

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6570447号
(P6570447)

(45) 発行日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日(2019.8.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/113	(2010.01)	C 12 N	15/113	Z N A Z
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	

請求項の数 29 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-537009 (P2015-537009)
 (86) (22) 出願日 平成25年10月15日 (2013.10.15)
 (65) 公表番号 特表2015-536132 (P2015-536132A)
 (43) 公表日 平成27年12月21日 (2015.12.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/065073
 (87) 國際公開番号 WO2014/062691
 (87) 國際公開日 平成26年4月24日 (2014.4.24)
 審査請求日 平成28年10月14日 (2016.10.14)
 (31) 優先権主張番号 61/714,132
 (32) 優先日 平成24年10月15日 (2012.10.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 595104323
 イオーニス ファーマシューティカルズ
 , インコーポレーテッド
 I o n i s P h a r m a c e u t i c a
 l s , l n c .
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9201
 0, カールズバッド, ガゼル コート 2
 855
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C 9 O R F 7 2 発現を調節するための組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

18 ~ 30 個の結合したヌクレオシドからなり、配列番号 32 ~ 36、40、42 ~ 44、66、85、165、及び 320 のいずれかの少なくとも 18 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、C 9 O R F 7 2 核酸の等長部分に少なくとも 90 % 相補的であり、該修飾オリゴヌクレオチドがギャップマーである、前記化合物。

【請求項 2】

18 ~ 30 個の結合したヌクレオシドからなり、配列番号 32 ~ 36、40、42 ~ 44、66、85、165、及び 320 のいずれかの少なくとも 18 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドであって、該修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、C 9 O R F 7 2 核酸の等長部分に少なくとも 90 % 相補的であり、該修飾オリゴヌクレオチドがギャップマーである、前記修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、C 9 O R F 7 2 核酸の等長部分に少なくとも 100 % 相補的である、請求項 1 に記載の化合物、又は請求項 2 に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

C 9 O R F 7 2 核酸が、配列番号 1 ~ 10 のいずれかの核酸塩基配列を有する、請求項 3 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

修飾オリゴヌクレオチドが一本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 1、3 及び 4 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 6】

修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも一つのヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項 1 及び 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の化合物、又は請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、請求項 6 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

10

【請求項 8】

修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 6 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

修飾ヌクレオシド間結合がホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、請求項 7 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの核酸塩基が修飾核酸塩基である、請求項 1 及び 3 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物、又は請求項 2 ~ 4 及び 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 11】

修飾核酸塩基が 5 - メチルシトシンである、請求項 10 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つの核酸塩基が修飾糖を含む、請求項 1 及び 3 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の化合物、又は請求項 2 ~ 4 及び 6 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドが修飾糖を含む、請求項 12 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

30

【請求項 14】

少なくとも 1 つの修飾糖が二環式糖である、請求項 12 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

各二環式糖が糖の 4' 位と 2' 位との間に化学架橋を含み、各化学架橋が、4' - C H (R) - O - 2' 及び 4' - (C H₂)₂ - O - 2' から独立して選択され、ここで、各 R は H、C₁ - C₆ アルキル、及び C₁ - C₆ アルコキシルから独立して選択される、請求項 14 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの化学架橋が、
4' - C H (R) - O - 2' (ここで、R はメチルである) ;
4' - C H (R) - O - 2' (ここで、R は H である) ; 又は
4' - C H (R) - O - 2' (ここで、R は - C H₂ - O - C H₃ である)
である、請求項 15 に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

40

【請求項 17】

少なくとも 1 つの修飾糖が 2' - O - メトキシエチル基又は 2' - O - メチル基を含む、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項 18】

修飾オリゴヌクレオチドが、

1 ~ 6 個のヌクレオシドを有する 5' ウイングセグメントであって、該 5' ウイングセ

50

グメントの各ヌクレオシドが修飾糖を含む、前記セグメント；

1～6個のヌクレオシドを有する3'ウイングセグメントであって、該3'ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を含む、前記セグメント；及び

8～15個のヌクレオシドを有するギャップセグメントであって、該ギャップセグメントの各ヌクレオシドがデオキシヌクレオシドである、前記セグメントを含む、請求項1及び3～17のいずれか1項に記載の化合物、又は請求項2～4及び6～17のいずれか1項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項19】

修飾オリゴヌクレオチドが、ヘキサヌクレオチド反復伸長以外にC9ORF72の領域に相補的な核酸塩基配列を有し、該ヘキサヌクレオチド反復伸長がGGGGGCC、GGG GGG、GGGGCG、及びGGGGGCのいずれかを含む、請求項1及び3～18のいずれか1項に記載の化合物、又は請求項2～4及び6～18のいずれか1項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項20】

各修飾糖が2' - O - メトキシエチル基又は2' - O - メチル基を含む、請求項13～19のいずれか1項に記載の化合物、又は請求項13～19のいずれか1項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項21】

修飾オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオシドが糖代替物を含む、請求項1及び3～20のいずれか1項に記載の化合物、又は請求項2～4及び6～20のいずれか1項に記載の修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項22】

糖代替物がモルホリノ又はペプチド核酸である、請求項21に記載の化合物又は修飾オリゴヌクレオチド。

【請求項23】

修飾オリゴヌクレオチドからなる、請求項1及び3～22のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項24】

請求項1及び3～23のいずれか1項に記載の化合物を含む、複合体化したアンチセンス化合物。

【請求項25】

請求項1及び3～23のいずれか1項に記載の化合物を含む、二本鎖化合物。

【請求項26】

請求項25に記載の二本鎖化合物を含む、複合体化したアンチセンス化合物。

【請求項27】

請求項1及び3～23のいずれか1項に記載の化合物、請求項24又は26に記載の複合体化したアンチセンス化合物、請求項25に記載の二本鎖化合物、又は請求項2～4及び6～22のいずれか1項に記載の修飾オリゴヌクレオチド、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む、組成物。

【請求項28】

薬学的に許容される希釈剤がリン酸緩衝食塩水(PBS)である、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

修飾オリゴヌクレオチドがナトリウム塩である、請求項27又は28に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、電子形式の配列表とともに提出されている。配列表は、2013年10月14日に作成された、184KbのサイズのB I O L 0 2 1 1 W O S E Q . t x t と題され

10

20

30

40

50

るファイルとして提供される。配列表の電子形式での情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

動物におけるC9ORF72 mRNAおよびタンパク質の発現を低減させるための組成物および方法が提供される。そのような方法は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、前頭側頭型認知症(FTD)、大脳皮質基底核変性症(cortical basal degeneration syndrome)(CBD)、非定型パーキンソン症候群、およびオリーブ橋小脳変性症(olivopontocerebellar degeneration)(OPCD)を含む、神経変性疾患の治療、予防、または緩和に有用である。

【背景技術】

10

【0003】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、典型的には症状の発生から2~3年以内に呼吸器不全により死に至る、進行性麻痺を臨床特徴とする、致命的な神経変性疾患である(Roland and Schneider, N. Engl. J. Med., 2001, 344, 1688-1700)。ALSは、西欧諸国で3番目に多い神経変性疾患であり(Hirtz et al., Neurology, 2007, 68, 326-337)、現在のところ有効な治療法はない。症例のおおよそ10%は家系性であるが、この疾患と診断された患者の大部分は、集団全体にわたり不規則に発生するとみられるため、孤発性として分類される(Chio et al., Neurology, 2008, 70, 533-537)。臨床的、遺伝子、および疫学的データに基づいて、ALSおよび前頭側頭型認知症(FTD)が、中枢神経系全体を通して含まれるTDP-43陽性の存在により病理学的に特徴付けられる、一連の重複する疾患を表すという認識が高まっている(Lillo and Hodges, J. Clin. Neurosci., 2009, 16, 1131-1135、Neumann et al., Science, 2006, 314, 130-133)。

20

【0004】

現在までに、古典的な家系性ALSの原因として、いくつかの遺伝子、例えば、SOD1、TARDBP、FUS、OPTN、およびVCPが、発見されている(Johnson et al., Neuron, 2010, 68, 857-864、Kwiatkowski et al., Science, 2009, 323, 1205-1208、Maruyma et al., Nature, 2010, 465, 223-226、Rosser et al., Nature, 1993, 362, 59-62、Sreedharan et al., Science, 2008, 319, 1668-1672、Vance et al., Brain, 2009, 129, 868-876)。近年、ALS、FTD、およびALS-FTDの複数の症例を含む家系の連鎖分析により、この疾患にとって重要な遺伝子座が染色体9の短腕に存在していたことが示唆された(Boxer et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 2011, 82, 196-203、Morita et al., Neurology, 2006, 66, 839-844、Pearson et al., J. Neurol., 2011, 258, 647-655、Vance et al., Brain, 2006, 129, 868-876)。染色体9p21ALS-FTDの遺伝子座には最後の主要な常染色体優性遺伝の遺伝子が含まれ、その突然変異が、ALSの原因である。ALS-FTDの原因となる突然変異は、C9ORF72遺伝子の最初のイントロンにおける大きなヘキサヌクレオチド(GGGGCC)反復伸長である(Renton et al., Neuron, 2011, 72, 257-268、DeJesus-Hernandez et al., Neuron, 2011, 72, 245-256)。C9ORF72遺伝子を包含する創始ハプロタイプが、この領域と関連する症例の大部分に存在する(Renton et al., Neuron, 2011, 72, 257-268)。染色体9p21上のこの遺伝子座は、405人のフィンランドの患者のコホートにおいて家系性ALSの半数近くおよびすべてのALS症例の4分の1近くを占める(Laaksovirta

30

40

50

et al, Lancet Neurol., 2010, 9, 978 - 985)。

【0005】

C9ORF72遺伝子を包含する創始ハプロタイプが、この領域と関連する症例の大部分に存在する。

【0006】

現在のところ、そのような神経変性疾患を治療するのに効果的な治療法は存在しない。したがって、そのような神経変性疾患の治療のための組成物および方法を提供することが目的である。

【発明の概要】

【0007】

10

細胞、組織、および動物におけるC9ORF72 mRNAおよびタンパク質のレベルを調節するための組成物および方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、C9ORF72特異的阻害剤は、C9ORF72 mRNAおよびタンパク質の発現を調節する。ある特定の実施形態において、C9ORF72特異的阻害剤は、核酸、タンパク質、または小分子である。

【0008】

ある特定の実施形態において、調節は、細胞または組織において起こり得る。ある特定の実施形態において、細胞または組織は、動物におけるものである。ある特定の実施形態において、動物は、ヒトである。ある特定の実施形態において、C9ORF72 mRNAレベルが低減される。ある特定の実施形態において、C9ORF72タンパク質レベルが低減される。ある特定の実施形態において、ある特定のC9ORF72 mRNA変異体が、選択的に低減される。ある特定の実施形態において、選択的に低減されるC9ORF72 mRNA変異体は、イントロン1を含有する変異体である。ある特定の実施形態において、イントロン1は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、C9ORF72関連疾患と関連する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、C9ORF72ヘキサヌクレオチド反復伸長関連疾患と関連する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、少なくとも30個のGGGGCC反復を含む。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、核内フォーカスと関連する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物および方法は、C9ORF72 mRNAレベル、C9ORF72タンパク質レベル、および核内フォーカスの低減に有用である。そのような低減は、時間依存性様式または用量依存性様式で生じ得る。

20

【0009】

C9ORF72と関連する疾患、障害、および状態の予防、治療、および緩和に有用な方法もまた、提供される。ある特定の実施形態において、C9ORF72と関連するそのような疾患、障害、および状態は、神経変性疾患である。ある特定の実施形態において、神経変性疾患は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、前頭側頭型認知症(FTD)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、非定型パーキンソン症候群、およびオリーブ橋小脳変性症(OPCD)である。

30

【0010】

40

そのような疾患、障害、および状態は、1つ以上の危険因子、原因、または予後を共通して有し得る。神経変性疾患ならびに特にALSおよびFTDの発症に関するある特定の危険因子および原因には、遺伝的素因および加齢が含まれる。

【0011】

ある特定の実施形態において、治療の方法は、C9ORF72特異的阻害剤を、それを必要とする個体に投与することを含む。ある特定の実施形態において、C9ORF72特異的阻害剤は、核酸である。ある特定の実施形態において、核酸は、アンチセンス化合物である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、C9ORF72核酸に相補的である。

50

【発明を実施するための形態】

【0012】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明のいずれも、例示的および説明的なものにすぎず、特許請求される本発明を限定するものではないことを理解されたい。本明細書に使用される際、単数形の使用は、別段の指示がない限り、複数形を含む。本明細書に使用される際、「または」は、別段の指示がない限り、「および/または」を意味する。加えて、本明細書に使用される際、「および」は、別段の指示がない限り、「および/または」を意味する。さらに、用語「含む（inc luding）」ならびに「含む（inc ludes）」および「含まれる」等の他の形態の使用も限定的なものではない。また、「要素」または「構成要素」等の用語は、別段の指示がない限り、1つのユニットを含む要素および構成要素と、2つ以上のサブユニットを含む要素および構成要素の両方を包含する。

10

【0013】

本明細書で使用される項目見出しへは、構成的な目的のためでしかなく、説明される主題を限定すると解釈すべきではない。特許、特許出願、公開特許出願、論文、本、専門書、ならびに国立生物工学情報センター（NCBI）等のデータベースを通して得ることができるGENBANK受託番号および関連する配列情報、ならびに本開示全体を通して参照される他のデータを含むがこれらに限定されない、本開示に引用されるすべての文献または文献の一部は、本明細書において、本明細書に記載される文献の一部の参照により、ならびにその全体が明示的に組み込まれる。

20

【0014】

定義

特定の定義がなされない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、医学および薬化学と関連して利用される命名法、ならびにそれらの手順および技法は、当技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。標準的技法が、化学合成および化学分析に使用され得る。

【0015】

別段の指示がない限り、次の用語は、次の意味を有する。

【0016】

30

「2'-O-メトキシエチル基」（2'-MOEおよび2'-OCH₂CH₂-OCH₃およびMOEも同様）とは、フラノシリ環の2'位のO-メトキシ-エチル修飾を指す。2'-O-メトキシエチル修飾糖は、修飾糖である。

【0017】

「2'-MOEヌクレオシド」（2'-O-メトキシエチルヌクレオシドも同様）とは、2'-O-メトキシエチル基を含むヌクレオシドを意味する。

【0018】

「5'-メチルシトシン」とは、メチル基が5'位に付着して修飾されたシトシンを意味する。5'-メチルシトシンは、修飾核酸塩基である。

【0019】

40

「約」は、値の±7%内を意味する。例えば、「化合物は、少なくとも約70%のC9ORF72の阻害に影響を及ぼした」と記載される場合、C9ORF72のレベルが、63%~77%の範囲内で阻害されることを暗に意味する。

【0020】

「同時に投与される」とは、両方の薬理学的效果が患者において同時に顕現される任意の様式での2つの薬学的薬剤の共投与を指す。同時投与は、両方の薬学的薬剤が、単一の薬学的組成物で、同一剤形で、または同一投与経路によって、投与されることを必要とするものではない。両方の薬学的薬剤の効果が、同時に顕現される必要はない。その効果はある時間期間の間だけ重複すればよく、共存する必要はない。

【0021】

50

「投与する」とは、動物に薬学的薬剤を提供することを意味し、医療専門家および自己投与による投与を含むが、これらに限定されない。

【0022】

「緩和」または「緩和する (ameliorate)」または「緩和する (ameliorating)」とは、疾患、障害、または状態の少なくとも1つの指標、兆候、または症状を軽減することを指す。指標の重症度は、当業者に既知である主観的または客観的手段により決定され得る。

【0023】

「動物」とは、ヒトまたは限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、および限定されないがサルおよびチンパンジーを含む非ヒト霊長動物、を含む、非ヒト動物を指す。

10

【0024】

「抗体」とは、抗原と特異的に何らかの反応をすることを特徴とする分子を指し、抗体および抗原は、それぞれ他方の観点から定義される。抗体は、完全抗体分子またはその任意の断片もしくは領域、例えば、重鎖、軽鎖、Fab領域、およびFc領域を指し得る。

【0025】

「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物のその標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因する、任意の検出可能または測定可能な活性を意味する。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性は、標的核酸、またはそのような標的核酸によってコードされるタンパク質の量または発現における減少である。

20

【0026】

「アンチセンス化合物」とは、水素結合を介して標的核酸にハイブリダーセーションすることが可能なオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物の例としては、一本鎖および二本鎖化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、ssRNA、および占有率に基づく化合物が挙げられる。アンチセンス機序には、限定することなく、RNase H媒介性アンチセンス；RIC経路を利用し、限定することなく、siRNA、ssRNA、およびマイクロRNA機序を含む、RNAi機序；ならびに、限定することなく、一様修飾オリゴヌクレオシドを含む、占有率に基づく機序が挙げられる。ある特定のアンチセンス化合物は、1つを上回るそのような機序を通じて、および/または追加の機序を通じて、作用し得る。

30

【0027】

「アンチセンス阻害」とは、アンチセンス化合物の不在下における標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルと比較して、標的核酸に相補的なアンチセンス化合物の存在下における標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルの低減を意味する。阻害は、RNase H分解（例えば、ギャップマー（gapmer）による）および立体障害（例えば、一様修飾オリゴヌクレオシドによる）を含む、任意の手段であり得る。

【0028】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的核酸の対応するセグメントとのハイブリダイゼーションを可能にする核酸塩基配列を有する、一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

40

【0029】

「二環式糖」とは、2つの原子の架橋によって修飾されるフラノシリ環を意味する。二環式糖は、修飾糖である。

【0030】

「二環式ヌクレオシド」（同様にBNA）とは、糖環の2つの炭素原子を接続する架橋を含む糖部分を有し、それによって、二環式環系を形成する、ヌクレオシドを意味する。ある特定の実施形態において、架橋は、糖環の4'炭素と2'炭素とを接続する。

【0031】

「C9ORF72関連疾患」とは、任意のC9ORF72核酸またはその発現産物と関連する任意の疾患を意味する。そのような疾患には、神経変性疾患が含まれ得る。そのよ

50

うな神経変性疾患には、A L S および F T D が含まれ得る。

【 0 0 3 2 】

「C 9 O R F 7 2 ヘキサヌクレオチド反復伸長関連疾患」とは、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有するC 9 O R F 7 2 核酸と関連する任意の疾患を意味する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、少なくとも30回反復されるG G G G C C、G G G G G G、G G G G G C、またはG G G G C G を含み得る。そのような疾患には、神経変性疾患が含まれ得る。そのような神経変性疾患には、A L S および F T D が含まれ得る。

【 0 0 3 3 】

「C 9 O R F 7 2 核酸」とは、C 9 O R F 7 2 をコードする任意の核酸を意味する。例えば、ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7 2 核酸には、C 9 O R F 7 2 をコードするD N A 配列、C 9 O R F 7 2 をコードするD N A (イントロンおよびエクソンを含むゲノムD N A を含む)から転写されるR N A 配列、およびC 9 O R F 7 2 をコードするm R N A 配列が含まれる。「C 9 O R F 7 2 m R N A」とは、C 9 O R F 7 2 タンパク質をコードするm R N A を意味する。

【 0 0 3 4 】

「C 9 O R F 7 2 特異的阻害剤」とは、分子レベルでC 9 O R F 7 2 m R N A および / またはC 9 O R F 7 2 タンパク質の発現を特異的に阻害することができる任意の薬剤を指す。例えば、C 9 O R F 7 2 特異的阻害剤には、C 9 O R F 7 2 m R N A および / またはC 9 O R F 7 2 タンパク質の発現を阻害することができる核酸 (アンチセンス化合物を含む)、s i R N A、アブタマー、抗体、ペプチド、小分子、および他の薬剤が含まれる。同様に、ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7 2 特異的阻害剤は、動物における他の分子過程に影響を及ぼし得る。

【 0 0 3 5 】

「キャップ構造」または「末端キャップ部分」とは、アンチセンス化合物の両方の末端に組み込まれている化学修飾を意味する。

【 0 0 3 6 】

「c E t」または「拘束エチル (c o n s t r a i n e d e t h y l)」とは、4' 炭素と2' 炭素とを接続する架橋を含む糖部分を有する二環式ヌクレオシドを意味し、ここで、架橋は式4' - C H (C H₃) - O - 2' を有する。

【 0 0 3 7 】

「拘束エチルヌクレオシド」(同様にc E t ヌクレオシド)とは、4' - C H (C H₃) - O - 2' 架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【 0 0 3 8 】

「化学的に異なる領域」とは、ある点において、同じアンチセンス化合物の別の領域とは化学的に異なる、アンチセンス化合物の領域を指す。例えば、2' - O - メトキシエチルヌクレオシドを有する領域は、2' - O - メトキシエチル修飾を伴わないヌクレオシドを有する領域とは化学的に異なる。

【 0 0 3 9 】

「キメラアンチセンス化合物」とは、少なくとも2つの化学的に異なる領域を有するアンチセンス化合物を意味する。

【 0 0 4 0 】

「共投与」とは、2つ以上の薬学的薬剤を個体に投与することを意味する。2つ以上の薬学的薬剤は、単一の薬学的組成物に含まれてもよく、または別個の薬学的組成物に含まれてもよい。2つ以上の薬学的薬剤のそれぞれは、同じかまたは異なる投与経路を通じて投与され得る。共投与は、並列または逐次投与を包含する。

【 0 0 4 1 】

「相補性」とは、第1の核酸と第2の核酸の核酸塩基間の対合能力を意味する。

【 0 0 4 2 】

「連続する核酸塩基」とは、互いに直接隣接する核酸塩基を意味する。

10

20

30

40

50

【0043】

「希釈剤」とは、薬理学的活性を欠くが、薬学的に必要であるかまたは望ましい、組成物中の成分を意味する。例えば、注射用組成物の希釈剤は、液体、例えば、生理食塩水溶液であり得る。

【0044】

「用量」とは、単回投与または指定期間に提供される、薬学的薬剤の指定された量を意味する。ある特定の実施形態において、用量は、1、2、またはそれ以上のボーラス、錠剤、または注射で投与され得る。例えば、皮下投与が所望されるある特定の実施形態において、所望の用量は、単回注射では容易に対応されない体積を要し、したがって、所望の用量を達成するのに2回以上の注射が必要であり得る。ある特定の実施形態において、薬学的薬剤は、長期間にわたって、または連続的に、注入により投与される。用量は、1時間、1日、1週間、または1ヶ月当たりの薬学的薬剤の量として述べられ得る。

