [mA] [mG] [mA] [fA] [fA] [fA] [fA] [mG] [mA] [mA] [mG] [mA] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 7	UCUU CCUU CUUU UUCU UGCU GG	[MePhosphonate-4O-mUs] [fCs] [fU] [mU] [fC] [mC] [fU] [mU] [mC] [fU] [mU] [mU] [fU] [mC] [mU] [mU] [mG] [mC] [mUs] [mGs] [mG]	8 6 0
S 8 4 7 - AS 8 6 0 - M 3	AGC AAG AAA AAG AAG GAA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mG] [fC] [mA] [mA] [mG] [mA] [fA] [mA] [fA] [mA] [fG] [fA] [mA] [mG] [mA] [G] [fA] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 7	UCUU CCUU CUUU UUCU UGCU GG	[MePhosphonate-4O-mUs] [fCs] [fU] [fU] [fC] [mC] [fU] [mU] [mC] [fU] [mU] [mU] [fU] [mC] [fU] [fU] [mG] [fC] [mUs] [mGs] [mG]	8 6 0

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

		GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]				
S 8 4 8 - AS 8 6 1 - M 2	CAA GAA AAA GAA GGA AGA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mCs] [mA] [mA] [mG] [mA] [mA] [mA] [fA] [fA] [fG] [fA] [mA] [mG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 8	UCUC UUCC UUCU UUUU CUUG GG	[MePhosphonate-4O-mUs] [fCs] [fU] [mC] [fU] [mU] [fC] [mC] [mU] [fU] [mC] [mU] [mU] [fU] [mU] [mU] [mC] [mU] [mU] [mG] [mG] [mG]	8 6 1
S 8 4 8 - AS 8 6 1 - M 3	CAA GAA AAA GAA GGA AGA GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mCs] [mA] [fA] [mG] [mA] [mA] [mA] [fA] [mA] [fG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC] [mG] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [adema-GalNAc] [mG] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 8	UCUC UUCC UUCU UUUU CUUG GG	[MePhosphonate-4O-mUs] [fCs] [fU] [fC] [fU] [mU] [fC] [mC] [mU] [fU] [mC] [fU] [mU] [fU] [mU] [fU] [fC] [mU] [fU] [mG] [mG] [mG]	8 6 1
S 8 4 9 - AS 8 6 2 - M	GAU GAU GAU	[mGs] [mA] [mU] [mG] [mA] [mU] [m	8 4 9	UCAA CUUA UUCA	[MePhosphonate-4O-mUs] [fCs]	8 6 2

10

20

30

40

50

50

2	GAA UAA GUU GAG CAG CCG AAA GGC UGC	G] [fA] [fU]] [fG] [fA] [mA] [mU] mA] [mA] [m G] [mU] [mU] [mG] [mA] [mG] [mC] mA] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]		UCAU CAUC GG	[fA] [mA] [f C] [mU] [f U] [mA] [mU] [fU] [mC] [mA] [mU] [f C] [mA] [m U] [mC] [mA] [mU] [mCs] [mGs] [mG]	
S 8 4 9 - AS 8 6 2 - M 3	GAU GAU GAU GAA UAA GUU GAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mGs] [mA] [fU] [mG] [m A] [mU] [m G] [fA] [mU]] [fG] [mA] [fA] [fU] [m A] [mA] [m G] [fU] [mU]] [mG] [mA] [mG] [mC] [m A] [mG] [m C] [mC] [mG] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC] [mU] [mG] [mC]	8 4 9	UCAA CUUA UUCA UCAU CAUC GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fA] [fA] [f C] [mU] [f U] [mA] [mU] [fU] [mC] [fA] [mU] [f C] [mA] [f U] [fC] [mA] [fU] [mCs] [mGs] [mG]	8 6 2
S 8 5 0 - AS 8 6 3 - M 2	AUG AUG AUG AAU AAG UUG GAG CAG CCG AAA	[mAs] [mU] [mG] [mA] [m U] [mG] [m A] [fU] [fG]] [fA] [fA] [mU] [mA] [m A] [mG] [m U] [mU] [mG] [mG] [mA] [mG] [mC] [m A] [mU] [mC]	8 5 0	UCCA ACUU AUUC AUCA UCAU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fC] [mA] [f A] [mC] [f U] [mU] [mA] [fU] [mU] [mC] [mA] [f U] [mC] [m A] [mU] [mC]	8 6 3

【表 5 - 1 1】

	GGC UGC	mA] [mG] [mC] [mC] [mG]] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA c] [adema - Ga lNAc] [m G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]			] [mA] [mUs] [mGs] [mG]	
S 8 5 0 - AS 8 6 3 - M 3	AUG AUG AUG AAU AAG UUG GAG CAG CCG AAA GGC UGC (配列 番号: 8 5 0)	[mAs] [mU] [fG] [mA] [mU] [mG] [m A] [fU] [mG]] [fA] [mA] [fU] [fA] [mA] [mG] [m U] [fU] [mG]] [mG] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG]] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA c] [adema - Ga lNAc] [m G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 5 0	UCCA ACUU AUUC AUCA UCAU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fCs] [fC] [fA] [fA] [mC] [fU] [mU] [mA]] [fU] [mU] [fC] [mA] [fU] [mC] [fA] [fU] [mC]] [fA] [mUs]] [mGs] [mG]]	8 6 3
S 8 5 1 - AS 8 6 4 - M 2	AAG UUG GUU CUA GCG CAG UAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mA] [mG] [mU] [mU] [mG] [m G] [fU] [fU]] [fC] [fU] [mA] [mG] [mC] [mG] [m C] [mA] [mG]] [mU] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [m C] [mC] [mG]] [adema - G a lNAc] [ad ema - Ga lNA c] [adema - Ga lNAc] [m G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 5 1	UACU GCGC UAGA ACCA ACUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fAs] [fC] [mU] [fG] [mC] [fG] [mC] [mU]] [fA] [mG] [mA] [mA] [fC] [mC] [mA] [mA] [mC]] [mU] [mUs]] [mGs] [mG]]	8 6 4

