

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7169995号**  
**(P7169995)**

(45)発行日 令和4年11月11日(2022.11.11)

(24)登録日 令和4年11月2日(2022.11.2)

## (51)国際特許分類

C 1 2 N	15/113 (2010.01)	F I	C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z
A 6 1 K	31/7115(2006.01)		A 6 1 K	31/7115	Z N A
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	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	

請求項の数 21 (全76頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-566236(P2019-566236)
(86)(22)出願日	平成30年5月30日(2018.5.30)
(65)公表番号	特表2020-521491(P2020-521491)
	A)
(43)公表日	令和2年7月27日(2020.7.27)
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/064221
(87)国際公開番号	WO2018/220034
(87)国際公開日	平成30年12月6日(2018.12.6)
審査請求日	令和3年5月27日(2021.5.27)
(31)優先権主張番号	17173964.2
(32)優先日	平成29年6月1日(2017.6.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号	17209407.0
(32)優先日	平成29年12月21日(2017.12.21)
	最終頁に続く

(73)特許権者	591003013 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT F T スイス・シーエイチ-4070バーゼル ・グレンツアーヘルストラツセ124
(74)代理人	110001508弁理士法人 津国
(72)発明者	サンチェス、ルーベン・アルバレス スイス国、4070バーゼル、グレン ツアッハーシュトラーセ124、ツェ ー/オー・エフ・ホフマン・ラ・ロシュ ・アーゲー
(72)発明者	イアコーネ、ロベルト スイス国、4070バーゼル、グレン 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H T R A 1 発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下より選択される群:

## 【化1】

TTtatctacgcaTTG (配列番号67),  
 CTTCtttatctacgcAT (配列番号73), 及び  
 TACTtaatagcTCAA (配列番号86);

(ここで、大文字はDNAヌクレオチドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、シトシン残基は場合により5-メチルシトシンである)

より選択される、連続ヌクレオチド領域を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項2】

DNAヌクレオシドがベータ-D-オキシDNAヌクレオシドである、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項3】

連続ヌクレオチド領域のヌクレオチド間のヌクレオシド間連結が全てホスホロチオエートヌクレオチド間連結である、請求項1又は2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 4】

$T_s T_s^m C_s t_s a_s t_s c_s t_s a_s^m c_s g_s c_s a_s T_s T_s G$  (配列番号 67, 1)

(ここで、大文字はベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 $mC$ は5メチルシトシンベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、 $mc$ は5メチルシトシンDNAヌクレオシドを表す)又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 5】

$mC_s T_s T_s^m C_s t_s t_s c_s t_s a_s t_s c_s t_s a_s^m c_s g_s c_s A_s T$  (配列番号 10  
73, 1)

(ここで、大文字はベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 $mC$ は5メチルシトシンベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、 $mc$ は5メチルシトシンDNAヌクレオシドを表す)又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