10

【0045】

「有効量」とは、薬学的薬剤を必要とする個体において所望される生理学的予後を実現するのに十分な薬学的薬剤の量を意味する。有効量は、治療される個体の健康および身体状態、治療される個体の分類学的な群、組成物の配合、個体の病状の評価、および他の関連要因に応じて、個体間で変動し得る。

【0046】

「発現」とは、C9ORF72遺伝子からの情報が、転写を介してmRNAに変換された後、翻訳を介してタンパク質に変換されることを意味する。発現は、C9ORF72遺伝子の表現型出現をもたらし得る。

20

【0047】

「完全に相補的」または「100%相補的」とは、第1の核酸のそれぞれの核酸塩基が、第2の核酸において相補的な核酸塩基を有することを意味する。ある特定の実施形態において、第1の核酸はアンチセンス化合物であり、標的核酸が第2の核酸である。

【0048】

「ギャップマー」とは、RNase H切断を支持する複数のヌクレオシドを有する内部領域が、1つ以上のヌクレオシドを有する外部領域間に位置付けられる、キメラアンチセンス化合物を意味し、ここで、内部領域を有するヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシド（複数可）とは化学的に異なる。内部領域は、「ギャップ」と称され得、外部領域は、「ウイング」と称され得る。

30

【0049】

「ギャップ縮小」とは、1～6個のヌクレオシドを有する5'および3'ウイングセグメントの間に、かつそれらに直接隣接して位置付けられる、9個以下の連続する2' - デオキシリボヌクレオシドのギャップセグメントを有するキメラアンチセンス化合物を意味する。

【0050】

「ギャップ拡張」とは、1～6個のヌクレオシドを有する5'および3'ウイングセグメントの間に、かつそれらに直接隣接して位置付けられる、12個以上の連続する2' - デオキシリボヌクレオシドのギャップセグメントを有するキメラアンチセンス化合物を意味する。

40

【0051】

「ヘキサヌクレオチド反復伸長」とは、少なくとも2回繰り返される、一連の6個の塩基（例えば、GGGGGCC、GGGGGGG、GGGGGCG、またはGGGGGCC）を意味する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、C9ORF72核酸のイントロン1に位置し得る。ある特定の実施形態において、病因となるヘキサヌクレオチド反復伸長としては、C9ORF72核酸中の少なくとも30回のGGGGGCC、GGGGGGG、GGGGGCG、またはGGGGGCCの反復が挙げられ、これが、疾患と関連する。ある特定の実施形態において、反復は連続的である。ある特定の実施形態において、反復は、1つ以上の核酸塩基によって中断される。ある特定の実施形態において、野生

50

型ヘキサヌクレオチド反復伸長には、C 9 O R F 7 2 核酸中の 2 3 回以下の G G G G C C 、 G G G G G G 、 G G G G C G 、または G G G G G C の反復が含まれる。ある特定の実施形態において、反復は連続的である。ある特定の実施形態において、反復は、1 つ以上の核酸塩基によって中断される。

【0052】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。ある特定の実施形態において、相補的核酸分子は、アンチセンス化合物および標的核酸を含む。

【0053】

「C 9 O R F 7 2 関連疾患を有する動物を識別する」とは、C 9 O R F 7 2 関連疾患と診断されているか、または C 9 O R F 7 2 関連疾患を発症する傾向にある動物を識別することを意味する。C 9 O R F 7 2 関連疾患を発症する傾向にある個体には、1 つ以上の C 9 O R F 7 2 関連疾患の個人歴もしくは家族歴または遺伝的素因を有することを含む、C 9 O R F 7 2 関連疾患を発症する 1 つ以上の危険因子を有するものが含まれる。そのような識別は、個体の病歴を評価すること、および標準的な臨床試験もしくは評価、例えば遺伝子検査を含む、任意の方法によって達成することができる。

10

【0054】

「直接隣接する」とは、直接隣接する要素間に、介在要素が存在しないことを意味する。

【0055】

「個体」とは、治療または療法のために選択されたヒトまたは非ヒト動物を意味する。

20

【0056】

「C 9 O R F 7 2 を阻害する」とは、C 9 O R F 7 2 アンチセンスオリゴヌクレオチド等の C 9 O R F 7 2 特異的阻害剤の不在下における C 9 O R F 7 2 m R N A および/またはタンパク質の発現のレベルと比較して、C 9 O R F 7 2 アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む C 9 O R F 7 2 特異的阻害剤の存在下における C 9 O R F 7 2 m R N A および/またはタンパク質の発現のレベルの低減を意味する。

【0057】

「ヌクレオシド間結合」とは、ヌクレオシドの間の化学結合を指す。

【0058】

「結合したヌクレオシド」とは、一緒に結合した隣接するヌクレオチドを意味する。

30

【0059】

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

【0060】

「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換または任意の変化を指す。

【0061】

「修飾核酸塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、またはウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。「非修飾核酸塩基」とは、プリン塩基であるアデニン（A）およびグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）を意味する。

40

【0062】

「修飾ヌクレオチド」とは、独立して、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、および/または修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。「修飾ヌクレオシド」とは、独立して、修飾糖部分および/または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

【0063】

「修飾オリゴヌクレオチド」とは、修飾ヌクレオシド間結合、修飾糖、または修飾核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

【0064】

「修飾糖」とは、天然糖からの置換または変化を指す。

50

【0065】

「モチーフ」とは、アンチセンス化合物における化学的に異なる領域のパターンを意味する。

【0066】

「天然に存在するヌクレオシド間結合」とは、3'から5'のホスホジエステル結合を意味する。

【0067】

「天然糖部分」とは、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)に見られる糖を意味する。

【0068】

「核酸」とは、モノマヌクレオチドから構成される分子を指す。核酸には、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、一本鎖核酸、二本鎖核酸、低分子干渉リボ核酸(sirNA)、およびマイクロRNA(miRNA)が含まれる。

10

【0069】

「核酸塩基」とは、別の核酸の塩基と対応することができる複素環式部分を意味する。

【0070】

「核酸塩基配列」とは、いずれの糖、結合、または核酸塩基修飾とも無関係な連続する核酸塩基の順序を意味する。

【0071】

「ヌクレオシド」は、糖に結合した核酸塩基を意味する。

20

【0072】

「ヌクレオシド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において、糖または糖および塩基を置換するために使用され、必ずしも結合ではない構造を含み、例えば、例として非フラノース糖単位である、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、二環または三環糖模倣体を有するヌクレオシド模倣体等である。「ヌクレオチド模倣体」は、例えば、ペプチド核酸またはモルホリノ(-N(H)-C(=O)-O-または他の非ホスホジエステル結合によって結合されるモルホリノ)等のオリゴマー化合物の1つ以上の位置において、ヌクレオシドおよび結合を置き換えるために使用される構造を含む。糖代替物は、わずかに広義であるヌクレオシド模倣体という用語と重なるが、糖単位(フラノース環)のみの置き換えを指すことを意図する。本明細書に提供されるテトラヒドロピラニル環は、糖代替物の例を示すものであり、フラノース糖基が、テトラヒドロピラニル環系で置き換えられている。

30

【0073】

「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合したヌクレオシドを意味する。

【0074】

「オリゴマー化合物」または「オリゴマー」とは、核酸分子の少なくとも一領域とハイブリダイズすることができる、結合したモノマーサブユニットのポリマーを意味する。

【0075】

「オリゴヌクレオチド」とは、結合したヌクレオシドのポリマーであって、そのそれぞれが、互いに独立して修飾または非修飾であり得る、結合したヌクレオシドのポリマーを意味する。

40

【0076】

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

【0077】

「ペプチド」とは、アミド結合によって少なくとも2つのアミノ酸を結合することによって形成される分子を意味する。ペプチドとは、ポリペプチドおよびタンパク質を指す。

【0078】

50

「薬学的薬剤」とは、個体に投与されると治療的利益を提供する、薬学的組成物中の物質（複数可）を意味する。例えば、ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7 2 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、薬学的薬剤である。

【0079】

「薬学的組成物」とは、個体に投与するのに好適な物質の混合物を意味する。例えば、薬学的組成物は、1つ以上の薬学的薬剤および滅菌水溶液を含み得る。

【0080】

「薬学的に許容される誘導体」は、本明細書に記載される化合物の薬学的に許容される塩、複合体、プロドラッグ、または異性体を包含する。

【0081】

「薬学的に許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的および薬学的に許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの所望される生物学的活性を保持し、それに望ましくない毒性作用を付与しない塩を意味する。

【0082】

「ホスホロチオエート結合」とは、ホスホジエステル結合が、非架橋酸素原子のうちの1つを硫黄原子と置き換えることによって修飾される、ヌクレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合 (P = S) は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【0083】

「部分」とは、核酸の一定数の連続する（すなわち、結合した）核酸塩基を意味する。ある特定の実施形態において、ある部分は、標的核酸の一定数の連続する核酸塩基である。ある特定の実施形態において、ある部分は、アンチセンス化合物の一定数の連続する核酸塩基である。

【0084】

「予防する (prevent)」または「予防する (preventing)」とは、数分から不確定の期間の間、疾患、障害、または状態の発症または発達を遅延するまたは未然に防ぐことを指す。予防するはまた、疾患、障害、または状態を発症する危険性を低減することを意味する。

【0085】

「プロドラッグ」とは、不活性形態で調製され、体内またはその細胞内において、内在性酵素または他の化学物質もしくは条件の作用によって、活性形態に変換される、治療剤を意味する。

【0086】

「副作用」とは、所望の効果以外の治療に起因する生理学的応答を意味する。ある特定の実施形態において、副作用には、注射部位の反応、肝機能試験異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、ミオパシー、および倦怠感が含まれる。

【0087】

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

【0088】

「特異的にハイブリダイズできる」とは、所望の効果を誘導するのに十分な程度の相補性をアンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間に有し、同時に特異的結合が所望される条件下、すなわち、インビボアッセイおよび治療的治療の場合には生理学的条件下で、非標的核酸に対する効果を最小限に示すかまたは全く示さない、アンチセンス化合物を指す。

【0089】

「標的とする」または「標的とされる」とは、標的核酸に特異的にハイブリダイズして所望の効果を誘導する、アンチセンス化合物の設計および選択の過程を意味する。

【0090】

「標的核酸」、「標的RNA」、および「標的RNA転写産物」とは、すべて、アンチセンス化合物によって標的とされ得る核酸を指す。

10

20

30

40

50

【0091】

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

【0092】

「治療有効量」とは、個体に治療利益をもたらす薬学的薬剤の量を意味する。

【0093】

「治療する (treat)」または「治療する (treating)」とは、疾患、障害、または状態の変化または改善を達成するために、薬学的組成物を投与することを指す。

【0094】

「非修飾ヌクレオチド」とは、天然に存在する核酸塩基、糖部分、およびヌクレオシド間結合から構成されるヌクレオチドを意味する。ある特定の実施形態において、非修飾ヌクレオチドは、RNAヌクレオチド（すなわち、-D-リボヌクレオシド）またはDNAヌクレオチド（すなわち、-D-デオキシリボヌクレオシド）である。

【0095】

ある特定の実施形態

ある特定の実施形態は、C9ORF72 mRNAおよびタンパク質の発現を減少させるための方法を提供する。

【0096】

ある特定の実施形態は、C9ORF72と関連する疾患、障害、および状態の治療、予防、または緩和を、それを必要とする個体に行うための方法を提供する。C9ORF72と関連する疾患、障害、または状態の治療、予防、または緩和のための医薬品の調製のための方法もまた、企図される。C9ORF72関連疾患、障害、および状態には、神経変性疾患が含まれる。ある特定の実施形態において、神経変性疾患は、ALSまたはFTDであり得る。ある特定の実施形態において、神経変性疾患は、家系性または孤発性であり得る。

【0097】

ある特定の実施形態は、C9ORF72関連疾患を治療、予防、または緩和するためのC9ORF72特異的阻害剤の使用を提供する。ある特定の実施形態は、C9ORF72ヘキサヌクレオチド反復伸長関連疾患を治療、予防、または緩和するためのC9ORF72特異的阻害剤の使用を提供する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、GGGGGCC、GGGGGG、GGGGGGC、またはGGGGCGを含み得る。ある特定の実施形態において、C9ORF72特異的阻害剤は、C9ORF72 mRNAおよび/またはC9ORF72タンパク質の発現を阻害することができる核酸（アンチセンス化合物を含む）、ペプチド、抗体、小分子、および他の薬剤である。

【0098】

C9ORF72核酸またはC9ORF72相同核酸に相補的な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む化合物が、本明細書に記載される。

【0099】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸は、ヒトC9ORF72核酸である。

【0100】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する。

【0101】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有しない。

【0102】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC90R F72核酸に特異的にハイブリダイズする。

【0103】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC90R F72核酸の等長部分に少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である。

【0104】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC90R F72核酸のエクソン、イントロン、5'UTR、3'UTR、反復領域、スプライスジャンクション、エクソン：エクソンスプライスジャンクション、エクソンスプライシングサイレンサー（ESS）、エクソンスプライシングエンハンサー（ESE）、エクソン1a、エクソン1b、エクソン1c、エクソン1d、エクソン1e、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、イントロン1、イントロン2、イントロン3、イントロン4、イントロン5、イントロン6、イントロン7、イントロン8、イントロン9、またはイントロン10のうちのいずれかに相補的である。

【0105】

12～30個の結合したヌクレオシドからなり、配列番号30～369の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、化合物が、本明細書に記載される。

【0106】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む。

【0107】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。

【0108】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【0109】

ある特定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0110】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。

【0111】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖を有する少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。

【0112】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、二環式糖を含む少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。

【0113】

ある特定の実施形態において、二環式糖は、4'-(CH₂)_n-O-2'架橋（式中、nは1または2である）および4'-CH₂-O-CH₂-2'から選択される、4'~2'架橋を含む。

【0114】

ある特定の実施形態において、二環式糖は、4'-CH(CH₃)-O-2'架橋を含む。

10

20

30

40

50

【0115】

ある特定の実施形態において、修飾糖を有する少なくとも1つの修飾ヌクレオシドは、非二環式の2'修飾された修飾糖部分を含む。

【0116】

ある特定の実施形態において、2'修飾糖部分は、2' - O - メトキシエチル基を含む。

【0117】

ある特定の実施形態において、2'修飾糖部分は、2' - O - メチル基を含む。

【0118】

ある特定の実施形態において、修飾糖を有する少なくとも1つの修飾ヌクレオシドは、
10 糖代替物を含む。

【0119】

ある特定の実施形態において、糖代替物は、モルホリノである。

【0120】

ある特定の実施形態において、糖代替物は、ペプチド核酸である。

【0121】

ある特定の実施形態において、各ヌクレオシドは、修飾される。

【0122】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも
10 1つの修飾核酸塩基を含む。

20

【0123】

ある特定の実施形態において、修飾核酸塩基は、5' - メチルシトシンである。

【0124】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、
結合したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
結合したヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント
結合したヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント、を含み、
ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントおよび3'ウイングセグメントに直接隣接して、かつそれらの間に位置付けられ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、修飾糖を含む。

30

【0125】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、
10個の結合したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
5個の結合したヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、
5個の結合したヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント、を含み、
ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントおよび3'ウイングセグメントに直接隣接して、かつそれらの間に位置付けられ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、2' - O - メトキシエチル糖を含み、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0126】

40

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、15個の結合したヌクレオシドからなる。

【0127】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、16個の結合したヌクレオシドからなる。

【0128】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、17個の結合したヌクレオシドからなる。

【0129】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、18個の結

50

合したヌクレオシドからなる。

【0130】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、19個の結合したヌクレオシドからなる。

【0131】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20個の結合したヌクレオシドからなる。

【0132】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、21個の結合したヌクレオシドからなる。

10

【0133】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、22個の結合したヌクレオシドからなる。

【0134】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、23個の結合したヌクレオシドからなる。

【0135】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、24個の結合したヌクレオシドからなる。

【0136】

ある特定の実施形態において、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、25個の結合したヌクレオシドからなる。

20

【0137】

神経変性疾患を治療するための医薬品の製造のための化合物の使用が、本明細書に記載される。

【0138】

細胞を、エクソン1Bの上流を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることによって、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有するmRNA転写産物の発現を選択的に阻害する方法が、本明細書に提供される。

30

【0139】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣体、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、およびsiRNAが含まれるが、これらに限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して「アンチセンス」であり得、これは、水素結合を介して標的核酸へのハイブリダイゼーションを受けることができるることを意味する。

【0140】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、5'から3'の方向に書かれると、それが標的とする、標的核酸の標的セグメントの逆補体を含む、核酸塩基配列を有する。ある特定のそのような実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'から3'の方向に書かれると、それが標的とする、標的核酸の標的セグメントの逆補体を含む、核酸塩基配列を有する。

40

【0141】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが12から30サブユニットである。換言すると、そのようなアンチセンス化合物は、12～30個の結合したサブユニットである。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、8～80、12～50、15～30、18～24、19～22、または20個の結合したサブユニットである。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、長さが8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、

50

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、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80個の結合したサブユニットであるか、または上述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲である。いくつかの実施形態において、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、結合したサブユニットは、ヌクレオシドである。

【0142】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、短縮または切除されてもよい。例えば、単一のサブユニットが、5'末端から欠失してもよく(5'切除)、または代替として3'末端から欠失してもよい(3'切除)。C9ORF72核酸を標的とする短縮または切除されたアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の2つのサブユニットが5'末端から欠失していてもよく、または代替として、2つのサブユニットが、3'末端から欠失していてもよい。あるいは、欠失したヌクレオシドは、アンチセンス化合物全体に分散していてもよく、例えば、あるアンチセンス化合物では、1つのヌクレオシドが5'末端から欠失しており、1つのヌクレオシドが3'末端から欠失している。

【0143】

延長されたアンチセンス化合物に単一の付加サブユニットが存在する場合、付加サブユニットは、アンチセンス化合物の5'または3'末端に位置し得る。2つ以上の付加サブユニットが存在する場合、付加されたサブユニットは、互いに隣接してもよく、例えば、あるアンチセンス化合物では、2つのサブユニットが、アンチセンス化合物の5'末端に付加されている(5'付加)か、または代替として3'末端に付加されている(3'付加)。あるいは、付加されたサブユニットは、アンチセンス化合物全体に分散していてもよく、例えば、あるアンチセンス化合物では、1つのサブユニットが5'末端に付加されており、1つのサブユニットが3'末端に付加されている。

【0144】

活性を消失させることなく、アンチセンスオリゴヌクレオチド等のアンチセンス化合物の長さを増加もしくは減少させること、および/またはミスマッチ塩基を導入することが可能である。例えば、Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 7305-7309, 1992)では、長さが13~25核酸塩基の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドに、卵母細胞注射モデルにおいてそれらが標的RNAの切断を誘導する能力について試験が行われた。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端付近に8または11個のミスマッチ塩基を有する、長さが25核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含有しないアンチセンスオリゴヌクレオチドより低い程度であったが、標的mRNAの特異的な切断を指示することができた。同様に、1または3つのミスマッチを有するものを含む、13核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、標的特異的切断が達成された。

【0145】

Gautschi et al. (J. Natl. Cancer Inst. 93: 463-471, March 2001)は、bcl-2 mRNAに対して100%の相補性を有し、bcl-xL mRNAに対して3つのミスマッチを有するオリゴヌクレオチドが、インビトロおよびインビボでbcl-2およびbcl-xLの両方の発現を低減させる能力を実証した。さらに、このオリゴヌクレオチドは、インビボで強力な抗腫瘍活性を示した。

【0146】

MaherおよびDolnick (Nuc. Acid. Res. 16: 3341-3358, 1988)は、一連のタンデム14核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびに、このタンデムアンチセンスオリゴヌクレオチドのうちの2または3つの配列から

10

20

30

40

50

構成される、それぞれ 2' および 4' 核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドに、ウサギ網状赤血球アッセイにおいてそれらがヒト D H F R の翻訳を停止させる能力について、試験を行った。3 つの 1' 4 核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドのそれぞれは、2' 8 または 4' 2 核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも控えめなレベルであるものの、単独で、翻訳を阻害することができた。

【 0 1 4 7 】

アンチセンス化合物モチーフ

ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7' 2 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、阻害活性の強化、標的核酸に対する結合親和性の増加、またはインピボでのヌクレアーゼによる分解に対する耐性といった特性をアンチセンス化合物に付与する、パターンで配置される化学修飾サブユニット、またはモチーフを有する。

【 0 1 4 8 】

キメラアンチセンス化合物は、典型的に、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、標的核酸に対する結合親和性の増加、および / または阻害活性の増加を付与することができるように修飾された、少なくとも 1 つの領域を含有する。キメラアンチセンス化合物の第 2 の領域は、任意で、R N A : D N A 二重鎖の R N A 鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼ R N a s e H の基質として機能し得る。