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

		G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]				
S 8 5 1 - AS 8 6 4 - M 3	AAG UUG GUU CUA GCG CAG UAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mAs] [mA] [fG] [mU] [mU] [mG] [fU] [mU]] [fC] [mU] [fA] [fG] [mC] [mG] [mC] [mC]] [fA] [mG]] [mU] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mC] [mG]] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 5 1	UACU GCGC UAGA ACCA ACUU GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fAs] [fC] [fU] [f G] [mC] [f G] [mC] [mU]] [fA] [mG]] [fA] [mA] [f C] [mC] [f A] [fA] [mC]] [fU] [mUs]] [mGs] [mG]]	8 6 4
S 8 5 2 - AS 8 6 5 - M 2	UUA UUA GUA UUG UUG UCC UAG CAG CCG AAA GGC UGC	[mUs] [mU] [mA] [mU] [mU] [mA] [mG] [fU]] [fU] [fU] [mG] [mU] [mU] [mG] [mC] [mC]] [mU] [mA] [mG] [mC] [mA] [mG] [mC] [mC]] [mC] [mG]] [adema - G alNAc] [ad ema - GalNA c] [adema - GalNAc] [m G] [mG] [mC]] [mU] [mG] [mC]	8 5 2	UAGG ACAA CAAU ACUA AUAA GG	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fAs] [fG] [mG] [f A] [mC] [f A] [mA] [mC]] [fA] [mA] [mU] [mA] [f C] [mU] [mA] [mA] [mA] [mU]] [mA] [mAs]] [mGs] [mG]]	8 6 5
S 8 5 2 - AS 8 6 5 - M 3	UUA UUA GUA UUG	[mUs] [mU] [fA] [mU] [mU] [mA] [mA] [mG]] [fU] [mA] G] [fU] [mA]	8 5 2	UAGG ACAA CAAU ACUA	[MePhosph onate - 4O - mUs] [fAs] [fG] [fG] [	8 6 5

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

UUG	] [fU] [mU]	AUAA	fA] [mC] [f
UCC	[fG] [fU] [	GG	A] [mA] [mC
UAG	mU] [mG] [m		] [fA] [mA]
CAG	U] [fC] [mC		[fU] [mA] [
CCG	] [mU] [mA]		fC] [mU] [f
AAA	[mG] [mC] [		A] [fA] [mU
GGC	mA] [mG] [m		] [fA] [mAs
UGC	C] [mC] [mG		] [mGs] [mG
	] [adema - G		]
	a1NAc] [ad		
	ema - Ga1NA		
	c] [adema -		
	Ga1NAc] [m		
	G] [mG] [mC		
	] [mU] [mG]		
	[mC]		

10

20

【0082】

本明細書に例示した開示内容は、本明細書に具体的には開示していない1つの要素又は複数の要素、1つの限定又は複数の限定が存在しない状態では好適に実施できる。従って、例えば、本明細書の各例では、用語「を含む」、「基本的に～から成る」、及び「から成る」のいずれかはそれぞれ、他の2つの用語のいずれかに置き換えてもよい。採用した用語や表現は説明のための用語として使用し、限定のためではない。そのような用語や表現の使用において、提示及び説明した特徴又はその一部の等価物を除外する意図はないが、請求した発明の範囲内で様々な修正が可能であることは認識されている。従って、本発明は好ましい実施形態により具体的に開示してきたが、本明細書に開示した概念の自由選択的な特徴、修正及び変更は当業者に委ねてもよく、そのような修正及び変更は本明細書及び添付の請求項に定義されるような本発明の範囲内であると考えられることは理解すべきである。

30

また、本発明の特徴又は態様をマーカッシュ群又は代替的な他の群の観点から説明する場合、当業者は、本発明がそれによってマーカッシュ群又は他の群の任意の各メンバー、又はメンバーの下位群の観点からも説明することを認識している。

【0083】

本発明を説明する文脈（特に以下の特許請求の範囲の文脈）における用語「a」、「an」、「the」及び同様の参照語の使用は、本明細書において別段の指示がない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を網羅するように解釈すべきである。用語「含む」(comprising)、「有する」(having)、「含む」(including)、及び「含有する」(containing)は、別段の記載がない限り、オープンエンドな用語（即ち、「含むが、限定されるものではない」という意味）として解釈すべきである。本明細書における数値の範囲の参照は、本明細書で別段の指示がない限り、範囲内にある各個別の数値を個別に参照する簡略表記法として機能することを単に意図しており、各個別の数値は、本明細書において個別に参照されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の方法は全て、本明細書で別段の指示がない限り、又は文脈上明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実行できる。本明細書で提供する任意の及び全ての例、又は例示的な語句（例えば、「など」）の使用は、本発明をより明らかにすることを単に意図しており、別段に請求していない限り、本発明の範囲に限定を持ち出すものではない。本明細書のいかなる語句も、本発明の実施に不可欠なものとして請求していない要

40

50

素を示すものと解釈すべきではない。

本発明の実施形態は、本発明を実施するために発明者らに知られている最良の態様を含めて、本明細書に記載されている。それらの実施形態の変更は、前述の説明を読めば、当業者には明らかになるであろう。