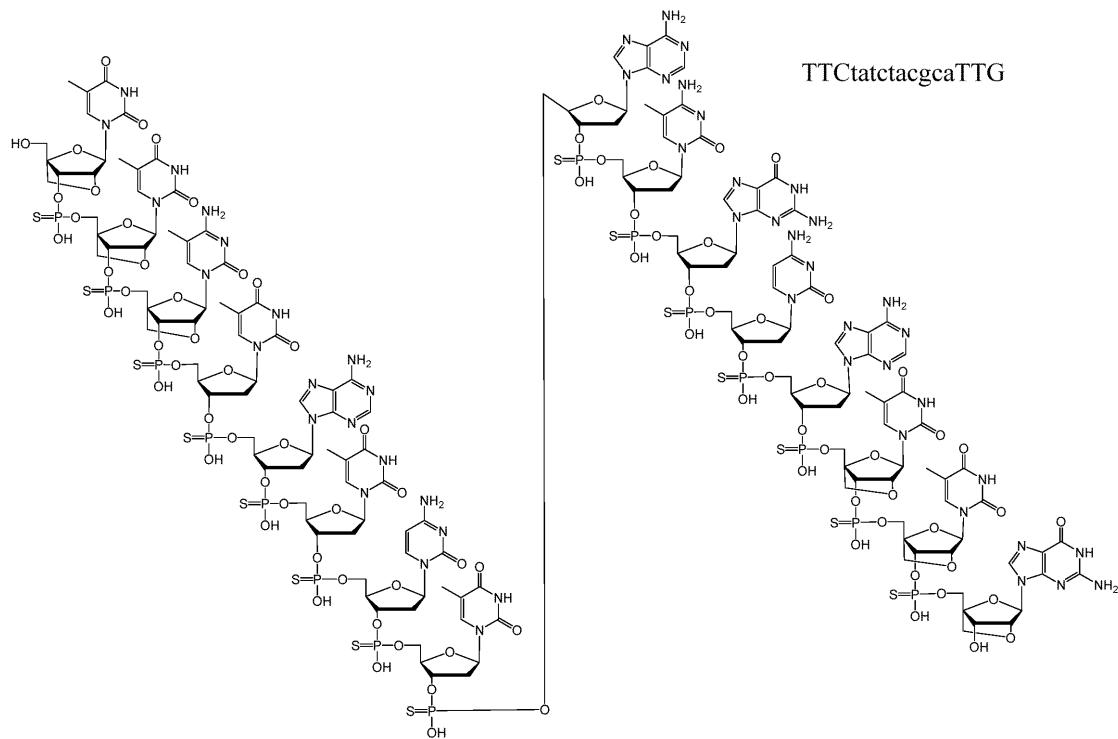
## 【請求項 6】

$T_s A_s^m C_s T_s t_s t_s a_s a_s t_s a_s g_s c_s T_s^m C_s A_s A$  (配列番号 86, 1)

(ここで、大文字はベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドであり、下付き文字sはホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 $mC$ は5メチルシトシンベータ-D-オキシDNAヌクレオシドを表し、 $mc$ は5メチルシトシンDNAヌクレオシドを表す)又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 7】