【 0 1 4 9 】

ギャップマーモチーフを有するアンチセンス化合物は、キメラアンチセンス化合物と見なされる。ギャップマーでは、R N a s e H 切断を支持する複数のヌクレオチドを有する内部領域は、内部領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外部領域の間に位置付けられる。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ウイングセグメントが修飾ヌクレオシドを含むのに対し、ギャップセグメントは、概して、エンドヌクレアーゼ切断のための基質として機能する。ある特定の実施形態において、ギャップマーの領域は、それぞれの異なる領域を含む糖部分の種類によって区別される。ギャップマーの領域を区別するために使用される糖部分の種類としては、いくつかの実施形態では、- D - リボヌクレオシド、- D - デオキシリボヌクレオシド、2' - 修飾ヌクレオシド（そのような 2' - 修飾ヌクレオシドには、とりわけ、2' - M O E、および 2' - O - C H₃ が含まれ得る）、ならびに二環式糖修飾ヌクレオシド（そのような二環式糖修飾ヌクレオシドには、4' - (C H₂)_n - O - 2' 架橋（式中、n = 1 または n = 2 である）および 4' - C H₂ - O - C H₂ - 2' を有するものが含まれ得る）を挙げることができる。好ましくは、それぞれの異なる領域が、一様な糖部分を含む。ウイング - ギャップ - ウイングモチーフは、多くの場合、「X - Y - Z」と記載され、ここで、「X」は、5' ウイング領域の長さを表し、「Y」は、ギャップ領域の長さを表し、「Z」は、3' ウイング領域の長さを表す。本明細書に使用される際、「X - Y - Z」として記載されるギャップマーは、ギャップセグメントが、5' ウイングセグメントおよび 3' ウイングセグメントのそれぞれに直接隣接して位置付けられるような構成を有する。したがって、5' ウイングセグメントとギャップセグメントとの間、またはギャップセグメントと 3' ウイングセグメントとの間に、介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書に記載されるアンチセンス化合物のいずれも、ギャップマーモチーフを有し得る。いくつかの実施形態では、X および Z は同じであり、他の実施形態では、異なる。好ましい実施形態では、Y は、8 から 15 個のヌクレオチドである。X、Y、または Z は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、またはそれ以上のヌクレオチドのいずれかであり得る。したがって、本明細書に記載されるギャップマーには、例えば、5 - 1 0 - 5、5 - 1 0 - 4、4 - 1 0 - 4、4 - 1 0 - 3、3 - 1 0 - 3、2 - 1 0 - 2、5 - 9 - 5、5 - 9 - 4、4 - 9 - 5、5 - 8 - 5、5 - 8 - 4、4 - 8 - 5、5 - 7 - 5、4 - 7 - 5、5 - 7 - 4、または 4 - 7 - 4 が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 5 0 】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、ウイング - ギャップまたはギャップ - ウイング構成、すなわち、ギャップマー構成に関して上に記載される、X - YまたはY - Z構成を有する、「ウイングマー (wing mer)」モチーフを有する。したがって、本明細書に記載されるウイングマー構成には、例えば、5 - 10、8 - 4、4 - 12、12 - 4、3 - 14、16 - 2、18 - 1、10 - 3、2 - 10、1 - 10、8 - 2、2 - 13、5 - 13、5 - 8、または6 - 8が挙げられるが、これらに限定されない。

【0151】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5 - 10 - 5ギャップマーモチーフを有する。

【0152】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5 - 10 - 4ギャップマーモチーフを有する。

【0153】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、4 - 10 - 4ギャップマーモチーフを有する。

【0154】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、4 - 10 - 3ギャップマーモチーフを有する。

【0155】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5 - 9 - 5ギャップマーモチーフを有する。

【0156】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、ギャップ縮小モチーフを有する。ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするギャップ縮小アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5、4、3、2、または1個の化学修飾ヌクレオシドのウイングセグメントに直接隣接して、かつそれらの間に位置付けられる、9、8、7、または6個の2' - デオキシヌクレオチドのギャップセグメントを有する。ある特定の実施形態において、化学修飾は、二環式糖を含む。ある特定の実施形態において、二環式糖は、4' - (CH₂)_n - O - 2' 架橋 (式中、nは1または2である) および4' - CH₂ - O - CH₂ - 2' から選択される、4' ~ 2' 架橋を含む。ある特定の実施形態において、二環式糖は、4' - CH(CH₃) - O - 2' 架橋を含む。ある特定の実施形態において、化学修飾は、非二環式2' - 修飾糖部分を含む。ある特定の実施形態において、非二環式2' - 修飾糖部分は、2' - O - メチルエチル基または2' - O - メチル基を含む。

【0157】

ある特定の実施形態において、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、一様に修飾される。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態において、各ヌクレオシドは、化学修飾される。ある特定の実施形態において、化学修飾は、非二環式2' - 修飾糖部分を含む。ある特定の実施形態において、2' - 修飾糖部分は、2' - O - メトキシエチル基を含む。ある特定の実施形態において、2' - 修飾糖部分は、2' - O - メチル基を含む。ある特定の実施形態において、一様に修飾されたアンチセンス化合物は、C9ORF72、またはその任意の部分、例えばヘキサヌクレオチド反復伸長を標的とし得る。ある特定の実施形態において、一様に修飾されたアンチセンス化合物でヘキサヌクレオチド反復伸長を標的とすることは、RNA結合タンパク質との相互作用を阻止することにより反復RNAを低減させる。ある特定の実施形態において、これにより、結果として、毒性RNAがフォーカスに不在となり、代わりに分解される。

【0158】

10

20

30

40

50

標的核酸、標的領域、およびヌクレオチド配列

C 9 O R F 7 2 をコードするヌクレオチド配列には、限定することなく、次のものが含まれる：G E N B A N K 受託番号 N M _ 0 0 1 2 5 6 0 5 4 . 1 の補体（配列番号 1 として本明細書に組み込まれる）、核酸塩基 2 7 5 3 5 0 0 0 ~ 2 7 5 6 5 0 0 0 が切除された G E N B A N K 受託番号 N T _ 0 0 8 4 1 3 . 1 8 （配列番号 2 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 B Q 0 6 8 1 0 8 . 1 （配列番号 3 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 N M _ 0 1 8 3 2 5 . 3 （配列番号 4 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 D N 9 9 3 5 2 2 . 1 （配列番号 5 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 N M _ 1 4 5 0 0 5 . 5 （配列番号 6 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 D B 0 7 9 3 7 5 . 1 （配列番号 7 として本明細書に組み込まれる）、G E N B A N K 受託番号 B U 1 9 4 5 9 1 . 1 （配列番号 8 として本明細書に組み込まれる）、配列識別子 4 1 4 1 _ 0 1 4 _ A （配列番号 9 として本明細書に組み込まれる）、および配列識別子 4 0 0 8 _ 7 3 _ A （配列番号 1 0 として本明細書に組み込まれる）。

【 0 1 5 9 】

本明細書に含まれる実施例において、各配列番号に記載される配列は、糖部分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対するいずれの修飾とも無関係であることを理解されたい。したがって、配列番号によって定義されるアンチセンス化合物は、独立して、糖部分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対する 1 つ以上の修飾を含み得る。I s i s 番号（I s i s N o ）によって記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列およびモチーフの組み合わせを示す。

【 0 1 6 0 】

ある特定の実施形態において、標的領域は、標的核酸の構造的に定義された領域である。例えば、標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロンジャンクション、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の定義された核酸領域を包含し得る。C 9 O R F 7 2 の構造的に定義された領域は、N C B I 等の配列データベースからの受託番号により得ることができ、そのような情報は、参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態において、標的領域は、標的領域内の 1 つの標的セグメントの 5' 標的部位から、同じ標的領域内の別の標的セグメントの 3' 標的部位までの配列を包含し得る。

【 0 1 6 1 】

標的とすることには、所望の効果が生じるように、アンチセンス化合物がハイブリダイズする少なくとも 1 つの標的セグメントを決定することを含む。ある特定の実施形態において、所望の効果は、m R N A 標的核酸レベルの低減である。ある特定の実施形態において、所望の効果は、標的核酸によってコードされるタンパク質のレベルの低減、または標的核酸と関連する表現型の変化である。

【 0 1 6 2 】

標的領域は、1 つ以上の標的セグメントを含有し得る。標的領域内の複数の標的セグメントが、重複してもよい。あるいは、それらは重複しなくてもよい。ある特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、約 3 0 0 個を超えないヌクレオチドによって分離される。ある特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上のいくつかのヌクレオチド、すなわち、2 5 0 、 2 0 0 、 1 5 0 、 1 0 0 、 9 0 、 8 0 、 7 0 、 6 0 、 5 0 、 4 0 、 3 0 、 2 0 、または 1 0 個の、約これらの、これらをこえない、約これらを超えないヌクレオチド、または前述の値のうちの任意の 2 つによって定義される範囲のヌクレオチドによって、分離される。ある特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の 5 個を超えない、または約 5 個を超えないヌクレオチドによって分離される。ある特定の実施形態において、標的セグメントは、連続している。本明細書に列挙される 5' 標的部位または 3' 標的部位のいずれかである開始核酸を有する範囲によって定義される標的領域が、企図される。

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

好適な標的セグメントは、5'UTR、コード領域、3'UTR、イントロン、エクソン、またはエクソン/イントロンジャンクション内に見出され得る。開始コドンまたは終止コドンを含有する標的セグメントもまた、好適な標的セグメントである。好適な標的セグメントは、開始コドンまたは終止コドン等、ある特定の構造的に定義される領域を特異的に排除してもよい。

【0164】

好適な標的セグメントの決定には、ゲノム全体にわたって標的核酸の配列と他の配列とを比較することが含まれ得る。例えば、BLASTアルゴリズムを使用して、異なる核酸間の類似領域を識別することができる。この比較により、非特異的な様式で選択された標的核酸以外の配列（すなわち、非標的または標的外配列）にハイブリダイズし得るアンチセンス化合物配列の選択を防止することができる。

10

【0165】

標的領域内でのアンチセンス化合物の活性（例えば、標的核酸レベルの低減率によって定義される）には、変動があり得る。ある特定の実施形態において、C9ORF72 mRNAレベルの低減は、C9ORF72発現の阻害を示す。C9ORF72タンパク質のレベルの低減もまた、標的mRNA発現の阻害を示す。伸長C9ORF72RNAフォーカスの存在の低減は、C9ORF72発現の阻害を示す。さらに、表現型の変化は、C9ORF72発現の阻害を示す。例えば、運動機能および呼吸の改善は、C9ORF72発現の阻害を示し得る。

20

【0166】

ハイブリダイゼーション

いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーションが、本明細書に開示されるアンチセンス化合物とC9ORF72核酸との間に生じる。ハイブリダイゼーションの最も一般的な機序は、核酸分子の相補的核酸塩基間での水素結合（例えば、ワツソン・クリック、フーフィー・スティーン、または逆フーフィー・スティーン水素結合）を伴う。

【0167】

ハイブリダイゼーションは、多様な条件下で生じ得る。ストリンジエント条件は、配列依存性であり、ハイブリダイズされる核酸分子の性質および組成によって決定される。

【0168】

配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズできるかどうかを判定する方法は、当該技術分野で周知である。ある特定の実施形態において、本明細書に提供されるアンチセンス化合物は、C9ORF72核酸と特異的にハイブリダイズし得る。

30

【0169】

相補性

アンチセンス化合物および標的核酸は、アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合し得、所望の効果（例えば、C9ORF72核酸等の標的核酸のアンチセンス阻害）が生じるようになる場合、互いに相補的である。

【0170】

アンチセンス化合物とC9ORF72核酸との間の非相補的な核酸塩基は耐容され得るが、ただし、アンチセンス化合物が標的核酸に特異的にハイブリダイズすることができるままであることを条件とする。さらに、アンチセンス化合物は、介在または隣接セグメント（例えば、ループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造）が、ハイブリダイゼーション事象に関与しないように、C9ORF72核酸の1つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズし得る。

40

【0171】

ある特定の実施形態において、本明細書に提供されるアンチセンス化合物、またはその特定の部分は、C9ORF72核酸、標的領域、標的セグメント、またはその特定の部分に70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%

50

、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相補的であるか、または少なくともこれらの割合で相補的である。アンチセンス化合物と標的核酸との相補性パーセントは、日常的な方法を使用して決定され得る。

【0172】

例えば、アンチセンス化合物の20個の核酸塩基中18個が標的領域に相補的であり、したがって、特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性を表すであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は、密集していても、相補的核酸塩基とともに分散されてもよく、互いに、または相補的核酸塩基に連続している必要はない。したがって、長さが18核酸塩基であり、標的核酸と完全に相補性の2つの領域が隣接する4つの(4)非相補的核酸塩基を有するアンチセンス化合物は、標的核酸と77.8%の全体的な相補性を有し、そのため、本発明の範囲内に含まれるであろう。アンチセンス化合物と標的核酸の領域との相補性パーセントは、当該技術分野で既知のBLASTプログラム(基本的なローカルアライメント検索ツール)およびPowerBLASTプログラムを使用して、日常的に決定され得る(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)。相同性、配列同一性、または相補性パーセントは、例えば、初期設定を使用して、SmithおよびWatermannのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を用いるGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)によって判定することができる。

【0173】

ある特定の実施形態において、本明細書に提供されるアンチセンス化合物またはその特定の部分は、標的核酸またはその特定の部分に完全に相補的(すなわち、100%相補的)である。例えば、アンチセンス化合物は、C9ORF72核酸、またはその標的領域、または標的セグメント、または標的配列に完全に相補的であり得る。本明細書に使用される際、「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と正確に塩基対合できることを意味する。例えば、20核酸塩基のアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物に完全に相補的な標的核酸の対応する20核酸塩基部分が存在する限り、400核酸塩基長である標的配列に完全に相補的である。完全に相補的とは、第1および/または第2の核酸の特定の部分を参照して使用することもできる。例えば、30核酸塩基のアンチセンス化合物の20核酸塩基部分は、400核酸塩基長の標的配列に「完全に相補的」であり得る。30核酸塩基のオリゴヌクレオチドの20核酸塩基部分は、標的配列が対応する20核酸塩基部分を有する場合、標的配列に完全に相補的であり、ここで、各核酸塩基は、アンチセンス化合物の20核酸塩基部分に相補的である。同時に、30核酸塩基のアンチセンス化合物全体は、アンチセンス化合物の残りの10核酸塩基もまた標的配列に相補的かどうかに応じて、標的配列に完全に相補的であり得るか、またはそうでない場合もある。

【0174】

非相補的核酸塩基の位置は、アンチセンス化合物の5'末端または3'末端であり得る。あるいは、非相補的核酸塩基(複数可)は、アンチセンス化合物の内部位置にあってもよい。2つ以上の非相補的核酸塩基が存在する場合、それらは、連続する(すなわち、結合する)か、または非連続であり得る。一実施形態において、非相補的核酸塩基は、ギャップマークアンチセンスオリゴヌクレオチドのウイングセグメントに位置する。

【0175】

ある特定の実施形態において、長さが12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20核酸塩基、または最大でこれらの数の核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸、例えば、C9ORF72核酸またはその特定の部分に対して、4個を超えない、3個を超えない、2個を超えない、または1個を超えない非相補的核酸塩基(複

数可)を含む。

【0176】

ある特定の実施形態において、長さが12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基であるか、または最大でこれらの数の核酸塩基であるアンチセンス化合物は、標的核酸、例えば、C9ORF72核酸、またはその特定の部分に対して、6個を超えない、5個を超えない、4個を超えない、3個を超えない、2個を超えない、または1個を超えない非相補的核酸塩基(複数可)を含む。

【0177】

本明細書に提供されるアンチセンス化合物には、標的核酸の一部分に相補的なものも含まれる。本明細書に使用される際、「部分」とは、標的核酸の領域またはセグメント内の一定数の連続する(すなわち、結合した)核酸塩基を指す。「部分」はまた、アンチセンス化合物の一定数の連続する核酸塩基も指し得る。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも8核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも9核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも10核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも11核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも12核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも13核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも14核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも15核酸塩基部分に相補的である。標的セグメントの少なくとも9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれ以上、またはこれらの値のうちの任意の2つによって定義される範囲の核酸塩基部分に相補的である、アンチセンス化合物もまた企図される。

【0178】

同一性

本明細書に提供されるアンチセンス化合物はまた、特定のヌクレオチド配列、配列番号、または特定のI₅I₅番号によって表される化合物もしくはその部分に対して、一定の同一性パーセントを有し得る。本明細書に使用される際、アンチセンス化合物は、同じ核酸塩基対合能力を有する場合、本明細書に開示される配列と同一である。例えば、開示されるDNA配列において、チミジンの代わりにウラシルを含有するRNAは、ウラシルとチミジンのいずれもアデニンと対合するため、このDNA配列に同一であると見なされる。本明細書に記載されるアンチセンス化合物の短縮または延長されたバージョン、ならびに本明細書に提供されるアンチセンス化合物に対して非同一塩基を有する化合物もまた、企図される。非同一塩基は、互いに隣接していてもよく、またはアンチセンス化合物全体に分散していてもよい。アンチセンス化合物の同一性パーセントは、比較される配列に対して同一の塩基対合を有する塩基の数に従って計算される。

【0179】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物またはその部分は、本明細書に開示されるアンチセンス化合物もしくは配列番号、またはそれらの部分のうちの1つ以上に、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。

【0180】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物の一部分を、標的核酸の等長部分と比較する。ある特定の実施形態において、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸の等長部分と比較する。

10

20

30

40

50

【0181】

ある特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一部分を、標的核酸の等長部分と比較する。ある特定の実施形態において、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸の等長部分と比較する。

【0182】

修飾

ヌクレオシドは、塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基としても知られる）部分は、通常、複素環式塩基部分である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシリル糖を含むヌクレオシドについては、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシリル部分に結合し得る。オリゴヌクレオチドは、互いに隣接するヌクレオシドの共有結合を通じて形成され、線状のポリマー-オリゴヌクレオチドを形成する。オリゴヌクレオチド構造内で、リン酸基は、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成すると称される。

10

【0183】

アンチセンス化合物への修飾は、ヌクレオシド間結合、糖部分、または核酸塩基に対する置換または変化を包含する。修飾アンチセンス化合物は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、核酸標的に対する親和性の強化、ヌクレアーゼの存在下での安定性の増加、または阻害活性の増加といった、望ましい特性のため、天然の形態よりも好ましい。

20

【0184】

化学修飾ヌクレオシドはまた、短縮または切除されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結合親和性を増加させるために用いられる。結果として、そのような化学修飾ヌクレオシドを有するより短いアンチセンス化合物では、多くの場合、同等の結果を得ることができる。

【0185】

修飾ヌクレオシド間結合

R N A および D N A の天然に存在するヌクレオシド間結合は、3'から5'のホスホジエステル結合である。1つ以上の修飾された、すなわち、天然に存在しない、ヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの強化、標的核酸に対する親和性の強化、およびヌクレアーゼの存在下での安定性の増加といった望ましい特性のため、天然に存在するヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物に優って選択される。

30

【0186】

修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を保持するヌクレオシド間結合、ならびにリン原子を有さないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、およびホスホロチオエートが挙げられるが、これらに限定されない。リン含有および非リン含有結合の調製方法は、周知である。

【0187】

40

ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7 2 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、1つ以上の修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある特定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、アンチセンス化合物全体にわたって分散される。ある特定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物の各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0188】

修飾糖部分

アンチセンス化合物は、任意で、糖基が修飾されている1つ以上のヌクレオシドを含有し得る。そのような糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の強化、結合親和性の増

50

加、または何らかの他の有益な生物学的特性を、アンチセンス化合物に付与し得る。ある特定の実施形態において、ヌクレオシドは、化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例としては、置換基の付加（5' および 2' 置換基を含む、二環式核酸（BNA）を形成するための非ジェミナル環原子の架橋、リボシリル環酸素原子の S、N（R）、または C（R₁）（R₂）との置き換え（R、R₁、および R₂ は、それぞれ独立して、H、C₁-C_{1,2} アルキル、または保護基である）、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。化学修飾糖の例としては、2' - F - 5' - メチル置換ヌクレオシド（他の開示された 5', 2' - ビス置換ヌクレオシドについては、2008年8月21日公開の PCT 国際出願国際公開第 2008/101157 号を参照されたい）、またはリボシリル環酸素原子と S との置き換えと 2' 位でのさらなる置換（2005年6月16日公開の公開米国特許出願第 2005-0130923 号を参照されたい）、または代替として、BNA の 5' 置換（2007年11月22日公開の PCT 国際出願国際公開第 2007/134181 号を参照されたく、ここで、LNA は、例えば 5' - メチルまたは 5' - ビニル基で置換される）が挙げられる。
10

【0189】

修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、5' - ビニル、5' - メチル（R または S）、4' - S、2' - F、2' - OCH₃、2' - OCH₂CH₃、2' - OCH₂CH₂F、および 2' - O(CH₂)₂OCH₃ 置換基を含むヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。2' 位での置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、O - アリル、O - C₁ - C_{1,0} アルキル、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m) (R_n)、O - CH₂ - C(=O) - N(R_m) (R_n)、および O - CH₂ - C(=O) - N(R₁) - (CH₂)₂ - N(R_m) (R_n) から選択され得、ここで、各 R₁、R_m、および R_n は、独立して、H であるか、または置換もしくは非置換 C₁ - C_{1,0} アルキルである。
20

【0190】

本明細書に使用される際、「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式ヌクレオシドの例としては、4' リボシリル環原子と 2' リボシリル環原子との間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられるが、これに限定されない。ある特定の実施形態において、本明細書に提供されるアンチセンス化合物は、4' ~ 2' 架橋を含む 1 つ以上の二環式ヌクレオシドを含む。そのような 4' ~ 2' 架橋二環式ヌクレオシドの例としては、次の式のうちの 1 つが挙げられるが、これらに限定されない：4' - (CH₂) - O - 2' (LNA)、4' - (CH₂) - S - 2'、4' - (CH₂)₂ - O - 2' (ENA)、4' - CH(CH₃) - O - 2'、および 4' - CH(CH₂OCH₃) - O - 2'（およびそれらの類似体、2008年7月15日に発行された米国特許第 7,399,845 号を参照されたい）、4' - C(CH₃)(CH₃) - O - 2'（およびその類似体、2009年1月8日に公開された公開国際出願国際公開第 / 2009/006478 号を参照）、4' - CH₂ - N(OCH₃) - 2'（およびその類似体、2008年12月11日に公開された公開国際出願国際公開第 2008/150729 号を参照されたい）、4' - CH₂ - O - N(CH₃) - 2'（2004年9月2日に公開された公開米国特許出願第 2004-0171570 号を参照されたい）、4' - CH₂ - N(R) - O - 2'（式中、R は、H、C₁-C_{1,2} アルキル、または保護基である）（2008年9月23日に発行された米国特許第 7,427,672 号を参照されたい）、4' - CH₂ - C(H)(CH₃) - 2' (Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134)、および 4' - CH₂ - C(=CH₂) - 2'（およびその類似体、2008年12月8日に公開された公開国際出願国際公開第 2008/154401 号を参照されたい）。
30
40

【0191】

二環式ヌクレオシドに関するさらなる報告は、公開文献にも見出すことができる（例えば、Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 350