本発明者は、当業者がそのような変更を適宜採用することを期待しており、また、本明細書に具体的に記載した方法以外の方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明には、適用可能な法律で認められているように、添付の特許請求の範囲に引用された主題の全ての修正物及び等価物が含まれる。更に、本明細書に別段の指示がない限り、又は文脈上明らかに矛盾しない限り、上述の要素の組み合わせは、そのあらゆる可能な変形物において、本発明に包含される。当業者であれば、本明細書に記載した本発明の具体的な実施形態の多くの等価物を認識しているか、又は通常の実験以下の実験を利用して確認することが可能である。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲に包含されることを意図している。

10

【図面】

【図 1 A】

【図 1 B】

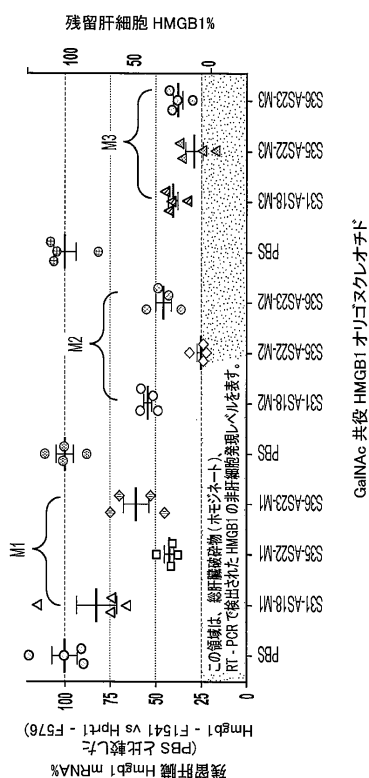


FIG. 1A

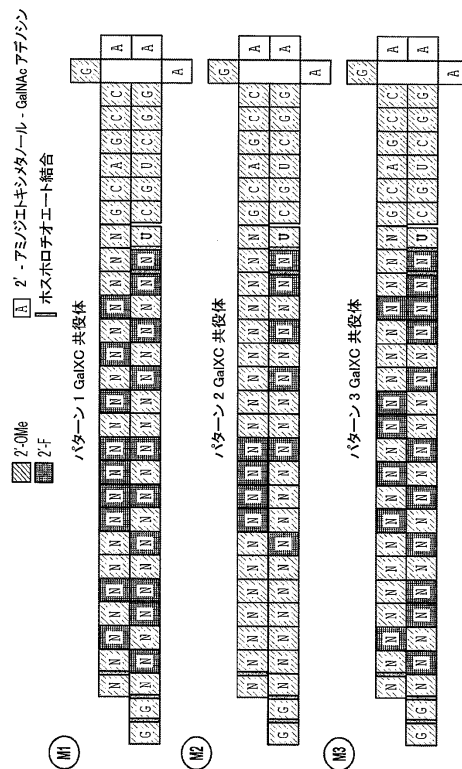


FIG. 1B

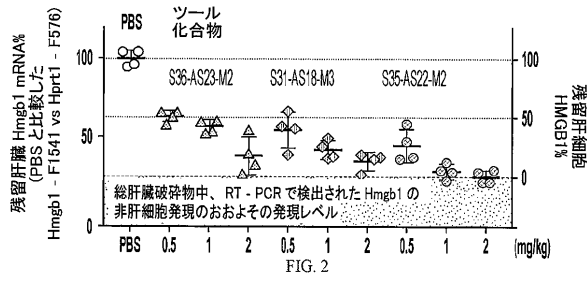
20

30

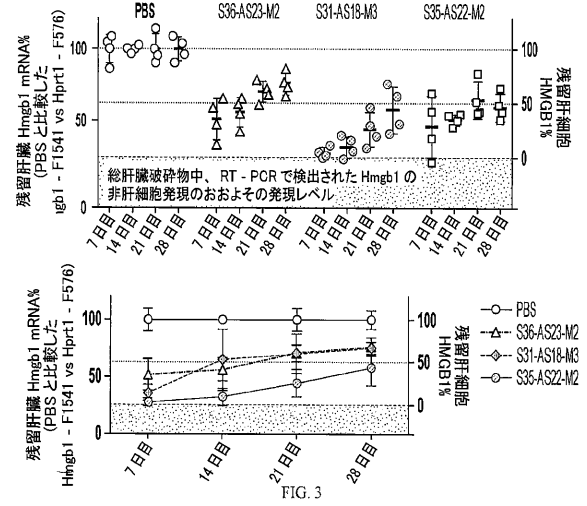
40

50

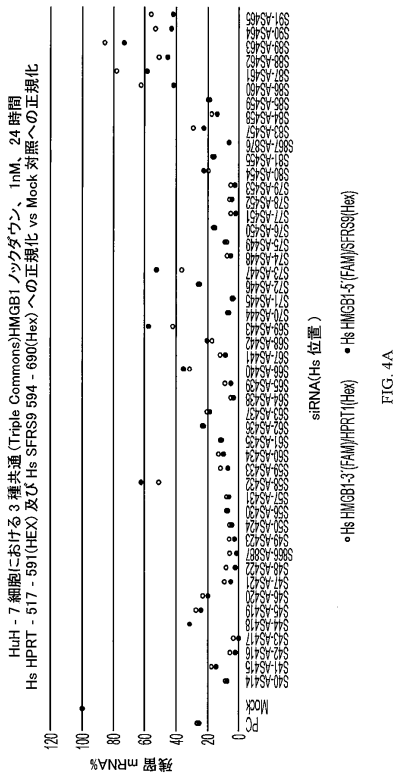
【図 2】



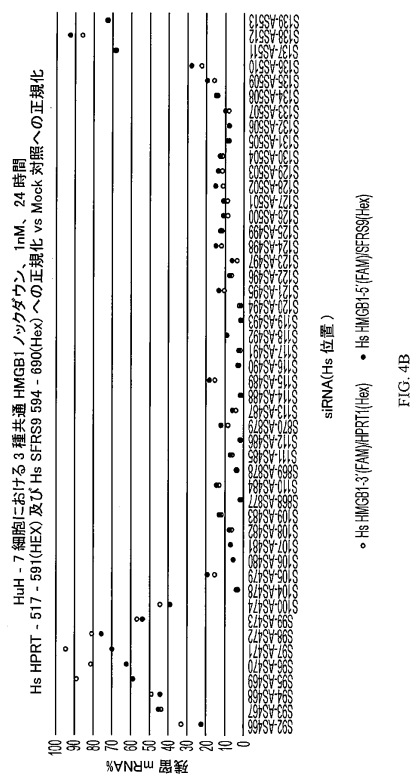
【図 3】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