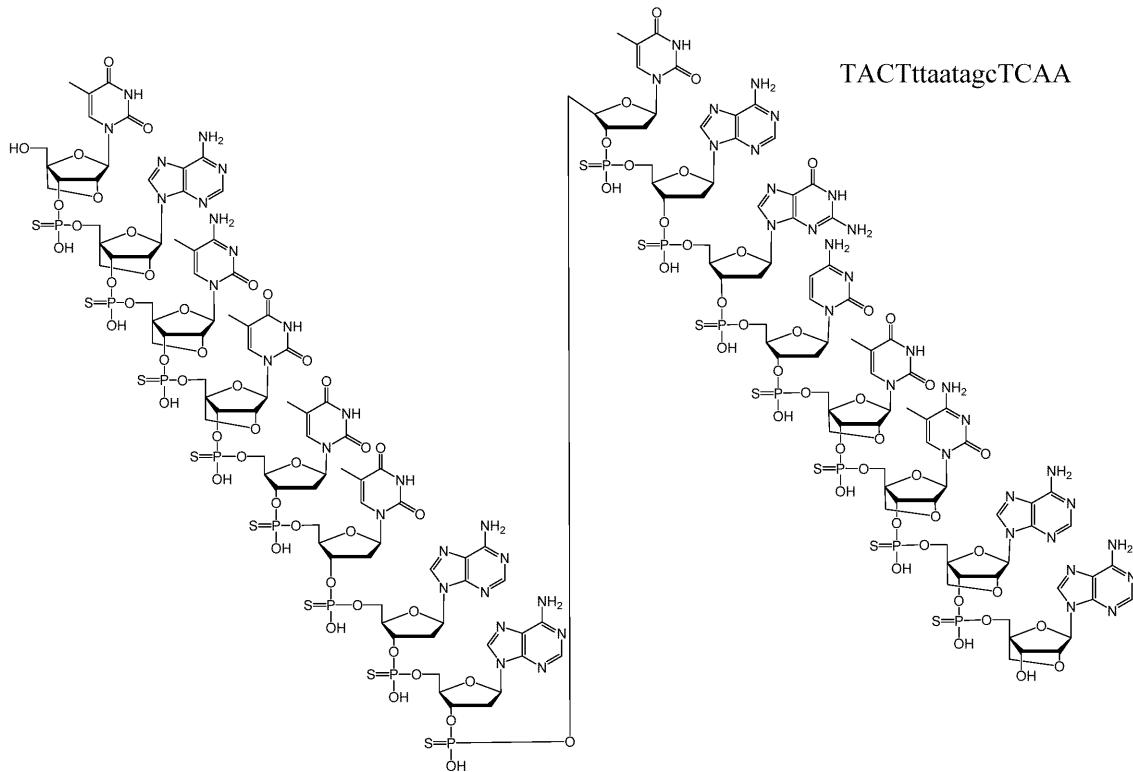
## 【化2】



又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 8】

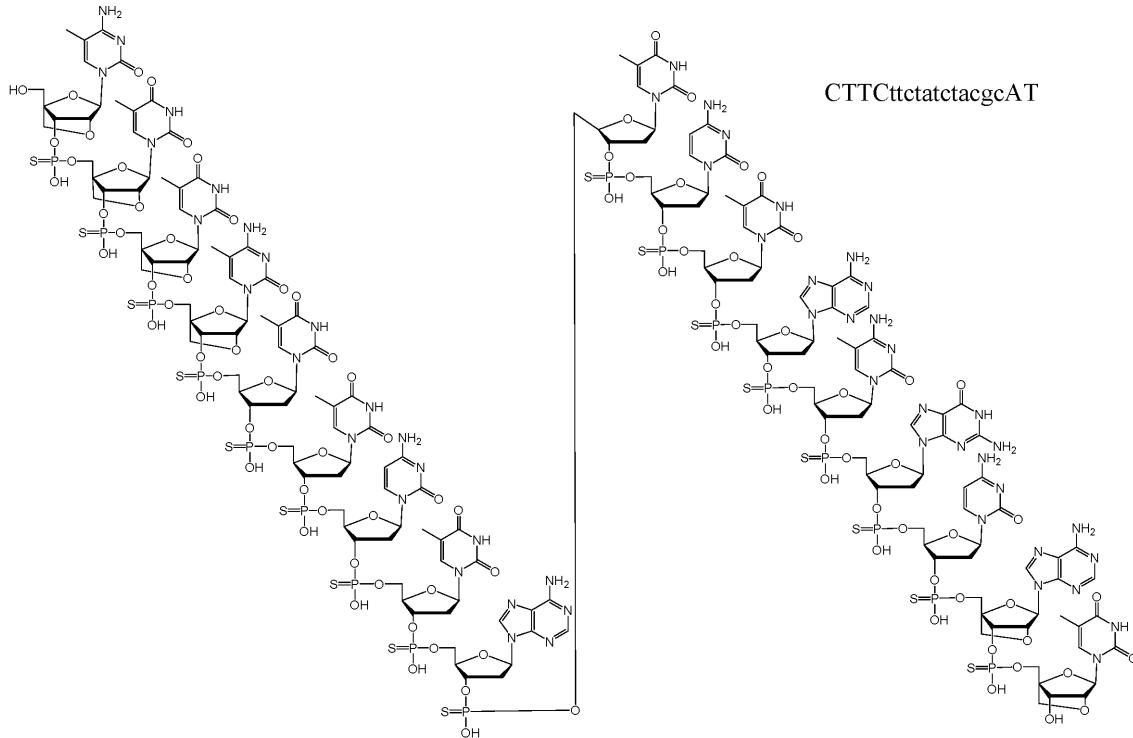
## 【化 3】



又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 9】

## 【化 4】



又はその医薬的に許容可能な塩である、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 10】

前記医薬的に許容可能な塩が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドのナトリウム塩である、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩。

**【請求項 1 1】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド又はその医薬的に許容可能な塩、及び該オリゴヌクレオチドに共有結合的に付着した少なくとも 1 つのコンジュゲート部分を含む、コンジュゲート。

**【請求項 1 2】**

請求項 1 ~ 1 0 に記載のオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、又は請求項 1 1 に記載のコンジュゲート、及び医薬的に許容可能な希釈剤、溶媒、担体、塩及び／又はアジュバントを含む、医薬的組成物。

10

**【請求項 1 3】**

医薬的に許容可能な希釈剤を含む、請求項 1 2 に記載の医薬的組成物。

**【請求項 1 4】**

前記医薬的に許容可能な希釈剤が、リン酸緩衝生理食塩水である、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

**【請求項 1 5】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、請求項 1 1 記載のコンジュゲート、又は請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物を有効量で細胞に投与することを含む、H T R A 1 を発現している標的細胞において H T R A 1 発現を調節するためのインビトロの方法。

20

**【請求項 1 6】**

黄斑変性症の処置又は予防のための医薬の製造のための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、又は請求項 1 1 に記載のコンジュゲートの使用。

**【請求項 1 7】**

前記黄斑変性症が、乾燥型 A M D 、地図状萎縮又は中間 d A M D である、請求項 1 6 に記載の使用。

**【請求項 1 8】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、又は請求項 1 1 記載のコンジュゲートの治療的又は予防的有効量を含む、黄斑変性症に罹患している又は感受性である被験者における、黄斑変性症の処置又は予防のための医薬組成物。