607-3630、Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638、Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222、Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379、Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561、Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7、およびOrum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243、米国特許第6,268,490号、同第6,525,191号、同第6,670,461号、同第6,770,748号、同第6,794,499号、同第7,034,133号、同第7,053,207号、同第7,399,845号、同第7,547,684号、および同第7,696,345号、米国特許公開第2008-0039618号、同第2009-0012281号、米国特許出願第60/989,574号、同第61/026,995号、同第61/026,998号、同第61/056,564号、同第61/086,231号、同第61/097,787号、および同第61/099,844号、公開PCT国際出願公開第1994/014226号、同第2004/106356号、同第2005/021570号、同第2007/134181号、同第2008/150729号、同第2008/154401号、および同第2009/006478号を参照されたい)。前述の二環式ヌクレオシドのそれぞれは、例えば、
-L-リボフラノースおよび-D-リボフラノースを含む、1つ以上の立体化学糖構成を有するように調製することができる(国際公開第99/14226号として、1999年3月25日公開のPCT国際出願第PCT/DK98/00393号を参照されたい)。

【0192】

ある特定の実施形態において、BNAヌクレオシドの二環式糖部分は、ペントフラノシリ糖部分の4'位と2'位との間に少なくとも1つの架橋を有する化合物を含むが、これらに限定されず、ここで、そのような架橋は、独立して、- [C(R_a)(R_b)]_n-、-C(R_a)=C(R_b)-、-C(R_a)=N-、-C(=O)-、-C(=N R_a)-、-C(=S)-、-O-、-Si(R_a)₂-、-S(=O)_x-、および-N(R_a)-から独立して選択される1個または2~4個の結合基を含み、

式中、

xは、0、1、または2であり、

nは、1、2、3、または4であり、

各R_aおよびR_bは、独立して、H、保護基、ヒドロキシリ、C₁-C_{1,2}アルキル、置換C₁-C_{1,2}アルキル、C₂-C_{1,2}アルケニル、置換C₂-C_{1,2}アルケニル、C₂-C_{1,2}アルキニル、置換C₂-C_{1,2}アルキニル、C₅-C_{2,0}アリール、置換C₅-C_{2,0}アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、C₅-C₇脂環式ラジカル、置換C₅-C₇脂環式ラジカル、ハロゲン、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、アシル(C(=O)-H)、置換アシル、CN、スルホニル(S(=O)₂-J₁)、またはスルホキシリ(S(=O)-J₁)であり、

各J₁およびJ₂は、独立して、H、C₁-C_{1,2}アルキル、置換C₁-C_{1,2}アルキル、C₂-C_{1,2}アルケニル、置換C₂-C_{1,2}アルケニル、C₂-C_{1,2}アルキニル、置換C₂-C_{1,2}アルキニル、C₅-C_{2,0}アリール、置換C₅-C_{2,0}アリール、アシル(C(=O)-H)、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、C₁-C_{1,2}アミノアルキル、置換C₁-C_{1,2}アミノアルキル、または保護基である。

【0193】

ある特定の実施形態において、二環式糖部分の架橋は、- [C(R_a)(R_b)]_n-、- [C(R_a)(R_b)]_n-O-、-C(R_aR_b)-N(R)-O-、または-C

10

20

30

40

50

(R_a R_b) - O - N (R) - である。ある特定の実施形態では、架橋は、4' - CH₂ - 2'、4' - (CH₂)₂ - 2'、4' - (CH₂)₃ - 2'、4' - CH₂ - O - 2'、4' - (CH₂)₂ - O - 2'、4' - CH₂ - O - N (R) - 2'、および4' - CH₂ - N (R) - O - 2' - であり、式中、各Rは、独立して、H、保護基、またはC₁ - C₁₂アルキルである。

【0194】

ある特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは、異性体構成によってさらに、定義される。例えば、4' - 2'メチレン - オキシ架橋を含むヌクレオシドは、- L構成または- D構成にあってもよい。以前は、- L - メチレンオキシ(4' - CH₂ - O - 2')BNAは、アンチセンス活性を示すアンチセンスオリゴヌクレオチド中に組み込まれていた(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365 - 6372)。

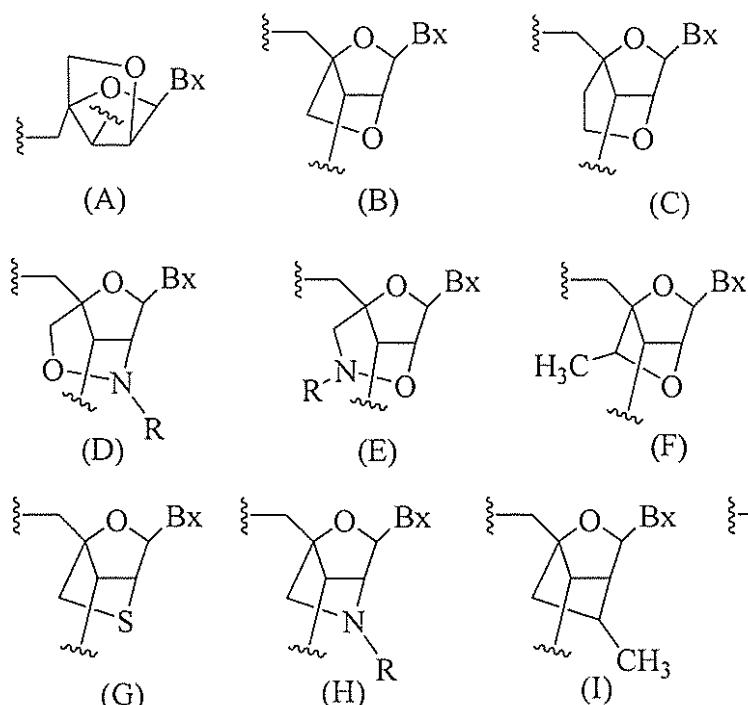
10

【0195】

ある特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドには、下に示されるような、(A) - L - メチレンオキシ(4' - CH₂ - O - 2')BNA、(B) - D - メチレンオキシ(4' - CH₂ - O - 2')BNA、(C)エチレンオキシ(4' - (CH₂)₂ - O - 2')BNA、(D)アミノオキシ(4' - CH₂ - O - N (R) - 2')BNA、(E)オキシアミノ(4' - CH₂ - N (R) - O - 2')BNA、および(F)メチル(メチレンオキシ)(4' - CH(CH₃) - O - 2')BNA、(G)メチレン - チオ(4' - CH₂ - S - 2')BNA、(H)メチレン - アミノ(4' - CH₂ - N (R) - 2')BNA、(I)メチル炭素環式(4' - CH₂ - CH(CH₃) - 2')BNA、および(J)プロピレン炭素環式(4' - (CH₂)₃ - 2')BNAが含まれるが、これらに限定されない。

20

【化1】



30

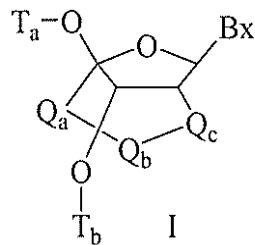
式中、Bxは、塩基部分であり、Rは、独立して、H、保護基、またはC₁ - C₁₂アルキルである。

【0196】

ある特定の実施形態において、式I

40

【化2】



を有する二環式スクレオシドが提供され、式中、

10

Bxは、複素環式塩基部分であり、

-Qa-Qb-Qc-は、-CH₂-N(Rc)-CH₂-、-C(=O)-N(Rc)-CH₂-、-CH₂-O-N(Rc)-、-CH₂-N(Rc)-O-、または-N(Rc)-O-CH₂であり、

Rcは、C₁-C₁₂アルキルまたはアミノ保護基であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リ

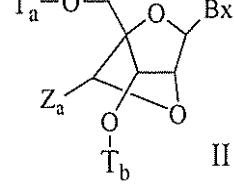
ン基、リン部分、または支持媒体への共有結合である。

【0197】

ある特定の実施形態では、式II

【化3】

20



を有する二環式スクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リ

30

ン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

Zaは、C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、置換C₁-C₆アルキル、置換C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルキニル、アシリル、置換アシリル、置換アミド、チオール、または置換チオである。

【0198】

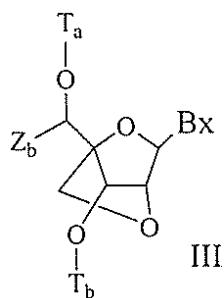
一実施形態において、置換された基のそれぞれは、独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、およびNJ_eC(=X)NJ_cJ_dから独立して選択される置換基で一置換または多置換され、式中、各J_c、J_dおよびJ_eは、独立して、H、C₁-C₆アルキル、または置換C₁-C₆アルキルであり、Xは、OまたはNJ_cである。

40

【0199】

ある特定の実施形態において、式III

【化4】



III

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リ

ン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

Z_bは、C₁ - C₆アルキル、C₂ - C₆アルケニル、C₂ - C₆アルキニル、置

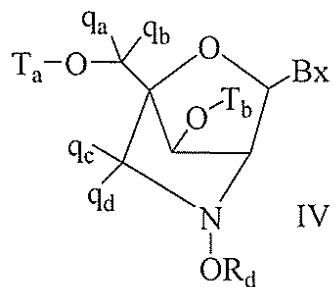
換C₁ - C₆アルキル、置換C₂ - C₆アルケニル、置換C₂ - C₆アルキニル、または

置換アシル(C(=O)-)である。

【0200】

ある特定の実施形態において、式IV

【化5】



IV

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リ

ン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

R_dは、C₁ - C₆アルキル、置換C₁ - C₆アルキル、C₂ - C₆アルケニル、

置換C₂ - C₆アルケニル、C₂ - C₆アルキニル、または置換C₂ - C₆アルキニルで

あり、

各q_a、q_b、q_c、およびq_dは、独立して、H、ハロゲン、C₁ - C₆アルキ

ル、置換C₁ - C₆アルキル、C₂ - C₆アルケニル、置換C₂ - C₆アルケニル、C₂

- C₆アルキニル、もしくは置換C₂ - C₆アルキニル、C₁ - C₆アルコキシル、置換

C₁ - C₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁ - C₆アミノアルキル、または置換

C₁ - C₆アミノアルキルである。

【0201】

ある特定の実施形態において、式V

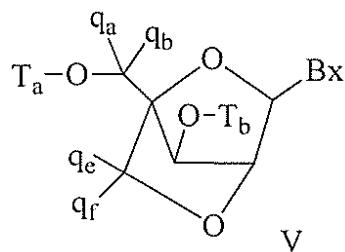
10

20

30

40

【化6】



を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

10

Bxは、複素環式塩基部分であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リ

ン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

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

20

あるいはq_eおよびq_fは一緒に、=C(q_g)(q_h)であり、

q_gおよびq_hはそれぞれ、独立して、H、ハロゲン、C₁-C₂アルキル、または置換C₁-C₂アルキルである。

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA単量体アデニン、シトシン、グアニン、5'-メチルシトシン、チミン、およびウラシルの合成および調製が、それらのオリゴマー化、および核酸認識特性とともに記載されている(例えば、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630を参照されたい)。BNAおよびそれらの調製もまた、国際公開第98/39352号および同第99/14226号に記載される。

【0202】

30

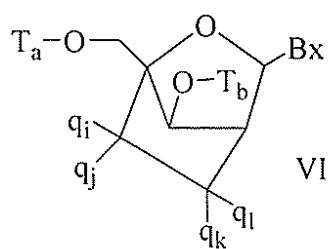
メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNAおよび2'-チオ-BNAの類似体もまた、調製されている(Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼのための基質としてオリゴデオキシリボヌクレオチド二重鎖を含む、固定されたヌクレオシド類似体の調製もまた、記載されている(Wengel et al., 国際公開第99/14226号)。さらに、新規の立体配座的に制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ-BNAの合成が、当該技術分野において記載されている(Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。加えて、2'-アミノ-および2'-メチルアミノ-BNAが調製されており、相補的RNAおよびDNA鎖によるそれらの二重鎖の熱安定性が以前に報告されている。

40

【0203】

ある特定の実施形態では、式VI

【化7】



50

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

B_xは、複素環式塩基部分であり、

T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

各q_i、q_j、q_k、およびq₁は、独立して、H、ハロゲン、C₁-C_{1,2}アルキル、置換C₁-C_{1,2}アルキル、C₂-C_{1,2}アルケニル、置換C₂-C_{1,2}アルケニル、C₂-C_{1,2}アルキニル、置換C₂-C_{1,2}アルキニル、C₁-C_{1,2}アルコキシリル、置換C₁-C_{1,2}アルコキシリル、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k、N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)NJ_jJ_k、またはN(H)C(=S)NJ_jJ_kであり、
10

q_iおよびq_jまたはq₁およびq_kは一緒に、=C(q_g)(q_h)であり、式中、q_gおよびq_hはそれぞれ、独立して、H、ハロゲン、C₁-C_{1,2}アルキル、または置換C₁-C_{1,2}アルキルである。

【0204】

4'--(CH₂)₃-2'架橋およびアルケニル類似体架橋4'-CH=CH-CH₂-2'を有する1つの炭素環式二環式ヌクレオシドが記載されている(Frieter et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443およびAlbaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。また、炭素環式二環式ヌクレオシドの合成および調製が、それらのオリゴマー化ならびに生化学的研究とともに、記載されている(Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379)。
20

【0205】

本明細書に使用される際、「4'-2'二環式ヌクレオシド」または「4'~2'二環式ヌクレオシド」とは、糖環の2'炭素原子と4'炭素原子とを接続するフラノース環の2個の炭素原子を接続する架橋を含むフラノース環を含む二環式ヌクレオシドを指す。

【0206】

本明細書に使用される際、「単環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分ではない修飾された糖部分を含むヌクレオシドを指す。ある特定の実施形態において、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体は、任意の位置において修飾または置換され得る。
30

【0207】

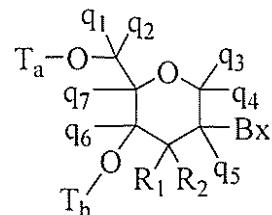
本明細書に使用される際、「2'修飾糖」とは、2'位において修飾されたフラノシリル糖を意味する。ある特定の実施形態において、そのような修飾は、置換および非置換アルコキシ、置換および非置換チオアルキル、置換および非置換アミノアルキル、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリル、ならびに置換および非置換アルケニルを含むが、これらに限定されないハロゲン化物から選択される置換基を含む。ある特定の実施形態において、2'修飾は、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nF、O(CH₂)_nONH₂、OCH₂C(=O)N(H)CH₃、およびO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂を含むが、これらに限定されない置換基から選択され、式中、nおよびmは、1~約10である。他の2'置換基もまた、C₁-C_{1,2}アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、もしくはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、F、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターライター、薬物動態特性を改善するための基、またはアンチセンス化合物の薬力学的特性を改善するための基、および類似した特性を有する他の置換基から選択することができる。ある特定の実施形態において、修飾ヌクレオシドは、2' - MOE側鎖を含む(Baker 40

et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). そのような 2'-MOE 置換は、非修飾ヌクレオシド、ならびに 2'-O-メチル、O-プロピル、および O-アミノプロピル等の他の修飾ヌクレオシドと比較して、改善された結合親和性を有することが記載されている。2'-MOE 置換基を有するオリゴヌクレオチドもまた、インビボでの使用に有望な特徴を有する、遺伝子発現のアンチセンス阻害物質であることが示されている (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504, Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176, Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637、および Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

【0208】

本明細書に使用される際、「修飾されたテトラヒドロピランヌクレオシド」または「修飾されたTHPヌクレオシド」とは、通常のヌクレオシドにおけるペントフラノシル残基の代わりに置換された 6 員テトラヒドロピラン「糖」を有するヌクレオシドを意味する(糖代替物)。修飾された THP ヌクレオシドは、当該技術分野でヘキシトール核酸 (HN A)、アニトール (anitol) 核酸 (ANA)、マンニトール核酸 (mannitol) (MNA) (Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10: 841-854 を参照されたい)、フルオロHNA (F-HNA) と称されるもの、または式VII:

【化8】



VII

を有する化合物が含まれるが、これらに限定されず、式中、式VIIの当該少なくとも1つのテトラヒドロピランヌクレオシド類似体のそれぞれについて、独立して、

【0209】

Bx は、複素環式塩基部分であり、

T_a および T_b はそれぞれ、独立して、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に結合するヌクレオシド間結合基であるか、あるいは T_a および T_b のうちの1つが、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体とアンチセンス化合物とを結合するヌクレオシド間結合基であり、T_a および T_b のうちのもう1つが、H、ヒドロキシル保護基、結合複合基、または 5' もしくは 3' 末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、および q₇ はそれぞれ、独立して、H、C₁-C₆ アルキル、置換 C₁-C₆ アルキル、C₂-C₆ アルケニル、置換 C₂-C₆ アルケニル、C₂-C₆ アルキニル、または置換 C₂-C₆ アルキニルであり、R₁ および R₂ のそれぞれは、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または非置換アルコキシ、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ₃C(=X)NJ₁J₂、および CN から選択され、式中、X は、O、S、または NJ₁ であり、各 J₁、J₂、および J₃ は、独立して、H または C₁-C₆ アルキルである。

【0210】

ある特定の実施形態において、式VIIの修飾されたTHPヌクレオシドが提供され、式中、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、および q₇ は、それぞれ、H である。ある特定の実施形態において、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、および q₇ のうちの少

10

20

30

40

50

なくとも1つは、H以外である。ある特定の実施形態において、 q_1 、 q_2 、 q_3 、 q_4 、 q_5 、 q_6 、および q_7 のうちの少なくとも1つは、メチルである。ある特定の実施形態において、式VIIのTHPヌクレオシドが提供され、式中、 R_1 および R_2 は、フルオロ口である。ある特定の実施形態において、 R_1 はフルオロ口であり、 R_2 はHである、 R_1 はメトキシであり、 R_2 は水素である、および R_1 はHであり、 R_2 はメトキシエトキシである。

【0211】

本明細書に使用される際、「2'修飾」または「2'置換」とは、2'位において、HまたはOH以外の置換基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。2'修飾ヌクレオシドは、その中で糖環の2個の炭素原子を結合する架橋が2'炭素および糖環の別の炭素を結合する、二環式ヌクレオシド、ならびにアリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SC₁CH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)等の非架橋2'置換基を有するヌクレオシドを含むが、これらに限定されず、式中、各R_mおよびR_nは、独立して、H、または置換もしくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。2'修飾ヌクレオシドは、例えば、糖の他の位置におけるおよび/または核酸塩基における、他の修飾をさらに含んでもよい。

【0212】

本明細書に使用される際、「2' - F」とは、2'位においてフルオロ口基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0213】

本明細書に使用される際、「2' - OMe」または「2' - OCH₃」または「2' - O-メチル」はそれぞれ、糖環の2'位において-OCH₃基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0214】

本明細書に使用される際、「MOE」または「2' - MOE」または「2' - OCH₂CH₂OCH₃」または「2' - O-メトキシエチル」はそれぞれ、糖環の2'位において-OCH₂CH₂OCH₃基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0215】

本明細書に使用される際、「オリゴヌクレオチド」とは、複数の結合したヌクレオシドを含む化合物を指す。ある特定の実施形態では、複数のヌクレオシドのうちの1つ以上が修飾される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のリボヌクレオシド(RNA)および/またはデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

【0216】

アンチセンス化合物への組み込み用にヌクレオシドを修飾するために使用され得る、多くの他の二環および三環糖代用環系も、当該技術分野において既知である(例えば、総説: Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854を参照されたい)。

そのような環系は、活性を強化するために、種々の追加の置換を受け得る。

【0217】

修飾糖の調製方法は、当業者に周知である。

【0218】

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

【0219】

ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、修飾糖部分を有する、1つ以上のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は、2' - MOEである。ある特定の実施形態において、2' - MOE修飾ヌクレオシドは、ギャップマーモチーフで配置される。ある特定の実施形態において、修飾糖部分は、(4' - CH(CH₃)-O-2')架橋基を有する二環式ヌクレオシドである。ある特定の実施形態において

10

20

30

40

50

、(4'-CH(CH₃)-O-2')修飾ヌクレオシドは、ギャップマークーチーフのウイニング全体に配置される。

【0220】

組成物および薬学的組成物を製剤化するための方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、薬学的組成物または製剤の調製のために、薬学的に許容される活性または不活性物質と混合され得る。組成物および薬学的組成物の製剤化のための方法は、限定されないが、投与経路、疾患の程度、投与される用量を含む、いくつかの基準に依存する。

【0221】

C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物と、好適な薬学的に許容される希釈剤または担体とを組み合わせることによって、薬学的組成物において用いることができる。薬学的に許容される希釈剤には、リン酸緩衝食塩水(PBS)が含まれる。PBSは、非経口で送達される組成物における使用に好適な希釈剤である。したがって、一実施形態では、C9ORF72核酸を標的とするアンチセンス化合物と、薬学的に許容される希釈剤とを含む薬学的組成物が、本明細書に記載の方法に利用される。ある特定の実施形態において、薬学的に許容される希釈剤は、PBSである。ある特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0222】

アンチセンス化合物を含む薬学的組成物は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、もしくはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物に投与した際に、生物学的に活性な代謝物もしくはその残基を(直接的または間接的に)提供することができる任意の他のオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、例えば、本開示はまた、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的同等物に向けられる。好適な薬学的に許容される塩には、ナトリウムおよびカリウムの塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0223】

プロドラッグは、アンチセンス化合物の一端または両端に追加のヌクレオシドの組み込みを含み得、これが、身体内で内因性ヌクレアーゼによって切断されて、活性なアンチセンス化合物を形成する。

【0224】

複合体化したアンチセンス化合物

アンチセンス化合物は、結果として得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを強化する、1つ以上の部分または複合体に共有結合されてもよい。典型的な複合基には、コレステロール部分および脂質部分が含まれる。追加の複合基には、炭水化物、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素が含まれる。

【0225】

アンチセンス化合物はまた、例えば、ヌクレアーゼ安定性等の特性を強化するために、一般的にはアンチセンス化合物の一端または両端に付着する、1つ以上の安定化基を有するように修飾することができる。安定化基にはキャップ構造が含まれる。これらの末端修飾は、末端核酸を有するアンチセンス化合物をエクソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内での送達および/または局在化に役立ち得る。キャップは、5'末端(5'キャップ)もしくは3'末端(3'キャップ)に存在し得るか、または両方の末端に存在し得る。キャップ構造は、当技術分野において周知であり、例えば、逆位デオキシ脱塩基キャップが含まれる。ヌクレアーゼ安定性を付与するためにアンチセンス化合物の一端または両端をキャップするのに使用することができるさらなる3'および5'安定化基には、国際公開第03/004602号(2003年1月16日公開)に開示されるものが含まれる。