20

30

40

50

【図 4 C】

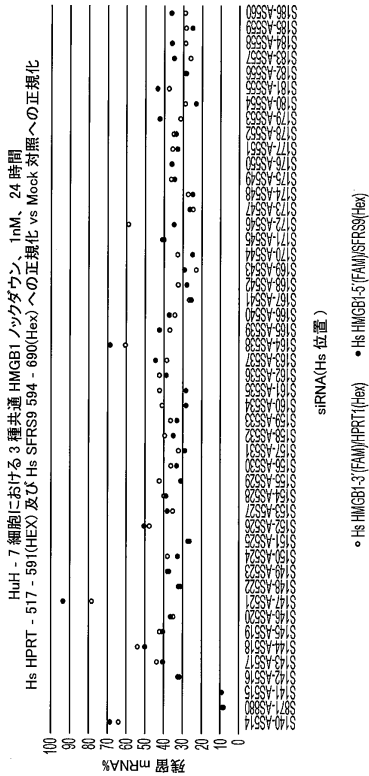


FIG. 4C

【図 4 D】

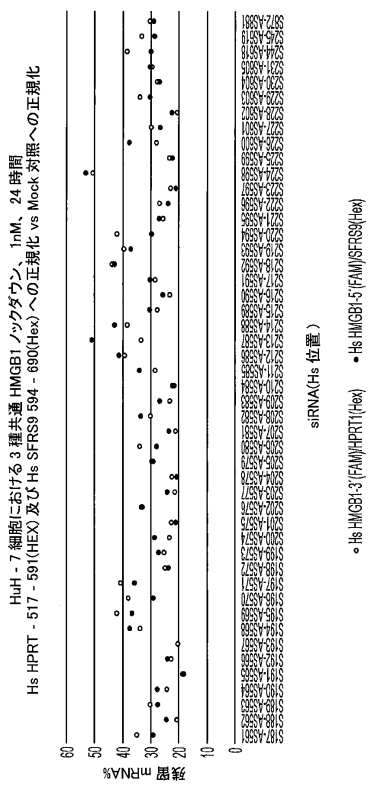


FIG. 4D

【図 4 E】

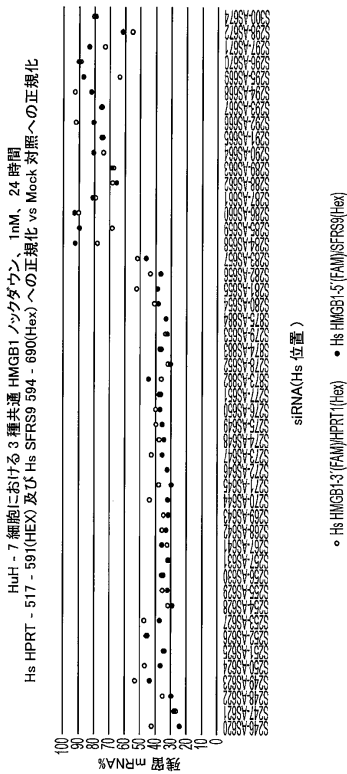


FIG. 4E

【図 4 F】

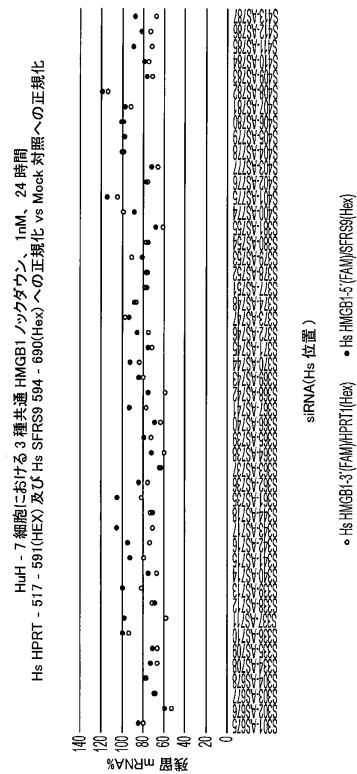


FIG. 4F

10

20

30

40

50

【図 5】

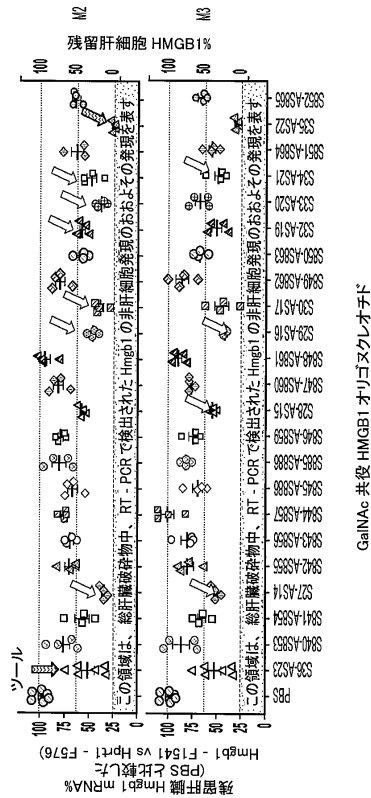


FIG. 5

GalNAc 共役 HMGB1 オリゴヌクレオチド

【図 6】

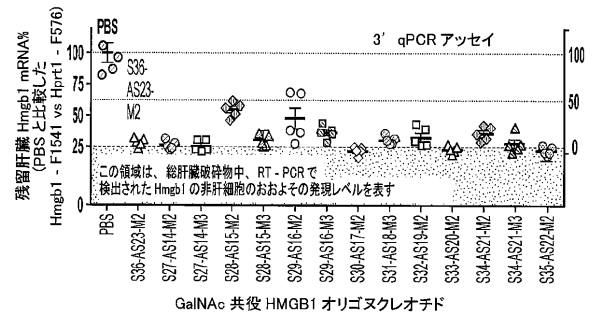


FIG. 6

10

20

【圖 7】

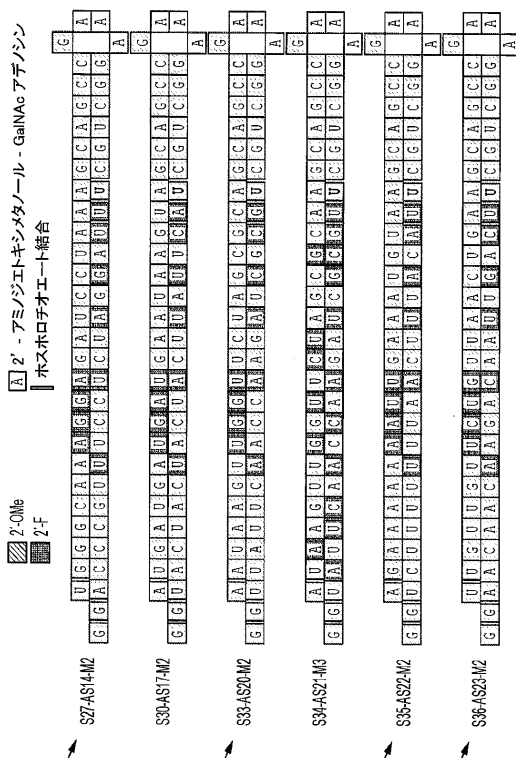


FIG. 7

【図 8 A】

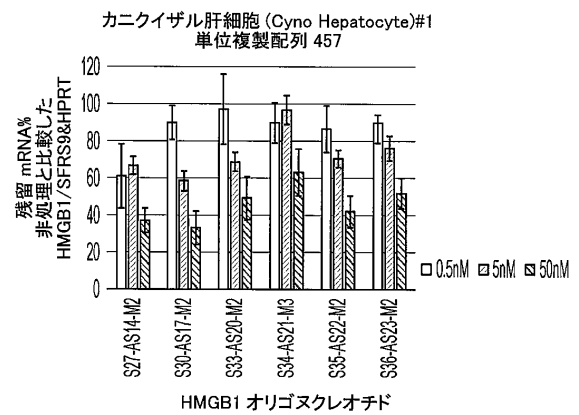


FIG. 8A

30

40

50

【図 8 B】

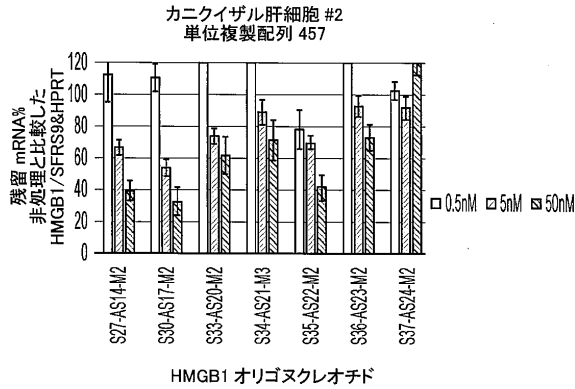


FIG. 8B

【図 8 C】

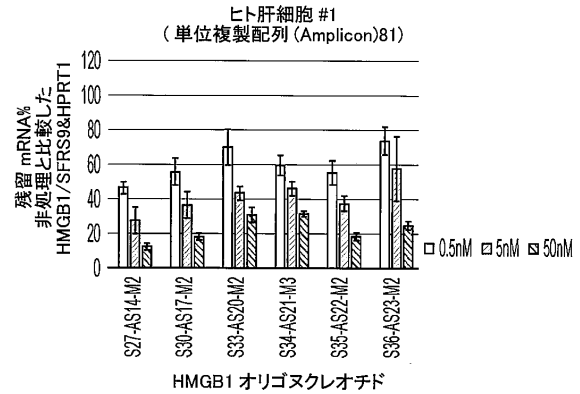


FIG. 8C

【図 8 D】