30

**【請求項 1 9】**

前記黄斑変性症が、乾燥型 A M D 、地図状萎縮又は中間 d A M D である、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 0】**

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、又は請求項 1 1 記載のコンジュゲートを含む、H T R A 1 を発現している標的細胞において H T R A 1 発現を調節するための医薬組成物。

40

**【請求項 2 1】**

H T R A 1 を発現している標的細胞において H T R A 1 発現を調節するための医薬の製造のための、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはその医薬的に許容可能な塩、又は請求項 1 1 記載のコンジュゲートの使用。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

**発明の分野**

本発明は、H T R A 1 の発現の調節に導く、H T R A 1 に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチド（オリゴマー）に関する。H T R A 1 発現の調節は、広範な医学的障害、例えは黄斑変性症など（例、加齢性黄斑変性症）のために有益である。

50

## 【 0 0 0 2 】

## 背景

セリンプロテアーゼのヒト高温要求A ( H T R A ) ファミリーは、プロテアーゼ及びシヤペロンの二重機能を組み合わせることにより、細胞外コンパートメントにおけるタンパク質恒常性の維持に含まれる遍在的に発現する P D Z プロテアーゼである。 H T R A プロテアーゼは、細胞外マトリックスの組織化、細胞増殖、及び老化に関係している。 H T R A 活性の調節は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー ( Bakay et al. 2002, Neuromuscul. Disord. 12: 125-141 ) 、関節炎、例えば変形性関節症など ( Grau et al. 2006, JBC 281: 6124-6129 ) 、癌、家族性虚血性脳小血管疾患、及び加齢黄斑変性症、ならびにパーキンソン病及びアルツハイマー病を含む重度疾患に関連する。ヒト H T R A 1 はインスリン様成長因子 ( I G F ) 結合ドメインを含む。それは、 I G F の可用性及び細胞成長を調節し ( Zumbrunn and Trueb, 1996, FEES Letters 398:189-192 ) 、腫瘍抑制特性を示すことが提唱されている。 H T R A 1 発現は転移性メラノーマにおいて下方調節されており、このように、メラノーマの進行の程度を示しうる。転移性メラノーマ細胞株における H T R A 1 の過剰発現によって、インビトロでの増殖及び浸潤が低下し、異種移植マウスモデルにおいて腫瘍成長が低下した ( Baldi et al., 2002, Oncogene 21:6684-6688 ) 。 H T R A 1 発現はまた、卵巣癌において下方調節される。卵巣癌細胞株では、 H T R A 1 過剰発現によって細胞死が誘導され、アンチセンス H T R A 1 発現によって足場非依存性成長が促進された ( Chien et al., 2004, Oncogene 23:1636-1644 ) 。

## 【 0 0 0 3 】

I T R A 経路に対するその効果に加えて、 H T R A 1 はまた、成長因子の T G F ファミリーによるシグナル伝達を阻害する ( Oka et al., 2004, Development 131:1041-1053 ) 。 H T R A 1 はアミロイド前駆体タンパク質 ( A P P ) を切断することができ、 H T R A 1 阻害剤は培養細胞において A ペプチドの蓄積を起こす。このように、 H T R A 1 はまた、アルツハイマー病に関係している ( Grau et al., 2005, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102:6021-6026 ) 。

## 【 0 0 0 4 】

さらに、 H T R A 1 の上方調節が観察されており、デュシェンヌ型筋ジストロフィー ( Bakay et al. 2002, Neuromuscul. Disord. 12: 125-141 ) ならびに変形性関節症 ( Grau et al. 2006, JBC 281: 6124-6129 ) 及び A M D ( Fritzsche, et al. Nat Gen 20 13 45(4):433-9 ) に関連付けられると思われる。