【0226】

10

20

30

40

50

細胞培養およびアンチセンス化合物処理

C 9 O R F 7 2 核酸のレベル、活性、または発現に対するアンチセンス化合物の効果は、多様な細胞種において、インビトロで試験することができる。そのような分析に使用される細胞種は、市販の供給業者（例えば、American Type Culture Collection, Manassas, VA、Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC、Clonetics Corporation, Walkersville, MD）から入手可能であり、供給業者の説明書に従って、市販入手可能な試薬（例えば、Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）を使用して培養される。例示的な細胞種としては、HepG2細胞、Hep3B細胞、および初代肝細胞が挙げられるが、これらに限定されない。10

【0227】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ試験

アンチセンスオリゴヌクレオチドでの細胞の処理のための方法が本明細書に記載され、これは、他のアンチセンス化合物での処理のために適宜修正することができる。

【0228】

一般に、細胞が培養液中おおよそ 60 ~ 80 % の密集度に達したときに、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。

【0229】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するのに一般的に使用される 1 つの試薬には、カチオン性脂質トランスフェクション試薬 L I P O F E C T I N (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中、L I P O F E C T I N と混合して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度、および典型的には 1 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチド当たり 2 ~ 1 2 μ g / mL の範囲に及ぶ L I P O F E C T I N 濃度を達成する。20

【0230】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入するためには、L I P O F E C T A M I N E (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM 1 低濃度血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中、L I P O F E C T A M I N E と混合して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度、および典型的には 1 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチド当たり 2 ~ 1 2 μ g / mL の範囲に及ぶ L I P O F E C T A M I N E 濃度を達成する。30

【0231】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入するためには、エレクトロポレーションが挙げられる。

【0232】

細胞を、日常的な方法によってアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理の 1 6 ~ 2 4 時間後に細胞を採取し、この時点で、標的核酸の R N A またはタンパク質レベルを、当該技術分野で既知および本明細書に記載される方法によって、測定する。一般に、処理を複数の繰り返しで実施する場合、データは、その繰り返し処理の平均として提示される。40

【0233】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞系ごとに変動する。特定の細胞系に最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を決定する方法は、当該技術分野で周知である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的に、L I P O F E C T A M I N E を用いてトランスフェクトする場合、1 n M ~ 3 0 0 n M の範囲の濃度で使用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトする場合、6 2 5 ~ 2 0 , 0 0 0 n M の範囲のより高い濃度で使用される。50

【0234】

R N A 単離

R N A 分析は、全細胞 R N A またはポリ (A) + m R N A で実施することができる。R N A 単離の方法は、当該技術分野において周知である。R N A は、当該技術分野で周知の方法を使用して、例えば、製造業者の推奨プロトコルに従って、T R I Z O L 試薬 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) を用いて調製される。

【0235】

標的レベルまたは発現の阻害の分析

C 9 O R F 7 2 核酸のレベルまたは発現の阻害は、当該技術分野で既知の多様な手段でアッセイすることができる。例えば、標的核酸レベルは、例えば、ノーザンプロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、または定量的リアルタイム P C R によって、定量化することができる。R N A 分析は、全細胞 R N A またはポリ (A) + m R N A で実施することができる。R N A 単離の方法は、当該技術分野において周知である。ノーザンプロット分析もまた、当該技術分野では日常的である。定量的リアルタイム P C R は、簡便には、市販入手可能な A B I P R I S M 7 6 0 0 、 7 7 0 0 、または 7 9 0 0 配列検出システム (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A より入手可能) を使用して、製造業者の説明書に従って使用して達成することができる。

【0236】

標的 R N A レベルの定量的リアルタイム P C R 分析

標的 R N A レベルの定量化は、A B I P R I S M 7 6 0 0 、 7 7 0 0 、または 7 9 0 0 配列検出システム (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) を製造業者の説明書に従って使用する、定量的リアルタイム P C R によって達成することができる。定量的リアルタイム P C R の方法は、当該技術分野において周知である。

【0237】

リアルタイム P C R に先立って、単離した R N A を逆転写酵素 (R T) 反応に供し、相補的 D N A (c D N A) を生成した後に、これをリアルタイム P C R 増幅の基質として使用する。R T 反応およびリアルタイム P C R 反応は、同じ試料ウェルにおいて逐次的に実施する。R T およびリアルタイム P C R の試薬は、I n v i t r o g e n (C a r l s b a d , C A) より入手される。R T リアルタイム P C R 反応は、当業者に周知の方法によって行う。

【0238】

リアルタイム P C R によって得られる遺伝子 (または R N A) 標的の量は、シクロフィリン A 等、その発現が一定である遺伝子の発現レベルを使用して、または R I B O G R E E N (I n v i t r o g e n , I n c . C a r l s b a d , C A) を用いて全 R N A を定量化することによって、正規化される。シクロフィリン A の発現は、標的と同時に実施するリアルタイム P C R によって、多重化することによって、または別々に定量化される。全 R N A は、R I B O G R E E N R N A 定量試薬 (I n v e t r o g e n , I n c . E u g e n e , O R) を用いて定量化される。R I B O G R E E N による R N A 定量化の方法は、J o n e s , L . J . ら (A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , 1 9 9 8 , 2 6 5 , 3 6 8 - 3 7 4) に教示されている。C Y T O F L U O R 4 0 0 0 機器 (P E - A p p l i e d B i o s y s t e m s) を使用して、R I B O G R E E N 蛍光を測定する。

【0239】

プローブおよびプライマーは、C 9 O R F 7 2 核酸とハイブリダイズするように設計される。リアルタイム P C R のプローブおよびプライマーを設計する方法は、当該技術分野で周知であり、P R I M E R E X P R E S S ソフトウェア (A p p l i e d B i o s y s t e m s , F o s t e r C i t y , C A) 等のソフトウェアの使用を含み得る。

【0240】

10

20

30

40

50

タンパク質レベルの分析

C 9 O R F 7 2 核酸のアンチセンス阻害は、C 9 O R F 7 2 タンパク質レベルを測定することによって評価することができる。C 9 O R F 7 2 のタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンプロット分析（免疫プロット法）、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えば、カスパーゼ活性アッセイ）、免疫組織化学、免疫細胞化学、または蛍光活性化細胞分類法（F A C S）といった、当該技術分野で周知の多様な手段で評価または定量化することができる。標的を対象とする抗体は、抗体のM S R S カタログ（A e r i e C o r p o r a t i o n , B i r m i n g h a m , M I ）等の多様な供給源から特定および入手することができるか、または当該技術分野で周知の従来的なモノクローナルもしくはポリクローナル抗体生成方法によって調製することができる。マウス、ラット、サル、およびヒトC 9 O R F 7 2 の検出に有用な抗体は、市販入手可能である。

10

【0 2 4 1】

アンチセンス化合物のインビオ試験

アンチセンス化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、それらがC 9 O R F 7 2 の発現を阻害し、表現型の変化、例えば運動機能および呼吸の改善をもたらす能力を評価するために、動物において試験する。ある特定の実施形態において、運動機能は、動物においてロータロッド、握力、棒登り、オープンフィールド行動、バランスビーム、後肢足跡試験によって測定される。ある特定の実施形態において、呼吸は、動物において全身プレチスモグラフ、侵襲的抵抗（i n v a s i v e r e s i s t a n c e）、およびコンプライアンス測定によって、測定される。試験は、正常な動物において、または実験的な疾患モデルにおいて実施され得る。動物への投与のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝食塩水等の薬学的に許容される希釈剤中に製剤化される。投与は、腹腔内、静脈内、および皮下といった非経口の投与経路を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドの投薬量および投与頻度の計算は、当業者の能力の範囲内であり、投与経路および動物の体重といった要因に依存する。アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理期間の後、R N Aを、C N S 組織またはC S F から単離し、C 9 O R F 7 2 核酸発現における変化を測定する。

20

【0 2 4 2】

C 9 O R F 7 2 を標的とすること

30

本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、R N Aプロセシングの任意の段階においてC 9 O R F 7 2 核酸とハイブリダイズし得る。例えば、プレ-m R N A または成熟m R N A に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドが、本明細書に記載される。さらに、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、C 9 O R F 7 2 核酸の任意の要素とハイブリダイズし得る。例えば、C 9 O R F 7 2 核酸のエクソン、イントロン、5' U T R 、3' U T R 、反復領域、ヘキサヌクレオチド反復伸長、スプライスジャンクション、エクソン：エクソンスプライスジャンクション、エクソンスプライシングサイレンサー（E S S ）、エクソンスプライシングエンハンサー（E S E ）、エクソン1 a 、エクソン1 b 、エクソン1 c 、エクソン1 d 、エクソン1 e 、エクソン2 、エクソン3 、エクソン4 、エクソン5 、エクソン6 、エクソン7 、エクソン8 、エクソン9 、エクソン1 0 、エクソン1 1 、イントロン1 、イントロン2 、イントロン3 、イントロン4 、イントロン5 、イントロン6 、イントロン7 、イントロン8 、イントロン9 、またはイントロン1 0 に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドが、本明細書に記載される。

40

【0 2 4 3】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、C 9 O R F 7 2 のすべての変異体とハイブリダイズする。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、C 9 O R F 7 2 のある特定の変異体と選択的にハイブリダイズする。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有するC 9 O R F 7 2 の変異体と選択的にハイブリダイズする。ある特定の実施形態において、ヘ

50

キサヌクレオチド反復伸長を含有する C 9 O R F 7 2 のそのような変異体には、配列番号 1 ~ 3 および 6 ~ 1 0 が含まれる。ある特定の実施形態において、そのようなヘキサヌクレオチド反復伸長は、 G G G G C C 、 G G G G G G 、 G G G G G C 、または G G G G C G のいずれかの少なくとも 3 0 回の反復を含む。

【 0 2 4 4 】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 C 9 O R F 7 2 のすべての変異体の発現を阻害する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 C 9 O R F 7 2 のすべての変異体の発現を同等に阻害する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 C 9 O R F 7 2 のある特定の変異体の発現を選択的に阻害する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する C 9 O R F 7 2 の変異体の発現を選択的に阻害する。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する C 9 O R F 7 2 のそのような変異体には、配列番号 1 ~ 3 および 6 ~ 1 0 が含まれる。ある特定の実施形態において、そのようなヘキサヌクレオチド反復伸長は、 G G G G C C 、 G G G G G G 、 G G G G G C 、または G G G G C G のいずれかの少なくとも 3 0 回の反復を含む。ある特定の実施形態において、ヘキサヌクレオチド反復伸長は、核内フォーカスを形成する。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、核内フォーカスを低減するのに有用である。核内フォーカスは、フォーカスを有する細胞の割合 (%) 、ならびに細胞 1 つ当たりのフォーカスの数に関して、低減され得る。

10

【 0 2 4 5 】

反復伸長を対象とした先行研究に基づいて、 2 つの理由から、ヘキサヌクレオチド反復伸長の外側の C 9 O R F 7 2 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが、 C 9 O R F 7 2 の発現の阻害に成功するかどうかを予測することは不可能である。第 1 に、 C 9 O R F 7 2 反復伸長は、イントロン内に位置し、フォーカス内の R N A が、反復のみを含有するか、または隣接するイントロン配列も同様に含有するかについてはわからない。例えば、 Z N F 9 遺伝子のイントロン 1 における C C T G 伸長の突然変異によって引き起こされる疾患である筋強直性ジストロフィー 2 型 (D M 2) についての先行研究は、大きな D M 2 伸長が、アレル特異的なプレ - m R N A のスプライシング、転写産物の核外輸送、または定常状態の m R N A もしくはタンパク質レベルを防止しなかったことを示した。この研究は、疾患と関連して見出されたリボ核封入体は、 C C U G 伸長では高まるが、隣接するイントロン配列では高まらないことをさらに示した。これらのデータは、 D M 2 突然変異の下流分子効果が、 C C U G 反復領域単独の集積によって引き起こされ得ることを示唆する。したがって、この研究は、 C C U G 反復伸長を単独で標的とすることにより、疾患の緩和をもたらすであろうことを暗示し、これは、隣接する配列、特に反復伸長の下流の領域を標的とすることは、リボ核封入体の形成に影響を及ぼすことがないであろうためである (Margolis et al . Hum . Mol . Genet . , 2 0 0 6 , 1 5 : 1 8 0 8 - 1 8 1 5) 。第 2 に、反復を含有する C 9 O R F 7 2 のイントロン 1 が切除され、フォーカスに集積する速度はわかっていない。したがって、プレ - m R N A を標的とすることが、反復 R N A およびフォーカスの排除をもたらすかどうかを予測することは不可能である。

20

【 0 2 4 6 】

C 9 O F F 7 2 の特徴

本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、 C 9 O R F 7 2 遺伝子の任意の要素内においてプロセシングの任意の段階で任意の C 9 O R F 7 2 変異体とハイブリダイズし得る。例えば、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、エクソン、イントロン、 5 ' U T R 、 3 ' U T R 、反復領域、ヘキサヌクレオチド反復伸長、スプライスジャンクション、エクソン : エクソンスプライスジャンクション、エクソンスプライシングサイレンサー (E S S) 、エクソンスプライシングエンハンサー (E S E)

30

40

50

、エクソン 1 a、エクソン 1 b、エクソン 1 c、エクソン 1 d、エクソン 1 e、エクソン 2、エクソン 3、エクソン 4、エクソン 5、エクソン 6、エクソン 7、エクソン 8、エクソン 9、エクソン 10、エクソン 11、イントロン 1、イントロン 2、イントロン 3、イントロン 4、イントロン 5、イントロン 6、イントロン 7、イントロン 8、イントロン 9、またはイントロン 10 とハイブリダイズし得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下に記載される種々の C 9 O R F 7 2 変異体に関して、以下の表 1 ~ 5 に特徴付けされるエクソンのいずれかを標的とし得る。本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下に特徴付けされない変異体を標的としてもよく、そのような変異体は、G E N B A N K において特徴付けされている。さらに、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、エクソン以外の要素を標的としてもよく、そのような要素は、G E N B A N K において特徴付けされている。

10

【表 1】

NM_001256054.1 (配列番号 1) の機能的セグメント

エクソン番号	mRNA 開始部 位	mRNA 終止部 位	配列番 号 2 に 関する 開始部 位	配列番 号 2 に 関する 終止部 位
エクソン 1C	1	158	1137	1294
エクソン 2	159	646	7839	8326
エクソン 3	647	706	9413	9472
エクソン 4	707	802	12527	12622
エクソン 5	803	867	13354	13418
エクソン 6	868	940	14704	14776
エクソン 7	941	1057	16396	16512
エクソン 8	1058	1293	18207	18442
エクソン 9	1294	1351	24296	24353
エクソン 10	1352	1461	26337	26446
エクソン 11	1462	3339	26581	28458

20

30

【表 2】

NM_018325.3 (配列番号4) の機能的セグメント

エクソン番号	mRNA 開始部 位	mRNA 終止部 位	配列番 号2に 関する 開始部 位	配列番 号2に 関する 終止部 位
エクソン1B	1	63	1510	1572
エクソン2	64	551	7839	8326
エクソン3	552	611	9413	9472
エクソン4	612	707	12527	12622
エクソン5	708	772	13354	13418
エクソン6	773	845	14704	14776
エクソン7	846	962	16396	16512
エクソン8	963	1198	18207	18442
エクソン9	1199	1256	24296	24353
エクソン10	1257	1366	26337	26446
エクソン11	1367	3244	26581	28458

10

20

30

【表 3】

NM_145005.5 (配列番号6) の機能的セグメント

エクソン番号	mRNA 開始部 位	mRNA 終止部 位	配列番号 2に関す る開始部 位	配列番号 2に関す る終止部 位
エクソン1A	1	80	1137	1216
エクソン2	81	568	7839	8326
エクソン3	569	628	9413	9472
エクソン4	629	724	12527	12622
エクソン5B(エクソン5か らインtron5まで)	725	1871	13354	14500

【表4】

D B 0 7 9 3 7 5. 1 (配列番号7) の機能的セグメント

エクソン番号	mRNA 開始部 位	mRNA 終止部 位	配列番 号2に 関する 開始部 位	配列番 号2に 関する 終止部 位
エクソン1E	1	35	1135	1169
エクソン2	36	524	7839	8326
エクソン3(完全なエクソンの終了前 にESTが終了する)	525	562	9413	9450

10

【表5】

B U 1 9 4 5 9 1. 1 (配列番号8) の機能的セグメント

エクソン番号	mRNA 開始部 位	mRNA 終止部 位	配列番 号2に 関する 開始部 位	配列番 号2に 関する 終止部 位
エクソン1D	1	36	1241	1279
エクソン2	37	524	7839	8326
エクソン3	525	584	9413	9472
エクソン4	585	680	12527	12622
エクソン5B(エクソン5か らイントロン5まで)	681	798	13354	13465

20

30

【0247】

ある特定の適応症

ある特定の実施形態において、1つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物を投与することを含む、個体を治療する方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、個体は、神経変性疾患を有する。ある特定の実施形態において、個体は、A L S またはF T D を含むがこれらに限定されない、神経変性疾患を発症する危険性にある。ある特定の実施形態において、個体は、C 9 O R F 7 2 関連疾患を有すると識別されている。ある特定の実施形態において、個体は、C 9 O R F 7 2 へキサヌクレオチド反復伸長関連疾患を有すると識別されている。ある特定の実施形態において、個体におけるC 9 O R F 7 2 発現を予防的に低減させるための方法が、本明細書に提供される。ある特定の実施形態は、治療を必要とする個体を、C 9 O R F 7 2 核酸を標的とするアンチセンス化合物の治療有効量を個体に投与することによって治療することを含む。

40

【0248】

一実施形態において、C 9 O R F 7 2 核酸を標的とするアンチセンス化合物の治療有効量の投与は、個体におけるC 9 O R F 7 2 レベルを監視し、アンチセンス化合物の投与に対する個体の応答を判定することを伴う。アンチセンス化合物の投与に対する個体の応答は、治療介入の量および期間を決定するために医師によって使用され得る。

【0249】

ある特定の実施形態において、C 9 O R F 7 2 核酸を標的とするアンチセンス化合物の

50

投与は、結果として、少なくとも 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは 99%、またはこれらの値のうちの任意の 2 つによって定義される範囲の、C9ORF72 発現の低減をもたらす。ある特定の実施形態において、C9ORF72 核酸を標的とするアンチセンス化合物の投与は、結果として、動物における運動機能および呼吸の改善をもたらす。ある特定の実施形態において、C9ORF72 アンチセンス化合物の投与は、運動機能および呼吸を、少なくとも 15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは 99%、またはこれらの値のうちの任意の 2 つによって定義される範囲で改善する。

【0250】

10

ある特定の実施形態において、C9ORF72 を標的とするアンチセンス化合物を含む薬学的組成物は、ALS および FTD を含む神経変性疾患を患うか、またはそれを罹患する傾向にある患者を治療するための医薬品の調製に使用される。

【0251】

ある特定の組み合わせ療法

ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物は、1 つ以上の他の薬学的薬剤と共に投与される。ある特定の実施形態において、そのような 1 つ以上の他の薬学的薬剤は、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物と同じ疾患、障害、または状態を治療するように設計される。ある特定の実施形態において、そのような 1 つ以上の他の薬学的薬剤は、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物とは異なる疾患、障害、または状態を治療するように設計される。ある特定の実施形態において、そのような 1 つ以上の他の薬学的薬剤は、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物の望ましくない副作用を治療するように設計される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物は、他の薬学的薬剤の望ましくない作用を治療するために、別の薬学的薬剤と共に投与される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物は、併用効果をもたらすために、別の薬学的薬剤と共に投与される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物は、相乗効果をもたらすために、別の薬学的薬剤と共に投与される。

20

【0252】

30

ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物と、1 つ以上の他の薬学的薬剤は、同時に投与される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物と、1 つ以上の他の薬学的薬剤は、異なる時間に投与される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物と、1 つ以上の他の薬学的薬剤は、単一製剤と一緒に調製される。ある特定の実施形態において、1 つ以上の本明細書に記載される薬学的組成物と、1 つ以上の他の薬学的薬剤は、別個に調製される。

【0253】

40

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される薬学的組成物と共に投与され得る薬学的薬剤には、Riluzole (Rilutek)、Lioresal (Lioresal)、および Dexpramipexole が挙げられる。

【0254】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される C9ORF72 特異的阻害剤と共に投与され得る薬学的薬剤には、追加の C9ORF72 阻害剤が挙げられるが、これに限定されない。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤は、本明細書に記載される薬学的組成物の投与の前に投与される。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤は、本明細書に記載される薬学的組成物の投与の後に投与される。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤は、本明細書に記載される薬学的組成物と一緒に投与される。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤の用量は、共投与される薬学的薬剤が単独で投与される場合に投与されるであろう用量と同じである。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤の用量は、共投与される薬学的薬剤

50

が単独で投与される場合に投与されるであろう用量よりも低い。ある特定の実施形態において、共投与される薬学的薬剤の用量は、共投与される薬学的薬剤が単独で投与される場合に投与されるであろう用量よりも高い。

【0255】

ある特定の実施形態において、第2の化合物の共投与は、第1の化合物の効果を強化し、結果として化合物の共投与は、第1の化合物単独で投与する場合の効果よりも高い効果をもたらす。他の実施形態において、共投与は、単独で投与される時の化合物の効果の付加的な効果をもたらす。ある特定の実施形態において、共投与は、単独で投与される時の化合物の効果の相乗的な効果をもたらす。ある特定の実施形態において、第1の化合物は、アンチセンス化合物である。ある特定の実施形態において、第2の化合物は、アンチセンス化合物である。

10

ある態様において、本発明は以下であってもよい。

[態様1] C9ORF72核酸またはC9ORF72相同核酸に相補的な一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む化合物。

[態様2] 前記C9ORF72核酸は、ヒトC9ORF72核酸である、態様1に記載の化合物。

[態様3] 前記C9ORF72核酸は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する、態様1～2に記載の化合物。

[態様4] 前記C9ORF72核酸は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有しない、態様1～2に記載の化合物。

20

[態様5] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC9ORF72核酸に特異的にハイブリダイズすることができる、態様1～4に記載の化合物。

[態様6] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC9ORF72核酸の等長部分に少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的である、態様1～5に記載の化合物。