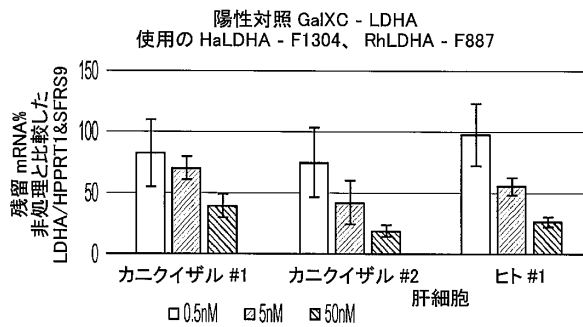


FIG. 8D

【図 9 A】

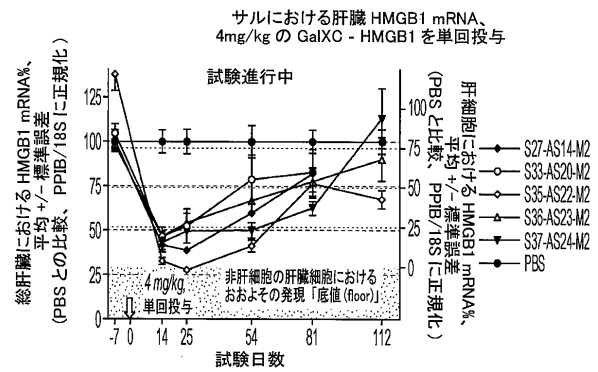


FIG. 9A

10

20

30

40

50

【図 9 B】

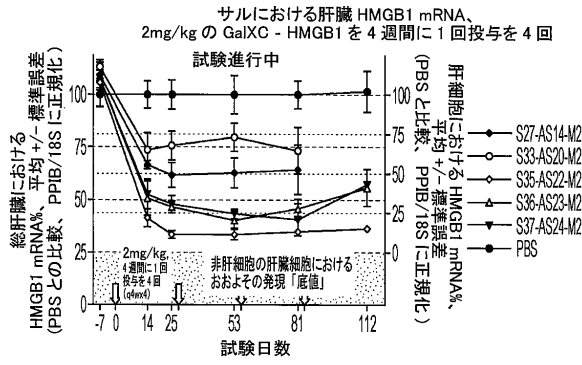


FIG. 9B

【図 10 A】

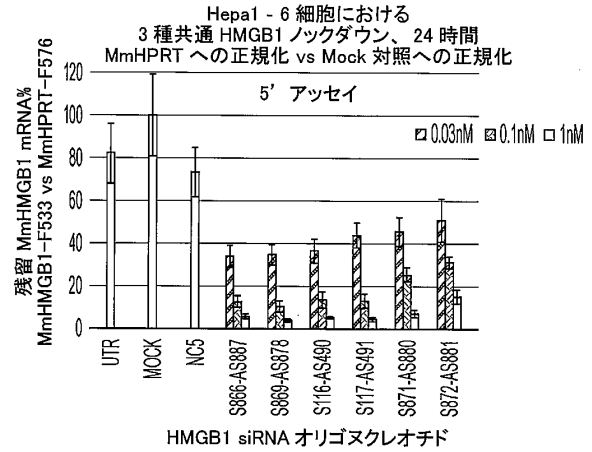


FIG. 10A

【図 10 B】

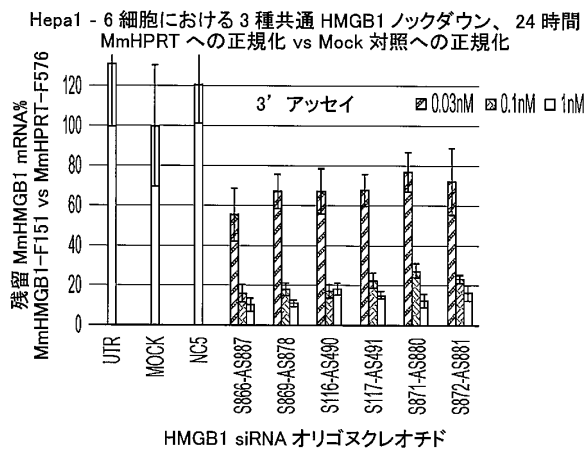


FIG. 10B

【図 10 C】

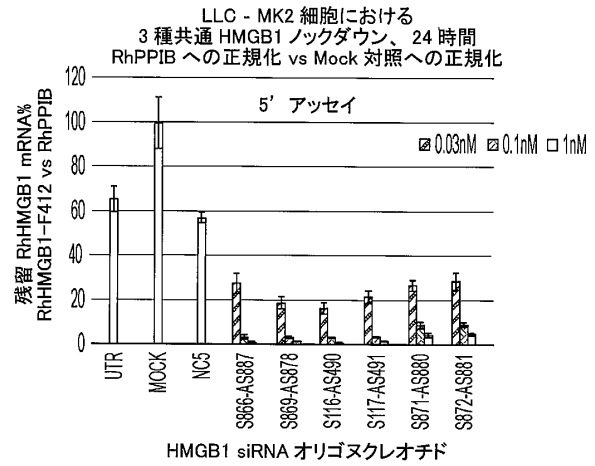


FIG. 10C

10

20

30

40

50

【図 10 D】

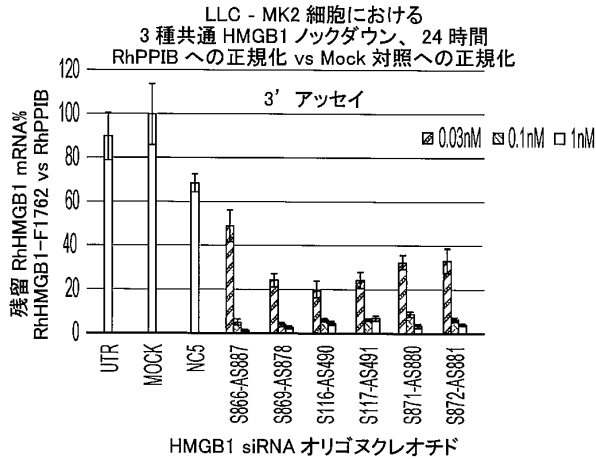


FIG. 10D

【図 10 E】

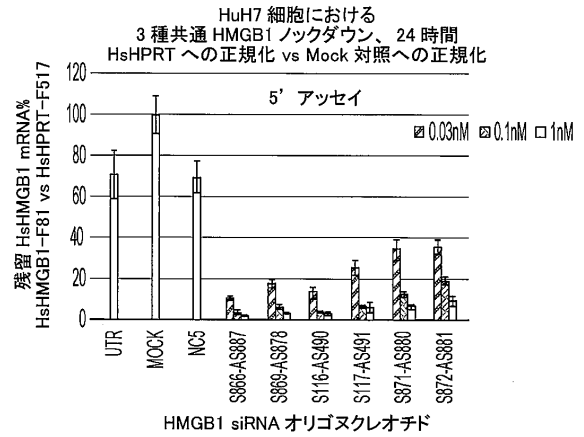


FIG. 10E

【図 10 F】

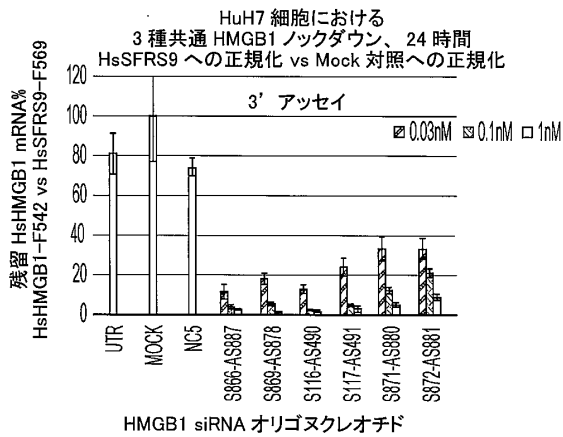


FIG. 10F

【図 11 A】

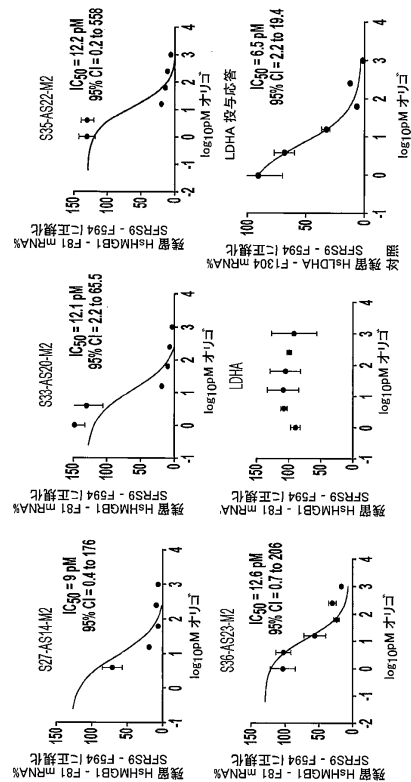


FIG. 11A

【図 1 1 B】

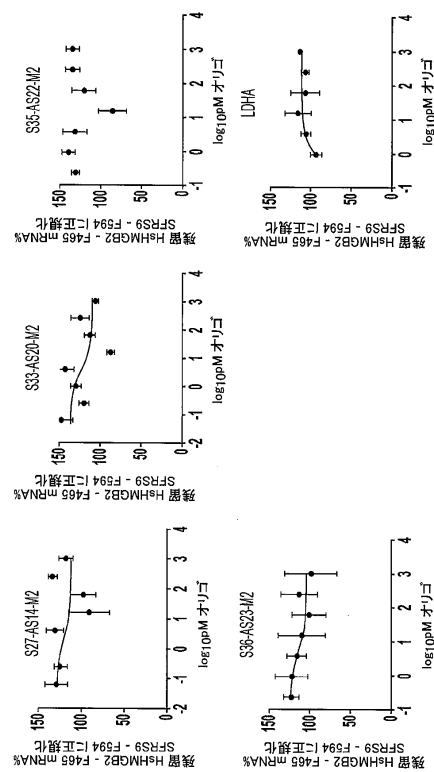


FIG. 11B