## 【 0 0 0 5 】

H T R A 1 プロモーター領域 ( r s 1 1 2 0 0 6 3 8 ) 中の一塩基多型 ( S N P ) は、加齢黄斑変性症 ( A M D ) を発症するリスクの 10 倍増加に関連付けられる。さらに、 H T R A 1 S N P は A R M S 2 S N P ( r s 1 0 4 9 0 9 2 4 ) と連鎖不均衡にあり、加齢黄斑変性症 ( A M D ) の発症リスク増加に関連付けられる。リスク対立遺伝子は、 H T R A 1 m R N A 及びタンパク質発現の 2 ~ 3 倍増加に関連付けられ、 H T R A 1 は A M D を伴う患者のドルーゼン中に存在する ( Dewan et al., 2006, Science 314:989-992; Yang et al., 2006, Science 314:992-993 ) 。 H t r A 1 の過剰発現によって、マウスにおいて A M D 様表現型が誘導される。 h H T R A トランスジェニックマウス ( Veierkottn, PlosOne 2011 ) では、ブルッフ膜の弾性板の分解が明らかになり、脈絡膜血管異常が決定され ( Jones, PNAS 2011 ) 、ポリープ状脈絡膜血管症 ( P C V ) 病変が増加する ( Kumar, IOVS 2014 ) 。加えて、 h H T R A 1 T g マウスにおけるブルッフ膜損傷が報告されており、そこではタバコ煙への曝露時での C N V の 3 倍増加が決定されている ( Nakayama, IOVS 2014 ) 。

## 【 0 0 0 6 】

加齢黄斑変性症 ( A M D ) は、年齢 65 歳を上回る人々における不可逆的な視力喪失の主な原因である。 A M D の発症とともに、眼の裏側における光感受性の光受容体細胞、それらを代謝的に支持する基礎をなす色素上皮細胞、及びそれらが提供する鋭い中心視力が徐々に失われる。年齢は、 A M D の発症の主要なリスク因子である： A M D を発症する可

10

20

30

40

50

能性は 55 歳以降に 3 倍になる。喫煙、薄い虹彩色、性別（女性の方が高リスク）、肥満、及び UV 照射への反復曝露も AMD のリスクを増加させる。AMD 進行は 3 段階において定義することができる：1) 早期、2) 中期、及び 3) 進行性 AMD。2 つの形態の進行性 AMD がある：乾燥型 AMD（地図状萎縮、GA とも呼ばれる）及び湿潤型 AMD（滲出型 AMD としても公知）。乾燥型 AMD は、光受容体及び網膜色素上皮細胞の喪失により特徴付けられ、視力喪失に導く。湿潤型 AMD は、病的脈絡膜（網膜下としても言及する）血管新生に関連付けられる。このプロセスにおいて形成される異常な血管からの漏出によって、黄斑が損傷され、視力が損なわれ、最終的には失明に導かれる。一部の場合では、患者は両方の型の進行性 AMD に関連付けられる病態を提示することがある。湿潤型 AMD のための処置戦略では、眼中への頻繁な注射が要求され、主に疾患進行を遅延させることに焦点を合わせている。現在、乾燥型 AMD のための処置は利用可能ではない。従って、黄斑変性症状態（例えば湿潤型及び乾燥型 AMD など）を処置するための効果的な薬物の提供において、満たされていない医学的ニーズがある。WO 2008 / 013893 には、HTRA1 遺伝子又は mRNA にハイブリダイズするアンチセンス配列を含む核酸分子を含む加齢黄斑変性症に罹患した被験者を処置するための組成物が請求されている：アンチセンス分子は開示されていない。

#### 【0007】

WO 2009 / 006460 には、HTRA1 を標的とする siRNA 及び AMD を処置する際でのそれらの使用が提供されている。

#### 【0008】

##### 発明の目的

本発明は、インビボ又はインビトロで HTA1 を調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明では、効果的な HTA1 阻害を与えるためにアンチセンスオリゴヌクレオチドにより標的化されうるヒト HTA1 mRNA（プレ mRNA を含む）中に存在する潜在性の標的配列モチーフが同定された。本発明はまた、HTA1 を阻害することが可能である効果的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列及び化合物、ならびに HTA1 が適応される疾患又は障害の処置におけるそれらの使用を提供する。

#### 【0009】

##### 発明の概要

本発明は、哺乳動物 HTA1 核酸を標的とする（即ち、HTA1 の発現を阻害すること可能である）、HTA1 の機能に関連する疾患を処置又は防止するためのオリゴヌクレオチドに関する。HTA1 を標的とするオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、即ち、それらの HTA1 核酸標的に相補的である。

#### 【0010】

本発明のオリゴヌクレオチドは、医薬的に許容可能な塩の形態（例えばナトリウム塩又はカリウム塩など）でありうる。

#### 【0011】

したがって、本発明は、少なくとも 90 % の相補性を伴う（例えば哺乳動物 HTA1 核酸に完全に相補的など）長さ 10 ~ 30 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列（例えば配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、又は配列番号 4 など）を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【0012】