[態様7] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトC9ORF72核酸のエクソン、イントロン、5'UTR、3'UTR、反復領域、スプライスジャンクション、エクソン：エクソヌスプライスジャンクション、エクソヌスプライシングサイレンサー（ESS）、エクソヌスプライシングエンハンサー（ESE）、エクソン1a、エクソン1b、エクソン1c、エクソン1d、エクソン1e、エクソン2、エクソン3、エクソン4、エクソン5、エクソン6、エクソン7、エクソン8、エクソン9、エクソン10、エクソン11、イントロン1、イントロン2、イントロン3、イントロン4、イントロン5、イントロン6、イントロン7、イントロン8、イントロン9、またはイントロン10のうちのいずれかに相補的である、態様1～6に記載の化合物。

30

[態様8] 12～30個の結合したヌクレオシドからなり、配列番号30～369の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を含む、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、化合物。

[態様9] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾を含む、態様1～8のいずれかに記載の化合物。

40

[態様10] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む、態様9に記載の化合物。

[態様11] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である、態様10に記載の化合物。

[態様12] 前記修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、態様10～11に記載の化合物。

[態様13] 少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む、態様9～12に記載の化合物。

[態様14] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖を有する少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む、態様9～13に記載の化合物。

50

[態様 15] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、二環式糖を含む少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドを含む、態様 14 に記載の化合物。

[態様 16] 前記二環式糖は、4' - (CH₂)_n - O - 2' 架橋 (式中、n は 1 または 2 である) および 4' - CH₂ - O - CH₂ - 2' の中から選択される、4' ~ 2' 架橋を含む、態様 15 に記載の化合物。

[態様 17] 前記二環式糖は、4' - CH(CH₃) - O - 2' 架橋を含む、態様 16 に記載の化合物。

[態様 18] 修飾糖を有する前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドは、非二環式の 2' 修飾された修飾糖部分を含む、態様 14 に記載の化合物。

[態様 19] 前記 2' 修飾糖部分は、2' - O - メトキシエチル基を含む、態様 18 に記載の化合物。 10

[態様 20] 前記 2' 修飾糖部分は、2' - O - メチル基を含む、態様 18 に記載の化合物。

[態様 21] 修飾糖を有する前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシドは、糖代替物を含む、態様 14 に記載の化合物。

[態様 22] 前記糖代替物は、モルホリノである、態様 21 に記載の化合物。

[態様 23] 前記糖代替物は、ペプチド核酸である、態様 21 に記載の化合物。

[態様 24] 各ヌクレオシドが修飾される、態様 13 ~ 23 に記載の化合物。

[態様 25] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾核酸塩基を含む、態様 9 ~ 24 に記載の化合物。 20

[態様 26] 前記修飾核酸塩基は、5' - メチルシトシンである、態様 25 に記載の化合物。

[態様 27] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

結合したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、

結合したヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント

結合したヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント、を含み、

前記ギャップセグメントは、前記 5' ウイングセグメントおよび前記 3' ウイングセグメントに直接隣接して、かつそれらの間に位置付けられ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、修飾糖を含む、態様 9 ~ 26 に記載の化合物。

[態様 28] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

10 個の結合したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、

5 個の結合したヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント、

5 個の結合したヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント、を含み、

前記ギャップセグメントは、前記 5' ウイングセグメントおよび前記 3' ウイングセグメントに直接隣接して、かつそれらの間に位置付けられ、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、2' - O - メトキシエチル糖を含み、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である、態様 37 に記載の化合物。

[態様 29] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、15 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 27 に記載の化合物。

[態様 30] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、16 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 27 に記載の化合物。 40

[態様 31] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、17 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 27 に記載の化合物。

[態様 32] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、18 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 27 に記載の化合物。

[態様 33] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、19 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 27 に記載の化合物。

[態様 34] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 28 に記載の化合物。

[態様 35] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、21 個の結合したヌクレオ

50

シドからなる、態様 1 ~ 2 7 に記載の化合物。

[態様 3 6] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 2 2 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 2 7 に記載の化合物。

[態様 3 7] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 2 3 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 2 7 に記載の化合物。

[態様 3 8] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 2 4 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 2 7 に記載の化合物。

[態様 3 9] 前記一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 2 5 個の結合したヌクレオシドからなる、態様 1 ~ 2 7 に記載の化合物。

[態様 4 0] 神経変性疾患を治療するための医薬品の製造のための、態様 1 ~ 3 9 のいずれかに記載の化合物の使用。 10

[態様 4 1] 細胞を、エクソン 1 B の上流を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させることによって、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する m R N A 転写産物の発現を選択的に阻害する方法。

【実施例】

【 0 2 5 6 】

非限定的な開示および参照による組み込み

本明細書に記載されるある特定の化合物、組成物、および方法が、ある特定の実施形態に従って特異的に記載されたが、次の例は、本明細書に記載される化合物を例証するのみの役割を果たしており、それらを限定するようには意図されない。本出願に列挙される参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。 20

【 0 2 5 7 】

実施例 1 : H e p G 2 細胞におけるヒト C 9 O R F 7 2 のアンチセンス阻害

C 9 O R F 7 2 核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、インビトロでそれらが C 9 O R F 7 2 m R N A に及ぼす効果について試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、類似の培養条件を有する一連の実験において試験した。各実験の結果を、以下に示される別々の表に提示する。1 ウェル当たり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度で培養した H e p G 2 細胞に、エレクトロポレーションを使用して 7 , 0 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。およそ 2 4 時間の処理期間の後、 R N A を細胞から単離し、 C 9 O R F 7 2 m R N A レベルを、定量的リアルタイム P C R によって測定した。ヒトプライマープローブセット R T S 3 7 5 0 (順方向配列 T G T G A C A G T T G G A A T G C A G T G A 、本明細書に配列番号 1 5 として指定される ; 逆方向配列 G C C A C T T A A A G C A A T C T C T G T C T T G 、本明細書に配列番号 1 6 として指定される ; プローブ配列 T C G A C T C T T G C C C A C C G C C A 、本明細書に配列番号 1 7 として指定される) を使用して、 m R N A レベルを測定した。 C 9 O R F 7 2 m R N A レベルを、 R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 R N A 含量に応じて調整した。結果を、未処理の対照細胞に対する C 9 O R F 7 2 の阻害パーセントとして提示する。 30

【 0 2 5 8 】

表 6 ~ 1 0 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーとして設計した。ギャップマーは、長さが 2 0 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドを含み、 5 ' 末端および 3 ' 末端の両方にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する。 5 ' ウイングセグメントの各ヌクレオシドおよび 3 ' ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、 M O E 修飾を有する。各ギャップマー全体にわたるヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。各ギャップマー全体のすべてのシトシン残基は、 5 - メチルシトシンである。「開始部位」は、ヒト遺伝子配列においてアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする、最も 5 ' 側のヌクレオシドを示す。「終止部位」は、ヒト遺伝子配列においてアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする、最も 3 ' 側のヌクレオシドを示す。表 6 ~ 9 に列挙される各アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書に配列番号 1 として指定さ 40

れるヒトC9ORF72 mRNA配列 (GENBANK受託番号NM_001256054.1) もしくは本明細書に配列番号2として指定されるヒトC9ORF72ゲノム配列 (ヌクレオシド27535000~27565000が切除されたGENBANK受託番号NT_008413.18の補体) のいずれか、またはその両方を標的とする。「n/a」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、その特定の遺伝子配列を標的としなかつたことを示す。表10のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号3 (GENBANK受託番号BQ068108.1) または配列番号4 (GENBANK受託番号NM_018325.3) のいずれかを標的とする。

【0259】

以下の表6~10に示されるように、配列番号1の核酸塩基90~647、728~1541、1598~1863、1935~2146、2232~2251、2429~2576、2632~2743、2788~2807、2860~2879、2949~2968、3062~3081、3132~3151、および3250~3269を標的とするものを含む、配列番号1を標的とするオリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも50%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、46、47、50、51、53、55、56、57、61、62、64、66、67、72、73、75、76、81、82、85、89、90、91、92、93、94、96、97、100、102、103、109、111、112、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、130、131、132、133、137、139、140、141、145、146、149、150、151、152、153、154、165、166、168、169、170、171、174、179、181、182、183、185、186、187、188、190、192、195、197、199、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、および332が含まれる。配列番号1の核酸塩基90~359、430~479、550~569、617~647、940~959、1013~1033、1446~1465、1687~1706、1844~1863、1935~2007、および2679~2698を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも70%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、34、35、36、40、41、42、43、44、47、66、67、85、96、103、117、119、154、165、168、186、320、321、324、327、328、および331が含まれる。核酸塩基90~265および310~329を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも80%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、35、40、42、および321が含まれる。配列番号1の核酸塩基190~209および310~329を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも90%の阻害を示す。これらには、配列番号40および321が含まれる。

【0260】

以下の表6~20に示されるように、配列番号2の核酸塩基1552~1572、2187~2238、2728~2779、3452~2471、3752~3771、5025~5044、5656~5675、6200~6219、7594~7613、7840~8328、9415~9434、12526~12545、13357~13524、13642~13661、13790~14130、14243~14335、14699~14777、15587~15606、16395~16488、18233~18373、24306~24340、24472~24491、24565~24676、26400~26424、26606~26982、27054~27265、27351~27370、27548~27998、28068~28087、28181~28270、および28369~28388を標的とするものを含む、配列番号2を標的とするオリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも50%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、46、47、50、51、53、55、56、57、61、62、64、66、67、85、96、103、117、119、154、165、168、186、320、321、324、327、328、329、330、331、および332が含まれる。

44、45、46、47、50、51、53、55、56、57、64、67、72、73、75、76、81、82、85、89、90、91、92、93、94、96、97、100、102、103、111、112、115、117、118、119、121、122、123、124、125、126、130、131、132、133、137、139、140、141、145、146、149、150、151、152、153、154、165、166、168、169、170、171、174、179、181、182、183、185、186、187、188、190、192、195、197、199、205、206、208、211、212、224、226、230、231、250、251、252、256、300、301、304、306、307、310、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、および332が含まれる。配列番号2の核酸塩基3452～2471、7840～8159、8230～8249、12526～12545、13642～13661、14075～14094、14316～14335、14758～14777、16395～16414、16469、16488、24655～24674、26963、26982、27054～27126、および27798～27817を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも70%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、34、35、36、40、41、42、43、44、47、67、85、96、103、117、119、154、165、168、186、251、306、320、321、324、327、328、および331が含まれる。配列番号2の核酸塩基7848～8023を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも80%の阻害を示す。これらには、配列番号32、33、35、40、42、および321が含まれる。配列番号2の核酸塩基7870～7889および7990～8009を標的とするものを含む、オリゴヌクレオチドのうちのいくつかは、少なくとも90%の阻害を示す。これらには、配列番号40および321が含まれる。

【表 6 - 1】

配列番号1での標的開始部位	配列番号2での標的開始部位	配列	ISIS番号	阻害%	配列番号
3	1139	AGCGGGACACCGTAGGTTAC	576883	0	30
44	1180	GTGGCGGAACTTGTGCGCTG	576807	1	31
90	7848	GTCACATTATCCAAATGCTC	576808	85	32
125	7883	GGTGGGCAAAGAGTCGACAT	576809	82	33
155	7913	ATCTCTGTCTTGGAACAGC	576810	78	34
160	7918	AAGCAATCTCTGTCTTGGCA	576811	81	35
165	7923	ACTTAAAGCAATCTCTGTCT	576812	78	36
170	7928	TTGCCACTTAAAGCAATCTC	576813	67	37
205	7963	CCCAGTAAGCAAAAGTAGCT	576814	66	38
227	7985	ACTCTAGGACCAAGAACATT	576815	11	39
232	7990	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	576816	78	40
240	7998	CCAAATGTGCCTTACTCTAG	576817	73	41
246	8004	TGGAGCCCAAATGTGCCTTA	576818	81	42
254	8012	TCTGTCTTGGAGGCCAAAT	576819	76	43
275	8033	CCATCACTGAGAAGTACCTG	576820	79	44
281	8039	ATTCTCCATCACTGAGAACG	576821	61	45
288	8046	AAAAGTTATTCTCCATCAC	576822	57	46
295	8053	TGGCAAGAAAAGTTATTCT	576823	70	47
302	8060	GTGTGGTTGGCAAGAAAAGT	576824	44	48
313	8071	CTCCATTTAGAGTGTGGTTG	576825	39	49
330	8088	TGCATTCGAAGGATTCTC	576826	65	50
338	8096	CCACTCTCTGCATTTCGAAG	576827	67	51
362	8120	ACAAAAAACTTACATCTAT	576828	22	52
376	8134	CCTTTCAAGACAAGACAAAA	576829	53	53
401	8159	AAGATTAATGAAACAATAAT	576830	0	54
411	8169	GTTTCCATCAAAGATTAATG	576831	62	55
446	8204	ATTGATAAGTCCATATGTGCT	576832	59	56
452	8210	AGTATAATTGATAGTCCATA	571818	57	57
481	8239	GGAGGTAGAAACTAAGTTCT	576833	45	58

10

20

30

40

【表 6 - 2】

516	8274	ATGTGTTAACATCTATCAACAC	576834	48	59
545	8303	TGCATCCATATTCTTCCTT	576835	43	60
552	n/a	TTCCTTATGCATCCATATT	576836	64	61
559	n/a	CTTGTCTTCCTTATGCATC	576837	57	62
566	n/a	ACATTTCTTGTCTTCCTT	576838	43	63
571	9415	TCTGGACATTTCTTGTCTT	576839	61	64
578	9422	ATAATCTTCTGGACATTTTC	576840	37	65
617	n/a	CTCTGACCCCTGATCTTCAT	576841	79	66
628	12526	TTGGAATAATACTCTGACCC	576842	73	67
663	12561	CAGTCCATTACAGGAATCA	576843	45	68
697	12595	CTTCAGGAACACTGTGTGAT	576844	20	69
705	12603	ATCTATTCTTCAGGAACAC	576845	46	70
722	n/a	AGTACTGTATCAGCTATATC	576846	46	71
728	13357	TCATTGAGTACTGTATCAGC	576847	52	72
734	13363	TCATCATCATTGAGTACTGT	576848	67	73
740	13369	CCAATATCATCATCATTGAG	576849	47	74
755	13384	TCATGACAGCTGTCACCAAT	576850	51	75
761	13390	AAGCCTTCATGACAGCTGTC	576851	52	76
767	13396	AGAAGAAAGCCTTCATGACA	576852	23	77
773	13402	TACTTGAGAAGAAAGCCTTC	576853	24	78
778	13407	ATTCTTACTTGAGAAGAAAG	576854	12	79
782	13411	AAAAATTCTTACTTGAGAAG	576855	0	80
817	13446	AGATGGTATCTGCTTCATCC	576856	61	81
876	13505	CAATCTAAGTAGACAGTCTG	576857	57	82
911	13540	TTAACGAAACAGTTCAAATAC	576858	40	83
978	13607	CTTTAAATAGCAAATGGAAT	576859	26	84
1013	13642	GCCATGATTCTTGTCTGGG	576860	79	85
1056	13685	GCTTTAATGAGAAGTAAAC	576861	17	86
1091	13720	TCTACAGTACAACCTTAATAT	576862	39	87
1126	13755	ATAATTCTTGTCTACGCCTA	576863	44	88
1161	13790	CACTGCTGGATGGAAAAAGA	576864	65	89
1196	13825	TGGTTAACGGCACAAACTC	576865	52	90
1231	13860	TTGCCAACGGTACACAGCA	576866	63	91
1268	13897	CAGATGAGGAAATAGGTGTA	576867	62	92
1303	13932	ACACATTAGGTACTATTACT	576868	63	93

10

20

30

40

【表 6 - 3】

1372	14001	TTTTTATGTTCCAGGCAGT	576869	59	94
1407	14036	AATAGGAAATGTTAGCTATG	576870	30	95
1446	14075	GGCACTCAACAAATACTGGC	576871	72	96
1482	14111	TACATGTAAAGCAACTAGTA	576872	55	97
1539	14168	TAAAATTTCATGAAAATCTG	576873	0	98
1579	14208	AAGTGAATACTTTACTTT	576874	0	99
1614	14243	CATCATGAGCCTAAAGGAAA	576875	51	100
1651	14280	GGCTCTTAGGTTAACACAC	576876	43	101
1673	14302	TGCTTCTGATTCAAGCCATT	576877	65	102
1687	14316	ATACAGGACTAAAGTGCTTC	576878	74	103
1731	14360	CAAATGGGATTAAAATGAT	576879	0	104
1766	14395	TGACATGTAGAGAGATTAAG	576880	26	105
1801	14430	TTATTGAAATACCATCATT	576881	34	106
1836	14465	TAGTCAGTATAATATCATT	576882	18	107

10

20

【表 7 - 1】

配列番号 1 での標的開始部位	配列番号 2 での標的開始部位	配列	ISIS 番号	阻害%	配列番号
851	n/a	GCATTGAGAAGAAAGCCTTC	571824	25	108
1337	n/a	AAGACCTGATCCAGGAAGGC	571836	53	109
861	n/a	TGAGCTGATGGCATTGAGAA	571981	41	110
890	14726	ACAACGGAACAGCCACAGGT	571983	66	111
1420	26405	TTAGTGTCAAGGCTTTCTG	572007	60	112
75	1211	GACGGCTGACACACCAAGCG	576884	8	113
856	n/a	TGATGGCATTGAGAAGAAAG	576891	6	114
917	14753	TTTACTTCTCTGCACTGCT	576892	68	115
922	n/a	TCTTATTTACTTCTCTGCA	576893	63	116
940	16395	GGCATAATGTTCTGACTATC	576894	71	117
979	16434	ATAACCTGGAGCATTTCCTC	576895	65	118
1014	16469	CCCTGACTCATATTTAAATG	576896	70	119
1049	n/a	CCAGTTGAATCCTTTAGCAG	576897	51	120
1084	18233	CATACATGACTTGCCGGAAA	576898	66	121
1119	18268	GACATCCACATCTATGTGTG	576899	63	122
1154	18303	TGTTCATGACAGGGTGGCAT	576900	66	123
1163	18312	TTATAAAATATGTTCATGACA	576901	51	124
1191	18340	CAGCTCGGATCTCATGTATC	576902	52	125
1205	18354	CTCCAGAAGGCTGTCAGCTC	576903	59	126
1238	18387	GTATCCTGAGCCATGTCTTC	576904	33	127
1273	18422	AATCAGGAGTAAAGCTTCG	576905	48	128
1283	n/a	AAAATATTCAAATCAGGAGT	576906	23	129
1304	24306	TCTCTGTGTAAGACATCTTG	576907	51	130
1309	24311	GAGTGTCTCTGTGTAAGACA	576908	54	131
1314	24316	CACTAGAGTGTCTCTGTGTA	576909	50	132
1319	24321	GCTTCACTAGAGTGTCTCT	576910	60	133
1330	24332	GATCCAGGAAGGCTTCACT	576911	35	134
1373	26358	AAAGTACTTCTGAGAGATAA	576912	38	135
1385	26370	AACTGTGCAAGGAAAGTACT	576913	43	136

10

20

30

40

【表 7 - 2】

1415	26400	GTCAAGGCTTTCTGTGAAG	576914	65	137
1472	26591	AGAGATTAAAGGGCTTTT	576915	46	138
1487	26606	ATCTCAGGTTCCGAAGAGA	576916	53	139
1511	26630	CCCTCTGCTGTTAAATCAAG	576917	51	140
1522	26641	TGTTAAGATGCCCTCTGCT	576918	64	141
1529	26648	ATTATTATGTTAAGATGCC	576919	46	142
1535	26654	AGAGCCATTATTATGTTAAG	576920	36	143
1571	26690	ATAAAAGAGTGTAGGCCTGG	576921	46	144
1598	26717	ACACTAGTGTAGAAAGGTCT	576922	55	145
1606	26725	GTTCTTGACACTAGTGTAG	576923	62	146
1628	26747	TAAAAAGTCATTAGAACATC	576924	10	147
1644	26763	TATTAAGTTACACATTAAA	576925	20	148
1679	26798	CTTTACCAGCGATCATGATT	576926	57	149
1725	26844	TTCTGGAGTATGATCCAGGG	576927	64	150
1752	24472	ACTTAAC TGCAATTGCTGAG	576928	66	151
	26871				
1765	26884	TGTAGTGTAACTTACTTAAC	576929	60	152
1802	26921	ATGCACCTGACATCCCCCTCA	576930	56	153
1844	26963	CCCAAAAGCATAAATCTAGG	576931	71	154
1876	24596	ATATTATTATATTGTAAAC	576932	0	155
	26995				
1883	24603	AGCAATAATATTATTATAT	576933	1	156
	27002				
1887	24607	AGATAGCAATAATATTATT	576934	0	157
	27006				
1889	24609	AAAGATAGCAATAATATT	576935	0	158
	27008				
1892	24612	TTAAAAGATAGCAATAATAT	576936	3	159
	27011				
1896	24616	ATCTTAAAAGATAGCAATA	576937	14	160
	27015				
1898	24618	ATATCTTAAAAGATAGCAA	576938	15	161
	27017				
1901	24621	ATTATATCTTAAAAGATAG	576939	12	162
	27020				

10

20

30

40

【表 7 - 3】

1905	24625 27024	TATTATTATATCTTAAAAG	576940	6	163
1918	27037	CAAGTTACATCCTATTATT	576941	48	164
1935	24655 27054	AAAACAGTAGTTGTGGTCAA	576942	77	165
1937	24657 27056	AAAAAACAGTAGTTGTGGTC	576943	69	166
1953	27072	TGAATCATGTATTCAAAAAA	576944	17	167
1988	27107	GCCAACTCAGATTCACCTT	576945	71	168
2036	27155	CTACACACCAAAGAACATGCCA	576946	69	169
2071	27190	AGTTTCAGTTGATTGCAGA	576947	58	170
2127	27246	CATCCTATGTTCAAGCTCAC	576948	51	171
2162	27281	TAAACATCTGCTTGATCAAT	576949	44	172
2197	27316	AATCCACAAAGTAGGATCTA	576950	42	173
2232	27351	ATTAGACATTTCTACAGACT	576951	56	174
2325	27444	CTCAACTACATAGAACATCA	576952	45	175
2371	27490	TTGGCAACAATTACTAAAC	576953	48	176
2400	27519	TCAAAAATAATGAAAATTAA	576954	0	177
2409	27528	CAATTGGCTAAAAATAAT	576955	3	178
2429	27548	GGCACAGGAGGTGCACATT	576956	60	179