【図 1 1 C】

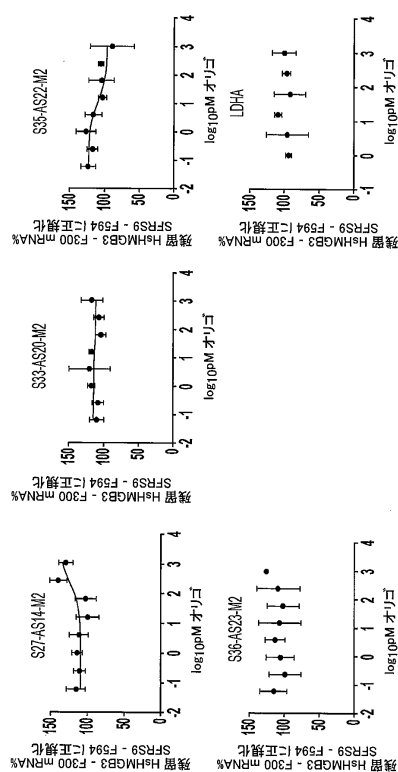


FIG. 11C

【配列表】

2022517742000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2019/067883
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/7088; C07H 21/04; C12N 15/11; C12N 15/113 (2020.01) CPC - A61K 31/713; C12N 15/11; C12N 15/111; C12N 15/113; C12N 2310/14 (2020.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/44A; 514/44R; 536/23.1; 536/24.5 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0208867 A1 (TAKENAKA et al) 16 August 2012 (16.08.2012) entire document	1-4, 45-49
A	US 2013/0183348 A1 (TANIGUCHI et al) 18 July 2013 (18.07.2013) entire document	1-4, 45-49
A	WO 2017/079227 A1 (UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 11 May 2017 (11.05.2017) entire document	1-4, 45-49
A	US 2009/0169546 A1 (WU et al) 02 July 2009 (02.07.2009) entire document	1-4, 45-49
A	ZHU et al. "Inhibitory effects of miR-25 targeting HMGB1 on macrophage secretion of inflammatory cytokines in sepsis," Oncology Letters, 14 August 2018 (14.08.2018), Vol. 16, Iss. 4, pgs. 5027-5033. entire document	1-4, 45-49
P, A	WO 2019/006375 A1 (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.) 03 January 2019 (03.01.2019) entire document	1-4, 45-49
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 April 2020		Date of mailing of the international search report 27 APR 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/067883