【表 8 - 1】

配列番号1での標的開始部位	配列番号2での標的開始部位	配列	ISIS 番号	阻害%	配列番号
2451	27570	TAGATTTCTAAGGAGAAAA	576957	8	180
2486	27605	ACTGACCAGTGAAATCTGAA	576958	50	181
2522	27641	GGTAAGACTTAGCAAGAAGA	576959	59	182
2557	27676	TCTCAGAGTTGCAATGATTG	576960	63	183
2597	27716	AGATCTTATTAGTTAGTATA	576961	18	184
2632	27751	AGTACTCAAGGAACATTTT	576962	57	185
2679	27798	GGCAAACAGCAACAACTTCA	576963	71	186
2724	27843	GCACTTCAGTAAAATTCTC	576964	69	187
2788	27907	GGTCCAAACGCATTAAGAAA	576965	58	188
2825	27944	GAATTATATTAAATCAGTTAT	576966	0	189
2860	27979	TGTGTTTGTGTAAC TACAAT	576967	67	190
2895	28014	ATATTACTTCCAGAACATTAA	576968	19	191
2949	28068	GGCAGAAGGGCTCTATTACC	576969	59	192
2992	28111	CATTCGAACATGTCATTG	576970	40	193
3027	28146	CTGATTGATGGAAAGC	576971	34	194
3062	28181	GTGGTTGTCTAAACATCAA	576972	58	195
3097	28216	ATGACTGAGCTACAGTACAA	576973	47	196
3132	28251	GGGACACTACAAGGTAGTAT	576974	56	197
3167	28286	TTAAATAAGAACATACCAG	576975	12	198
3250	28369	GCTTTAATAACTTATTCAC	576976	54	199
3282	28401	AGGAGAAAAGATATATAACA	576977	0	200
3288	28407	CCATTAGGAGAAAAGATAT	576978	0	201
n/a	1343	TTCACCCCTCAGCGAGTACTG	576979	0	202
n/a	1403	AGGCTGCGGTTGTTCCCTC	576980	0	203
n/a	1800	GCCAGATCCCCATCCCTGT	576981	11	204
n/a	2187	TCACTTCCTTAAAGCAAGTC	576982	52	205
n/a	2209	AGTGATGCCAAGTCACAAT	576983	53	206
n/a	2214	AGTCAAGTGATGCCAAGTC	576984	47	207

10

20

30

40

【表 8 - 2】

n/a	2219	CCATCAGTCAGTGATGCC	576985	60	208	
n/a	2224	GATTACCATCAGTCAGTGA	576986	29	209	
n/a	2229	CAACTGATTACCATCAGTCA	576987	42	210	
n/a	2728	GCAGTTCCAAGTCAAGTGA	576988	58	211	
n/a	2760	CGTTCTGTTCAAGATGTAC	576989	57	212	
n/a	2862	GCCAAACAAAATATTTATC	576990	22	213	
n/a	2995	TAGGTAGGCTAACCTAGTCC	576991	47	214	10
n/a	3196	TCCCAGCCAAAGAGAGAAC	576992	41	215	
n/a	3466	GGATCATAGCTCTCGGTAAC	576993	26	216	
n/a	3540	AATCATAAAGCCCTCACTTC	576994	7	217	
n/a	3595	CTGATTGGTATTAGAAAGG	576995	3	218	
n/a	3705	ATGCAGACATGATTACATTA	576996	48	219	
n/a	4560	TTCATCATTAAACTGAAAAT	576997	0	220	
n/a	4613	CTTTAGGTTAAAAGGTGG	576998	35	221	
n/a	4986	ATACAGAGCCTGGCAAAACA	576999	30	222	
n/a	5036	TTCTATTACAGAGCATTAG	577000	29	223	20
n/a	5656	GCCTTCACATTAATTACCA	577001	62	224	
n/a	6051	TGTGTTATTGCCCTAAAAA	577002	24	225	
n/a	6200	TGTATTCACTATACTATGCC	577003	52	226	
n/a	6276	AAGTTATTAAAGTATAGCA	577004	0	227	
n/a	6762	GACATTGAAGTATCAAGACA	577005	34	228	
n/a	6965	TGTTAAGTAATCTTAGAAAAA	577006	0	229	
n/a	7594	GGCATAACATTAGAAATTCA	577007	60	230	
n/a	8309	ACCTTATGCATCCATATTCT	577008	59	231	30
n/a	8784	GAATTCTCTGGAACCAT	577009	42	232	
n/a	8834	ATATTCAACTACAGGATTAA	577010	13	233	
n/a	8884	ATGTGTTCTTAGATACATC	577011	42	234	
n/a	9510	CCTTATACAGATACATGCTG	577012	37	235	
n/a	9663	TAGATGCAATTACTATTTTC	577013	34	236	
n/a	10742	TGTACTTCCCAAACCTGAA	577014	24	237	
n/a	10845	CTGAAGCTAACACACCAA	577015	49	238	
n/a	11684	GTCTATAGAACAAACTGAA	577016	38	239	
n/a	11851	TTGAATCAATACCTAACCTC	577017	23	240	
n/a	11991	TGCCTCTTTAGAAAAGATC	577018	44	241	
n/a	12042	ATGGAATCATGGTTATCG	577019	43	242	40

【表 8 - 3】

n/a	12069	AAAGCTCACTTTATTCTTT	577020	37	243
n/a	12333				
n/a	12170	GGTGCCGCCACCATGCCCGG	577021	0	244
n/a	12464	GAGAGAAGCTGGGCAATAAA	577022	2	245
n/a	12514	TCTGACCCTGCACAATAAG	577023	0	246
n/a	13016	ATAGTGTGTGATTCAAAACG	577024	17	247
n/a	13348	ACTGTATCAGCTATCTAAAA	577025	22	248
n/a	14540	TTATTGTATAGGAACCTAC	577026	44	249
n/a	14699	TGTGAGCTGATGGCACTGTA	577027	61	250
n/a	14758	CCTTATTTACTTCTCTGCA	577028	71	251
n/a	15587	GGAATAAGGTCACTAGTCG	577029	69	252
n/a	17187	ATTTGCAACAATTTTAAAT	577030	8	253
n/a	21808	ATAAACTACCAATGATATCC	577031	13	254
n/a	24337	TACCTGATCCAGGAAGGCTT	577032	40	255
n/a	24565	TTCCCGAAGCATAAATCTAG	577033	53	256
n/a	25549	TTGAGAAGCATGAAATTCCA	577034	48	257

10

20

【表 9 - 1】

配列番号 1 での標的開始部位	配列番号 2 での標的開始部位	配列	ISIS 番号	阻害%	配列番号
310	7990	GCCTTACTCTAGGACCAAGA	576816	90	40
75	1211	GACGGCTGACACACCAAGCG	576884	0	113
2	1138	GCGGGACACCGTAGGTTACG	577035	0	258
10	1146	CTTCCTAGCGGGACACCGT	577036	1	259
18	1154	GCACCTCTTTCTAGCGG	577037	0	260
26	1162	TGTTGACGCACCTCTCTT	577038	0	261
34	1170	CTTGTGCTGTTGACGCAC	577039	0	262
42	1178	GGGCGGAACTTGTCGCTGTT	577040	0	263
83	1219	GCAGCAGGGACGGCTGACAC	577041	0	264
95	1231	AGAACGAAACCGGGCAGCAGG	577042	0	265
103	1239	CCCAAAAGAGAAGCAACCGG	577043	0	266
111	1247	ACCCCGCCCCAAAGAGAA	577044	1	267
119	1255	CTTGCTAGACCCCGCCCCA	577045	0	268
127	1263	CACCTGCTCTGCTAGACCC	577046	0	269
135	1271	TAAACCCACACCTGCTTTG	577047	0	270
139	1275	CTCCTAAACCCACACCTGCT	577048	0	271
n/a	1283	ACACACACCTCCTAAACCCA	577049	0	272
n/a	1291	AAACAAAAACACACACCTCC	577050	5	273
n/a	1299	GGTGGGAAAAACACAAAAACAC	577051	1	274
n/a	1326	CTGTGAGAGCAAGTAGTGGG	577052	3	275
n/a	1334	AGCGAGTACTGTGAGAGCAA	577053	0	276
n/a	1342	TCACCCCTCAGCGAGTACTGT	577054	0	277
n/a	1358	TCAGGTCTTCTGTTCAC	577055	0	278
n/a	1366	AATCTTATCAGGTCTTTC	577056	16	279
n/a	1374	TTCTGGTTAATCTTATCAG	577057	22	280
n/a	1382	TTGTTTCTTCTGGTTAAC	577058	19	281
n/a	1390	TTCCCTCCTGTTTCTTCT	577059	28	282
n/a	1398	GCGGTTGTTCCCTCCTGT	577060	17	283
n/a	1406	TACAGGCTGCGGTTGTTCC	577061	28	284

10

20

30

40

【表 9 - 2】

n/a	1414	GAGCTTGCCTACAGGCTGCGG	577062	23	285
n/a	1422	GAGTTCCAGAGCTTGCCTACA	577063	14	286
n/a	1430	CGACTCCTGACTTCCAGAGC	577064	0	287
n/a	1446	CCCGGCCCTAGCGCGCGAC	577065	0	288
n/a	1454	GCCCCGGCCCCGGCCCCTAG	577066	0	289
n/a	1465	ACCACGCCCCGGCCCCGGCC	577067	0	290
n/a	1473	CCGCCCCGACCACGCCCCGG	577068	0	291
n/a	1481	CCCCGGGCCCCGCCCCGACCA	577069	0	292
n/a	1495	CGCCCCGGGCCCCGCCCCGG	577070	0	293
n/a	1503	CGCAGCCCCGCCCGGGCCC	577071	0	294
n/a	1511	ACCGCAACCGCAGCCCCGCC	577072	0	295
n/a	1519	GCGCAGGCACCGCAACCGCA	577073	18	296
n/a	1520	GGCGCAGGCACCGCAACCGC	577074	17	297
n/a	1536	CGCCTCCGCCGCCGCGGGCG	577075	32	298
n/a	1544	ACCGCCTGCGCCCTCCGCCGC	577076	43	299
n/a	1552	CACTCGCCACCGCCTGCGCC	577077	52	300
n/a	1553	CCACTCGCCACCGCCTGCGC	577078	52	301
n/a	1853	GGTCCCCGGAAGGAGACAG	577079	41	302
n/a	2453	AACAACTGGTGCATGGAAC	577080	42	303
n/a	2753	GTTCAGATGTACTATCAGC	577081	63	304
n/a	3053	AAGGTGAAGTTCATATCACT	577082	10	305
n/a	3452	GGTAACTTCAAACCTTTGGG	577083	70	306
n/a	3752	GGTCATGAGAGGTTCCCA	577084	53	307
n/a	4052	TACTGAATTGCTTAGTTTA	577085	25	308
n/a	4425	CTAACAGAATAAGAAAAAAA	577086	0	309
n/a	5025	GAGCATTAGATGAGTGCTTT	577087	52	310
n/a	5325	TGCATTCTAACGAAATGTGT	577088	28	311
n/a	5661	TCTAGGCCTTCACATTAATT	577089	37	312
n/a	5961	CCTGTCTATGCCTAGGTGAA	577090	19	313
n/a	6261	TAGCACATACAATTATTACA	577091	38	314
n/a	6566	GAGGAGAAGAACATAAACGC	577092	20	315
n/a	6866	TACCACAAAGTCTGGAGCCAT	577093	27	316
n/a	7166	GATACTGGATTGTTGAACT	577094	1	317
n/a	7466	TAGTATGACTGGAGATTGG	577095	1	318
n/a	7766	ATCAAAACCCCAAATGATT	577096	13	319

10

20

30

40

【表 9 - 3】

160	7840	ATCCAAATGCTCCGGAGATA	577097	78	320
190	7870	TCGACATCACTGCATTCAA	577098	95	321
220	7900	CAACAGCTGGAGATGGCGGT	577099	56	322
250	7930	ATTTGCCACTTAAAGCAATC	577100	62	323
340	8020	GTACCTGTTCTGTCTTGGA	577101	76	324
370	8050	CAAGAAAAGTTATTCTCCA	577102	65	325
400	8080	GAAGGATTCTCCATTAGA	577103	50	326
430	8110	TTACATCTATAGCACCCTC	577104	73	327
460	8140	TCACTCCCTTTCAGACAAG	577105	73	328
490	8170	AGTTTCCATCAAAGATTAAT	577106	55	329
520	8200	ATAGTCCATATGTGCTGCGA	577107	57	330
550	8230	AACTAAGTTCTGTCTGTGGA	577108	71	331
580	8260	CAACACACACTCTATGAAGT	577109	54	332
610	8290	TTCCCTTCCGGATTATATGT	577110	0	333

10

【表 10】

標的配列番号	標的開始部位	ISIS番号	配列	阻害%	配列番号
3	751	576885	TTTCCATTACAGGAATCACT	63	334
3	807	576886	ATCAGCCTATATCTATTCC	15	335
3	855	576887	TCAATGACCAGGCGGTCCCC	0	336
3	905	576888	CTTTTTATGGAAAAGGAAAA	0	337
3	984	576889	TGTTTCCCCAAAAATTCTG	0	338
4	50	576890	AGATATCCACTCGCCACCGC	42	339

30

【0261】

実施例2: HepG2細胞におけるヒトC9ORF72の用量依存性アンチセンス阻害C9ORF72 mRNAの有意なインビトロ阻害を示した上述の研究からのアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択し、HepG2細胞において種々の用量で試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、類似の培養条件を有する一連の実験において試験した。各実験の結果を、以下に示される別々の表に提示する。1ウェル当たり20,000細胞の密度で細胞を播種し、エレクトロポレーションを使用して、82.3nM、246.9nM、740.7nM、2,222.2nM、6,666.7nM、または20,000nMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、C9ORF72 mRNAレベルを、定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトC9ORF72プライマープローブセットRTS3750を使用してmRNAレベルを測定した。C9ORF72 mRNAレベルを、RIBOGREEN(登録商標)によって測定される全RNA含量に応じて調整した。結果を、未処理の対照細胞に対するC9ORF72の阻害パーセントとして提示する。

【0262】

各オリゴヌクレオチドの半最大阻害濃度($I_{C_{50}}$)もまた、表11~13に提示する。示されるように、C9ORF72 mRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチ

40

50

ド処理細胞において、用量依存性様式で低減された。

【表11】

ISIS番号	82.3nM	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM	IC ₅₀ (μM)
576816	5	23	49	76	91	96	0.9
576817	8	2	6	29	58	83	4.7
576818	0	22	31	68	87	90	1.4
576819	0	12	44	72	81	86	1.4
576820	18	24	52	78	91	93	0.7
576841	23	19	29	52	75	85	1.6
576842	6	12	13	37	53	83	4.1
576860	9	24	54	70	83	87	1.0
576878	1	9	26	61	77	83	2.0
576931	16	21	24	49	77	83	1.8
576942	6	16	26	57	78	85	1.8

10

20

【表12】

ISIS番号	82.3nM	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM	IC ₅₀ (μM)
576894	9	30	38	61	75	84	1.3
576896	17	17	28	47	66	76	2.5
576927	3	26	40	60	79	81	1.5
576943	37	37	55	77	84	82	0.4
576945	20	41	56	73	83	84	0.6
576946	8	28	46	69	81	88	1.0
576963	0	0	25	51	63	83	2.9
576964	11	18	37	58	73	77	1.8
576967	19	31	48	68	77	85	0.9
577028	6	19	25	59	79	88	1.6
577029	7	22	44	67	77	85	1.3

30

40

【表13】

ISIS番号	82.3nM	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM	IC ₅₀ (μM)
576960	0	12	28	49	58	78	3.2
576974	25	45	65	70	65	78	0.5
576816	18	36	53	82	91	95	0.6
577097	22	20	31	63	82	94	1.1
577101	16	23	39	62	80	89	1.2
577105	0	4	30	48	78	92	2.0
577104	4	1	16	56	80	92	2.0
577108	0	0	24	52	76	83	2.9
577083	0	0	24	50	73	74	3.0
577078	0	0	10	15	30	75	10.8
577077	0	0	22	22	51	83	5.0

10

【0263】

20

実施例3：HepG2細胞におけるヒトC9ORF72の用量依存性アンチセンス阻害

C9ORF72 mRNAの有意なインピトロ阻害を示した上述の研究からのアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択し、HepG2細胞において種々の用量で試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、類似の培養条件を有する一連の実験において試験した。各実験の結果を、以下に示される別々の表に提示する。1ウェル当たり20,000細胞の密度で細胞を播種し、エレクトロポレーションを使用して、246.9nM、740.7nM、2,222.2nM、6,666.7nM、または20,000nMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。おおよそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、C9ORF72全mRNAレベル、ならびにエクソン1転写産物のmRNAを、定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトC9ORF72プライマープローブセットRTS3750を使用して全C9ORF72 mRNAレベルを測定した。プライマープローブセットRTS3905（順方向配列GGGTCTAGCAAGAGCAGGTG、本明細書に配列番号18として指定される；逆方向配列GTC TTGGCAACAGCTGGAGAT、本明細書に配列番号19として指定される；プローブ配列TGAATGTCGACTCTTGGCCACCGC、本明細書に配列番号20として指定される）を使用して、エクソン1メッセージ転写産物を測定した。C9ORF72 mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）によって測定される全RNA含量に応じて調整した。結果を、未処理の対照細胞に対するC9ORF72の阻害パーセントとして提示する。

30

【0264】

40

各オリゴヌクレオチドの半最大阻害濃度（IC₅₀）もまた、表14および15に提示する。示されるように、C9ORF72 mRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞において、用量依存性様式で低減された。「n.d.」は、その特定の用量に関してデータが存在しないことを示す。

【表14】

全C9ORF72 mRNAレベルの阻害%

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM	IC ₅₀ (μM)
576816	29	53	84	90	92	0.60
576820	20	42	70	87	75	1.19
576860	25	53	72	86	85	0.80
576974	36	49	64	65	68	0.95
577041	3	0	0	0	0	>20.00
577042	0	2	0	3	0	>20.00
577061	0	3	0	4	0	>20.00
577065	7	0	1	6	0	>20.00
577069	3	0	3	0	0	>20.00
577073	7	0	8	11	0	>20.00
577074	0	7	11	15	0	>20.00
577078	0	2	20	65	81	5.22
577083	0	19	55	71	75	3.35
577088	6	11	49	61	74	3.93
577097	3	38	62	78	82	1.94

10

20

30

40

【表15】

C9ORF72エクソン1 mRNAレベルの阻害%

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM	IC ₅₀ (μM)
576794	42	67	n.d.	93	87	0.27
576816	45	78	93	n.d.	n.d.	0.26
576820	54	65	92	98	94	<0.247
576860	43	36	71	95	91	0.66
577041	0	0	49	4	31	>20.00
577042	9	15	0	33	12	>20.00
577061	8	36	70	67	76	2.03
577065	20	55	67	82	62	1.06
577069	22	24	61	74	70	2.16
577073	4	62	69	82	81	1.21
577074	8	49	69	85	85	1.29
577078	0	21	59	81	n.d.	1.90
577083	30	43	85	88	92	0.71
577088	38	44	79	87	91	0.61
577097	17	47	52	94	89	1.27

【0265】

実施例4：HeLa細胞におけるヒトC9ORF72のアンチセンス阻害

50

C 9 O R F 7 2 核酸のヘキサヌクレオチド反復伸長を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、インビトロでそれらが C 9 O R F 7 2 mRNA に及ぼす効果について試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、類似の培養条件を有する一連の実験において試験した。各実験の結果を、以下に示される別々の表に提示する。比較のために I S I S 5 7 6 8 1 6 および I S I S 5 7 7 0 6 5 がこれらのアッセイに含まれた。1 ウェル当たり 3 5 , 0 0 0 細胞の密度で培養した C 9 O R F 7 2 線維芽細胞に、エレクトロポレーションを使用して、7 , 0 0 0 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドをトランسفェクトした。およそ 2 4 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、C 9 O R F 7 2 mRNA レベルを、定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープローブセット R T S 3 7 5 0 、 R T S 3 9 0 5 、または R T S 4 0 9 7 (順方向配列 C A A G C C A C C G T C T C A C T C A A 、本明細書に配列番号 2 4 として指定される ; 逆方向配列 G T A G T G C T G T C T A C T C C A G A G A G T T A C C 、本明細書に配列番号 2 5 として指定される ; プローブ配列 C T T G G C T T C C C T C A A A A G A C T G G C T A A T G T 、本明細書に配列番号 2 6 として指定される) を使用して、mRNA レベルを測定した。 R T S 3 7 5 0 は、mRNA 転写産物のエクソン 2 を標的とするため、全 mRNA 転写産物を測定する。 R T S 3 9 0 5 は、ヘキサヌクレオチド反復伸長含有転写産物を標的とするため、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物のみを測定する。 R T S 4 0 9 7 は、ヘキサヌクレオチド反復伸長の 3' 部位の遺伝子配列を標的とする。 mRNA レベルを、 R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 RNA 含量に応じて調整した。結果を、未処理の対照細胞に対する C 9 O R F 7 2 の阻害パーセントとして提示する。「 n . d . 」は、その特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドに関してデータが存在しないことを示す。

【 0 2 6 6 】

表 1 6 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、一様な M O E オリゴヌクレオチド、または 3 - 1 0 - 3 M O E 、 4 - 1 0 - 3 M O E 、 4 - 1 0 - 4 M O E 、 5 - 1 0 - 4 M O E 、もしくは 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーとして設計した。一様な M O E オリゴヌクレオチドは、長さが 2 0 ヌクレオシドであり、ここで、各ヌクレオシドは、 2' - M O E 基を含む。 3 - 1 0 - 3 M O E ギャップマーは、長さが 1 6 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2' - デオキシヌクレオシドを含み、 5' 末端および 3' 末端の両方にそれぞれ 3 個のヌクレオシド含むウイングセグメントが隣接する。 4 - 1 0 - 3 ギャップマーは、長さが 1 7 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2' - デオキシヌクレオシドを含み、 5' 末端および 3' 末端の両方にそれぞれ 4 個および 3 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する。 4 - 1 0 - 4 ギャップマーは、長さが 1 8 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2' - デオキシヌクレオシドを含み、 5' 末端および 3' 末端の両方にそれぞれ 4 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する。 5 - 1 0 - 4 ギャップマーは、長さが 1 9 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2' - デオキシヌクレオシドを含み、 5' 末端および 3' 末端の両方にそれぞれ 5 および 4 個のヌクレオチドを含むウイングセグメントが隣接する。 5 - 1 0 - 5 ギャップマーは、長さが 2 0 ヌクレオシドであり、ここで、中央のギャップセグメントは、 1 0 個の 2' - デオキシヌクレオシドを含み、 5' 末端および 3' 末端の両方にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する。 5' ウイングセグメントの各ヌクレオシドおよび 3' ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、 2' - M O E 基を含む。各オリゴヌクレオチド全体にわたるヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。各オリゴヌクレオチド全体のすべてのシトシン残基は、 5 - メチルシトシンである。「開始部位」は、ヒト遺伝子配列においてアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする、最も 5' 側のヌクレオシドを示す。「終止部位」は、ヒト遺伝子配列においてアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする、最も 3' 側のヌクレオシドを示す。表 1 6 に列挙される各アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書に配列番号 2 として指定されるヒト C 9 O R F 7 2 ゲノム配列 (ヌクレオシド 2 7 5 3 5 0 0 0 ~ 2 7 5 6 5 0 0 0 が切除さ

10

20

30

40

50

れた G E N B A N K 受託番号 N T _ 0 0 8 4 1 3 . 1 8 の補体) または C 9 O R F 7 2 遺伝子のイントロン 1 からのヘキサヌクレオチド反復の伸長バージョンである配列番号 1 3 を標的とする。

【 0 2 6 7 】

データは、ある特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヘキサヌクレオチド反復を含有する C 9 O R F 7 2 m R N A 転写産物レベルのレベルを選択的に阻害することを示す。

【表 1 6 - 1 】

配列番号 2 上の標的開始部位	配列番号 13 上の標的開始部位	モチーフ	配列	ISIS 番号	阻害% (RTS3750)	阻害% (RTS3905)	阻害% (RTS4097)	配列番号
1457	1	一様な MOE	CCGGCCCCGGCC CCGGCCCC	573674	0	34	0	340
	7							
	13							
1458	2	一様な MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGGGCCC	573675	0	28	0	341
	8							
	14							
1459	3	一様な MOE	CCCCGGCCCCGG CCCCGGCC	573676	0	34	0	342
	9							
	15							
1460	4	一様な MOE	GCCCCGGCCCCG GCCCCGGC	573677	4	41	0	343
	10							
	16							
n/a	5	一様な MOE	GGCCCCGGCCCC GGCCCCGG	573678	12	11	6	344
	11							
	17							
n/a	6	一様な MOE	CGGCCCCGGCCC CGGCCCCG	573679	0	0	0	345
	12							
1457	1	一様な MOE	CGGCCCCGGCCC CGGCCCC	573680	10	6	0	346
	7							
	13							
1458	2	一様な MOE	CCGGCCCCGGCC CCGGCCCC	573681	13	23	0	347
	8							
	14							

10

20

30

40

【表 1 6 - 2】

10

20

30

40

【表 1 6 - 3】

1458	2	一様な MOE	GGCCCCGGCCCC GGCCC	573693	9	0	0	359
	8							
	14							
	20							
1459	3	一様な MOE	CGGGCCCCGGCCC CGGCC	573694	10	0	0	360
	9							
	15							
1460	4	一様な MOE	CCGGCCCCGGCC CCGGC	573695	3	42	0	361
	10							
	16							
1461	5	一様な MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGG	573696	0	23	0	362
	11							
	17							
1462	6	一様な MOE	CCCCGGCCCCGG CCCCG	573697	0	28	0	363
	12							
	18							
1457	1	一様な MOE	CCCCGGCCCCGG CCCC	573698	1	68	0	364
	7							
1463	13	一様な MOE	CCCCGGCCCCGG CCCC	573698	1	68	0	364
	19							
1458	2	一様な MOE	GCCCGGGCCCCG GCC	573699	0	31	0	365
	8							
1464	14	一様な MOE	GGCCCCGGCCCC GGCC	573700	7	2	2	366
	20							
1459	3	一様な MOE	GGCCCCGGCCCC GGCC	573700	7	2	2	366
	9							
	15							
	21							
1460	4	一様な MOE	CGGGCCCCGGCCC CGGC	573701	15	1	8	367
	10							
	16							
1461	5	一様な MOE	CCGGCCCCGGCC CCGG	573702	26	0	0	368
	11							
	17							

10

20

30

【表 1 6 - 4】

1462	6	一様な MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCG	573703	12	52	10	369
	12							
	18							
1457	1	5-10-5 MOE	CCGGGGCCCCGGCC CCGGCCCC	573716	0	93	46	340
	7							
	13							
1458	2	5-10-5 MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGGGCC	573717	0	98	0	341
	8							
	14							
1459	3	5-10-5 MOE	CCCCGGGGGGGG CCCCGGCC	573718	0	98	2	342
	9							
	15							
1460	4	5-10-5 MOE	GCCCGGGGGGGG GCCCGGGC	573719	0	68	19	343
	10							
	16							
n/a	5	5-10-5 MOE	GGCCCCGGGGGG GGCCCCGG	573720	13	90	18	344
	11							
	17							
n/a	6	5-10-5 MOE	CGGGCCCCGGGG CGGGCCCC	573721	0	98	18	345
	12							
1457	1	5-10-5 MOE	CGGGCCCCGGGG CGGGCCCC	573722	0	97	0	346
	7							
	13							
1458	2	5-10-5 MOE	CCGGGGCCCCGGCC CCGGGGCC	573723	0	n.d.	8	347
	8							
	14							
1459	3	5-10-5 MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGGGCC	573724	0	94	28	348
	9							
	15							
1460	4	5-10-5 MOE	CCCCGGGGGGGG CCCCGGGC	573725	0	94	7	349
	10							
	16							
1461	5	5-10-5 MOE	GCCCGGGGGGGG GCCCGGGG	573726	0	n.d.	28	350
	11							
	17							

10

20

30

40

【表 1 6 - 5】

n/a	6	5-10-5 MOE	GGCCCCGGCCCC GGCCCCG	573727	0	98	40	351
	12							
	18							
1457	1	4-10-4 MOE	GGCCCCGGCCCC GGCCCC	573728	0	97	19	352
	7							
	13							
	19							
1458	2	4-10-4 MOE	CGGGCCCCGGCCC CGGGCCC	573729	0	n.d.	36	353
	8							
	14							
1459	3	4-10-4 MOE	CCGGCCCCGGCC CCGGCC	573730	0	94	24	354
	9							
	15							
1460	4	4-10-4 MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGGC	573731	0	97	13	355
	10							
	16							
1461	5	4-10-4 MOE	CCCCGGCCCCGG CCCCGG	573732	0	97	1	356
	11							
	17							
1462	6	4-10-4 MOE	GCCCGGGCCCCG GCCCG	573733	0	n.d.	0	357
	12							
	18							
1457	1	4-10-3 MOE	GCCCGGGCCCCG GCCCG	573734	0	96	0	358
	7							
1463	13	4-10-3 MOE	GCCCGGGCCCCG GCCCG	573734	0	96	0	358
	19							
1458	2	4-10-3 MOE	GGCCCCGGCCCC GGCCC	573735	0	94	21	359
	8							
	14							
	20							
1459	3	4-10-3 MOE	CGGGCCCCGGCCC CGGCC	573736	0	93	43	360
	9							
	15							

10

20

30

【表 1 6 - 6】

1460	4	4-10-3 MOE	CCGGCCCCGGCC CCGGC	573737	0	96	19	361
	10							
	16							
1461	5	4-10-3 MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCGG	573738	0	n.d.	24	362
	11							
	17							
1462	6	4-10-3 MOE	CCCCGGCCCCGG CCCCG	573739	0	n.d.	34	363
	12							
	18							
1457	1	3-10-3 MOE	CCCCGGCCCCGG CCCC	573740	0	n.d.	4	364
	7							
1463	13							
	19							
1458	2	3-10-3 MOE	GCCCCGGCCCCG GCC	573741	0	95	6	365
	8							
1464	14							
	20							
1459	3	3-10-3 MOE	GGCCCCGGCCCC GGCC	573742	23	97	49	366
	9							
	15							
	21							
1460	4	3-10-3 MOE	CGGCCCGGGCCC CGGC	573743	0	96	0	367
	10							
	16							
1461	5	3-10-3 MOE	CCGGCCCCGGCC CCGG	573744	0	94	34	368
	11							
	17							
1462	6	3-10-3 MOE	CCCGGGCCCCGGC CCCG	573745	0	n.d.	8	369
	12							
	18							
7990	n/a	5-10-5 MOE	GCCTTACTCTAG GACCAAGA	576816	83	91	29	40
1446	n/a	5-10-5 MOE	CCCGGGCCCCCTAG CGCGCGAC	577065	0	87	34	288

10

20

30

40

【0268】

実施例5：C9ORF72アンチセンスオリゴヌクレオチドの処理によるインピボでの齧歯類阻害および耐容性

インピボでのC9ORF72発現の阻害の耐容性を評価するために、マウスC9ORF72核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、マウスおよびラットモデルにおいて評価した。

【0269】

長さが20ヌクレオシドであり、中央のギャップセグメントが10個の2'-デオキシヌクレオシドを含み、5'末端および3'末端の両方にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する、5'-10'-5MOEギャップマーとして、ISIS

50

571883を設計した。5'ウイングセグメントの各ヌクレオシドおよび3'ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、MOE修飾を有する。ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。ギャップマー全体のすべてのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。ISIS 571883は、本明細書に配列番号11として指定されるマウスC9ORF72ゲノム配列(ヌクレオシド3587000~3625000が切除されたGENBANK受託番号NT_166289.1の補体)にヌクレオシド33704という標的開始部位を有する。

【0270】

長さが20ヌクレオシドであり、中央のギャップセグメントが10個の2' - デオキシヌクレオシドを含み、5'末端および3'末端の両方にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接する、5-10-5MOEギャップマーとして、ISIS 603538を設計した。5'ウイングセグメントの各ヌクレオシドおよび3'ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、MOE修飾を有する。ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合またはリン酸エステル結合のいずれかである(Gs A o C o C o Gs C s T s T s Gs A s Gs T s T s T s Gs C o C o A o C s A;ここで、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を表し、「o」は、リン酸エステル結合を表し、A、G、C、Tは、関連するヌクレオシドを表す)。ギャップマー全体のすべてのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。ISIS 603538は、本明細書に配列番号12として指定されるラットC9ORF72 mRNA配列(GENBANK受託番号NM_001007702.1)にヌクレオシド2872という標的開始部位を有する。

【0271】

マウス実験1

それぞれ4匹ずつのC57BL/6マウスの群に、脳室内ボーラス注射で投与される50μg、100μg、300μg、500μg、または700μgのISIS 571883を注射した。4匹のC57BL/6マウスの対照群を、同様にPBSで処理した。動物に、3%イソフルオランで麻酔を行い、定位フレームに入れた。手術部位を滅菌した後、各マウスに、ブレグマから前後方向に-0.2mm、ブレグマに対して背腹方向に3mmで、Hamiltonシリソルを使用して上述の用量のISIS 571883を注射した。切開部を縫合により閉じた。マウスを14日間回復させ、その後、動物をInstitutional Animal Care and Use Committeeによって承認された人道的なプロトコルに従って安樂死させた。脳および脊髄の組織を採取し、液体窒素で瞬間凍結させた。凍結の前に、マウス用ブレインマトリックスを使用して脳組織を横方向に5つの切片に切断した。

【0272】

RNA分析

RNAを、C9ORF72 mRNA発現の分析のために、注射部位の後方の2~3mmの脳切片から、脳前頭皮質から、および脊髄組織の腰部切片から抽出した。C9ORF72 mRNA発現を、RT-PCRによって測定した。データを表17に提示する。結果は、漸増用量のISIS 571883での処理が、C9ORF72 mRNA発現の用量依存性阻害をもたらしたことを示す。

【0273】

CNS毒性の尺度として小膠細胞マーカーであるAIF-1の誘導もまた評価した。データを表18に提示する。結果は、漸増用量のISIS 571883での処理が、AIF-1 mRNA発現の有意な増加をもたらさなかったことを示す。したがって、ISIS 571883の注射を、このモデルにおいて耐容可能であると見なした。

【表17】

PBS対照と比較したC9ORF72 mRNA発現の阻害パーセンテージ

用量(μg)	脳後方	脳皮質	脊髄
50	22	8	46
100	22	12	47
300	55	47	67
500	61	56	78
700	65	65	79

10

【表18】

PBS対照と比較したAIF-1 mRNA発現の発現パーセンテージ

用量(μg)	脳後方	脊髄
50	102	89
100	105	111
300	107	98
500	131	124
700	122	116

20

【0274】

マウス実験2

それぞれ4匹ずつのC57BL/6マウスの群に、上述のものに類似の手順で脳室内ボーラス注射によって投与される500μgのISIS 571883を注射した。4匹のC57BL/6マウスの対照群を、同様にPBSで処理した。ICV投与後に通常の時点でマウスを試験した。

【0275】

拳動分析

30

運動拳動を評価するための2つの標準的なアッセイを用いた；ロータロッドアッセイおよび握力アッセイ。ロータロッドアッセイの場合、落下するまでの時間を測定した。アッセイのデータを、表19および20に提示する。結果は、ISIS 571883またはICV注射に起因するアンチセンス阻害の結果として、マウスの運動拳動に有意な変化がなかったことを示す。したがって、C9ORF72のアンチセンス阻害は、このモデルにおいて耐容可能であると見なした。

【表19】

ロータロッドアッセイにおける落下までの時間(秒)

注射後の週数	PBS	ISIS 571883
0	66	66
4	91	70
8	94	84

40

【表 2 0】

握力アッセイにおける平均後肢握力 (g)

注射後の週数	PBS	ISIS
		571883
0	57	63
1	65	51
2	51	52
3	51	51
4	59	72
5	60	64
6	61	72
7	67	68
8	66	70
9	63	61
10	48	46

10

20

【0 2 7 6】

ラット実験

それぞれ 4 匹ずつのスプラーグ・ドーリーラットに、髄腔内ボーラス注射によって投与される 700 µg、1,000 µg、または 3,000 µg の ISIS 603538 を注射した。4 匹のスプラーグ・ドーリーラットの対照群を、PBS で同様に処理した。動物に、3% イソフルオランで麻酔を行い、定位フレームに入れた。手術部位を滅菌した後、各ラットに、50 µL のフラッシュととともに、脊柱内 2 cm に 8 cm の髄腔内カテーテルを介して投与される 30 µL の ASO 溶液を注射した。ラットを 4 週間回復させ、その後、動物を、Institutional Animal Care and Use Committee によって承認された人道的なプロトコルに従って安樂死させた。

30

【0 2 7 7】

RNA 分析

RNA を、C9ORF72 mRNA 発現の分析のために、注射部位の後方の 2~3 mm の脳切片から、脳前頭皮質から、ならびに脊髄組織の頸部および腰部切片から抽出した。C9ORF72 mRNA 発現を、RT-PCR によって測定した。データを表 21 に提示する。結果は、漸増用量の ISIS 603538 での処理が、C9ORF72 mRNA 発現の用量依存性阻害をもたらしたことを示す。

【0 2 7 8】

CNS 毒性の尺度として小膠細胞マーカーである AIF-1 の誘導もまた評価した。データを表 22 に提示する。結果は、漸増用量の ISIS 603538 での処理が、AIF-1 mRNA 発現の有意な増加をもたらさなかったことを示す。したがって、ISIS 603538 の注射は、このモデルにおいて耐容可能であると見なした。

40

【表21】

PBS対照と比較したC9ORF72 mRNA発現の阻害パーセンテージ

用量 (μ g)	脳(1mm 切片)	脳皮質	脊髄(腰部)	脊髄(頸部)
700	21	4	86	74
1000	53	49	88	82
3000	64	62	88	80

【表22】

10

PBS対照と比較したAIF-1 mRNA発現の発現パーセンテージ

用量 (μ g)	脳(1mm 切片)	脳皮質	脊髄(腰部)	脊髄(頸部)
700	97	119	98	89
1000	105	113	122	96
3000	109	141	156	115

【0279】

20

体重分析

ラットの体重を、通常の時間間隔で測定した。データを表23に提示する。結果は、漸増用量のISIS 603538での処理が、ラットの体重に有意な変化を全く有さなかったことを示す。

【表23】

ラットの体重(初期体重に対する%)

	用量(μ g)	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目
PBS		100	94	103	105	109
ISIS 603538	700	100	94	98	103	107
	1000	100	95	97	101	103
	3000	100	92	98	102	105

【0280】

実施例6：2つの患者線維芽細胞系におけるヒトC9ORF72発現の選択的阻害

ヒト患者由来の2つの異なる線維芽細胞の細胞系(F09-152およびF09-229)を、エクソン1Bの前のC9ORF72プレ-mRNA配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、ヘキサヌクレオチド反復伸長含有転写産物を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびエクソン1の下流を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて分析した。各オリゴヌクレオチドについて配列番号1および2に対する標的の開始および終止部位、ならびに標的領域を、表24に提示する。ISIS 577061およびISIS 577065は、エクソン1Bの上流かつヘキサヌクレオチド反復のすぐ上流のC9ORF72を標的とする。表24の残りのISISオリゴヌクレオチドは、エクソン1Bおよびヘキサヌクレオチド反復の下流のC9ORF72を標的とする。

30

40

【表 24】

C9ORF72患者線維芽細胞における用量応答アッセイに使用されるISISオリゴヌクレオチドの標的開始および終止部位

ISIS 番号	配列番号 1 での標的 開始部位	配列番号 2 での標的 開始部位	標的領域
577061	n/a	1406	エクソン 1B の上流
577065	n/a	1446	エクソン 1B の上流
577083	n/a	3452	エクソン 1B の下流
576816	232	7990	エクソン 2
576974	3132	28251	エクソン 11

10

【0281】

1 ウェル当たり 20,000 細胞の密度で細胞を播種し、エレクトロポレーションを使用して、246.9 nM、740.7 nM、2,222.2 nM、6,666.7 nM、および 20,000.0 nM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクトした。おおよそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、C9ORF72 mRNA レベルを、定量的リアルタイム PCR によって測定した。2 つのプライマープローブセットを使用した：(1) 全 mRNA レベルを測定するヒト C9ORF72 プライマープローブセット RTS3750、および (2) ヘキサヌクレオチド反復伸長含有転写産物を標的とし、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物のみを測定する、RTS3905。C9ORF72 mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) によって測定される全 RNA 含量に応じて調整した。結果を、未処理の対照細胞に対する C9ORF72 の阻害パーセントとして提示する。

20

【0282】

以下の表 25 に示されるように、エクソン 1B の上流を標的とし、したがってヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物を標的とする 2 つのオリゴヌクレオチド (ISIS 577061 および ISIS 577065) は、C9ORF72 の全 mRNA レベル (RTS3750 によって測定される) を阻害せず、エクソン 1B の下流を標的とし、したがってヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物を標的としない ISIS 576974、576816、および 577083 も同様である。ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する C9ORF72 mRNA 転写産物の発現レベルは、低く (全 C9ORF72 発現産物の約 10%)、したがって、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物を標的とするオリゴヌクレオチドは、以下の表 25 によって示唆されるように、全 C9ORF72 mRNA (RTS3905 によって測定される) を強力に阻害することはない。したがって、ISIS 577061 および ISIS 577065 は、ヘキサヌクレオチド反復伸長を含有する mRNA 転写産物の発現を選択的に阻害する。

30

40

【表25】

RTS3750を用いて測定される、用量応答アッセイにおけるF09-152患者線維

芽細胞におけるC9ORF72全mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM
577061	6	11	0	18	10
577065	10	11	30	29	0
576974	61	69	72	83	83
576816	35	76	82	91	93
577083	28	38	52	75	80

10

【表26】

RTS3905を用いて測定される、用量応答アッセイにおけるF09-152患者線維

芽細胞におけるヘキサヌクレオチド反復伸長を含有するC9ORF72 mRNA転写産物の阻害パーセント

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM
577061	4	28	58	81	87
577065	25	54	70	90	94
576974	57	77	81	93	92
576816	37	77	91	97	98
577083	37	53	74	93	94

20

【表27】

RTS3750を用いて測定される、用量応答アッセイにおけるF09-229患者線維

芽細胞におけるC9ORF72全mRNAの阻害パーセント

30

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM
577061	0	0	0	17	7
577065	8	17	17	16	3
576974	43	58	85	85	74
576816	45	70	85	81	89
577083	22	45	56	76	78

40

【表28】

RTS3905を用いて測定される、用量応答アッセイにおけるF09-229患者線維芽細胞におけるヘキサヌクレオチド反復伸長を含有するC9ORF72 mRNA転写産物の阻害パーセント

ISIS番号	246.9nM	740.7nM	2222.2nM	6666.7nM	20000.0nM
577061	14	36	70	87	89
577065	26	48	92	91	98
576974	63	87	91	92	91
576816	62	81	96	98	100
577083	36	64	82	98	96

【配列表】

0006570447000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/7115 (2006.01)	A 6 1 K	31/7115
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712
A 6 1 K	31/7125 (2006.01)	A 6 1 K	31/7125

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(72)発明者 ベネット, フランク・シー

アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル コート 2855

(72)発明者 フレアー, スザン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル コート 2855

(72)発明者 スウェイジ, エリック・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル コート 2855

(72)発明者 リゴ, フランク

アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル コート 2855

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第2012/135736 (WO, A1)

特表2010-512747 (JP, A)

特表2008-501335 (JP, A)

特表2007-534325 (JP, A)

国際公開第2012/012443 (WO, A1)

特表2010-530239 (JP, A)

国際公開第2011/135396 (WO, A1)

Brain, 2012 Feb 1, Vol.135, p.723-735

Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.NT_008413, 24-JUL-2012, [検索日:2017

.09.01], U R L, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224514694?sat=17&satkey=18007966>

Neuron, 2011, Vol.72, p.257-268

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00

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

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

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