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

SEQ ID NOs:1-10, 14-20, and 27-36 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/067883

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 19-44, 50, 52-67
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

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

1-4 and 45-49 to the extent that they read on oligonucleotides of SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:27.

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/067883

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-18, 45-49, and 51 are drawn to oligonucleotides for reducing HMGB1 expression, compositions and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1, compositions and methods comprising the same, the oligonucleotide comprising a sense strand and an antisense strand, wherein the sense strand is selected to be SEQ ID NO:27, and the antisense strand is selected to be SEQ ID NO:14. It is believed that claims 1-4 and 45-49 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on oligonucleotides of SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:27.

Applicant is invited to elect additional HMGB1-modulating oligonucleotides, including specific sense and antisense strands, each with specified SEQ ID NO, to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. An exemplary election would be an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1, compositions and methods comprising the same, the oligonucleotide comprising a sense strand and an antisense strand, wherein the sense strand is selected to be SEQ ID NO:28, and the antisense strand is selected to be SEQ ID NO:15. Additional HMGB1 modulating oligonucleotides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for reducing expression of HMGB1, requiring the selection of alternatives for the nucleotide sequence of each sense and antisense oligonucleotide, where "the sense strand comprises a sequence as set forth in any one of SEQ ID NOs: 1-13 and wherein the antisense strand comprises a complementary sequence selected from SEQ ID NOs: 14-26" and "the sense strand sequence comprises or consists of a sequence as set forth in any one of SEQ ID NOs: 27-39" and "the antisense strand sequence consists of a sequence as set forth in any one of SEQ ID NOs: 14-26".

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1, the oligonucleotide comprising a sense strand of 15 to 50 nucleotides in length and an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length, wherein the sense strand forms a duplex region with the antisense strand; an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1, the oligonucleotide comprising an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length, wherein the antisense strand has a region of complementarity to HMGB1 that is complementary to at least 15 contiguous nucleotides; an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1 comprising a sense strand and an antisense strand; these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2012/10208867 A1 to Takenaka et al. discloses an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1 (A nucleic acid molecule that can bind to HMGB1 protein and applications thereof are provided, Abstract; expression of the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention in a cultured cell enables an experiment for inhibiting gene transcription, Para. [0015]), the oligonucleotide comprising a sense strand of 15 to 50 nucleotides in length and an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length (antisense strand... sense strand, Para. [0140]); Regarding the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention... (SEQ ID NO. 43) gggacgcucacguacgcuca (SEQ ID NO. 115) acgcucacguacgcuca, Para. [0143]), wherein the sense strand forms a duplex region with the antisense strand (HMGB1 binding nucleic acid molecule (B4) may be a nucleic acid molecule composed of the aforementioned, complementary base sequence, or may be a nucleic acid molecule containing the aforementioned complementary base sequence, Para. [0131]); an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1 (A nucleic acid molecule that can bind to HMGB1 protein and applications thereof are provided, Abstract; expression of the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention in a cultured cell enables an experiment for inhibiting gene transcription, Para. [0015]), the oligonucleotide comprising an antisense strand of 15 to 30 nucleotides in length (antisense strand... sense strand, Para. [0140]); Regarding the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention... (SEQ ID NO. 43) gggacgcucacguacgcuca (SEQ ID NO. 115) acgcucacguacgcuca, Para. [0143]), wherein the antisense strand has a region of complementarity to HMGB1 that is complementary to at least 15 contiguous nucleotides (HMGB1 binding nucleic acid molecule (B4) may be a nucleic acid molecule composed of the aforementioned complementary base sequence, or may be a nucleic acid molecule containing the aforementioned complementary base sequence, Para. [0131]); an oligonucleotide for reducing expression of HMGB1 (A nucleic acid molecule that can bind to HMGB1 protein and applications thereof are provided, Abstract; expression of the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention in a cultured cell enables an experiment for inhibiting gene transcription, Para. [0015]) comprising a sense strand and an antisense strand (antisense strand... sense strand, Para. [0140]); Regarding the HMGB1 binding nucleic acid molecule of the present invention... (SEQ ID NO. 43) gggacgcucacguacgcuca (SEQ ID NO. 115) acgcucacguacgcuca, Para. [0143]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類 **F I** テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) **A 6 1 P 43/00 1 0 5**

(32)優先日 平成31年1月3日(2019.1.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW
 弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
 弁理士 服部 博信

(72)発明者 エイブラムス マーク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 レキシントン ハイデン アベニュー 7 5 ディセルナ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 チョブダ ギリシュ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 レキシントン ハイデン アベニュー 7 5 ディセルナ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 パク ジヘ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 レキシントン ハイデン アベニュー 7 5 ディセルナ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC16 CC41 EE59
 4C084 AA13 NA13 NA14 ZA751 ZB211
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZA75 ZB21