さらなる態様では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドならびに医薬的に許容可能な希釈剤、担体、塩及び／又はアジュバントを含む医薬的組成物を提供する。

#### 【0013】

本発明は、少なくとも 90 % の相補性を伴う（例えば HTA1 核酸に完全に相補的など）長さ 10 ~ 30 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列（例えば配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、又は配列番号 4 からなる群より選択される配列など）を含む LNA アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば LNA ギャップマーオリゴヌクレオチドなど）を提供する。

**【 0 0 1 4 】**

本発明は、10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて、連続ヌクレオチド領域は、配列番号113に少なくとも90%（例えば100%など）相補的である。

**【 0 0 1 5 】**

本発明は、長さが10～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号113に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む：

**【化1】**

10

5'

```
GACAGTCAGCATTGTCTCCTCCTTAAC TGAGTCATCATCTTAGTCCAAC TAATGCAGTCG  
ATACAATGCGTAGATAGAAGAACGCCCACGGGAGCCAGGATGGGACTGGCGTTGTG  
CTTTCTCCAAGTCAGCACCCAAAGGTCAATGCACAGAGACCCGGGTGGGTGAGCGCTG  
GCTTCTCAAACGGCCGAAGTTGCCTCTTTAGGAATCTCTTGAATTGGGAGCACGATGA  
CTCTGAGTTGAGCTATTAAAGTACTTCTTAC 3'.
```

**【 0 0 1 6 】**

20

配列番号113の逆相補体は配列番号119である：

**【化2】**

```
GTAAGAAGTACTTAATAGCTCAAAC TGAGTCATCGTGCTCCAAATTCCAAGAGATTCC  
TAAAAGAGGCAACTCGGCCGTTGAGAACGCCAGCGCTCACCCACCCGGGTCTCTGTG  
ATTGACCTTGGGTGCTGACTGGAGAAAGCACAAACACGACCAGTCCCACCTGGCTCC  
CGTGGGGCTTCTATCTACGCATTGTATCGACTGCATTAGTTGGACTAAGATGATGACT  
CAGTTAAAGGAGGAGACAAATGCTGACTGTC.
```

**【 0 0 1 7 】**

30

本発明は、10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド領域は配列番号114に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である。

**【 0 0 1 8 】**

本発明は、長さ10～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号114に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む：

**【化3】**

5'

```
GACAGTCAGCATTGTCTCCTCCTTAAC TGAGTCATCATCTTAGTCCAAC TAATGCAGTCG  
ATACAATGCGTAGATAGAAGAACGCCCACGGGAGCCAGGATGGGACTGGCGTTGTG  
CTTTCTCCAAGTCAGCACCCAAAGGTCAATGCACAGAGACCCGGGTGGGTGAGCGCTG  
GCTTCTCAAACGGCCGAAGTTGCCTCTTTAGGAATCTCTTGAATTGGGAGCACGATGA  
CTCTGAGTTGAGCTATTAAAGTACTTACACATTGC 3'.
```

**【 0 0 1 9 】**

40

配列番号114の逆相補体は配列番号120である：

50

## 【化4】

GCAATGTGTAAGAAGTACTTTAATAGCTCAAACCTCAGAGTCATCGTGCTCCATTCCAAAG  
 AGATTCCCTAAAGAGGGCAACTCGGCCGTTGAGAAGGCCAGCGCTACCCACCCGGGGTC  
 TCTGTGCATTGACCTTGAGGAGAAAAGCACAAACACGACCAGTCCCATCC  
 TGGCTCCCGTGGGCTTCTTCTACGCATTGTATCGACTGCATTAGTTGGACTAAGAT  
 GATGACTCAGTTAAGGAGGAGACAAATGCTGACTGTC.

## 【0020】

本発明は、10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド領域は、配列番号115に少なくとも90%（例えば100%など）である。 10

## 【0021】

本発明は、長さ10～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号115に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む：

## 【化5】

5'

GACAGTCAGCATTGTCTCCTCCTTAAC TGAGTCATCATCTTAGTCCAACTAATGCAGTCG  
 ATACAATGCGTAGATAGAAGAACGCCCCACGGGAGCCAGGATGGGACTGGCGTGTGTTG  
 CTTTCTCCAAGTCAGCACCCAAAGGTCAATGCACAGAGACCCCCGGGTGGGTGAGCGCTG  
 GCTTCTCAAACGGCCGAAGTTGCCTCTTTAGGAATCTCTTGGATTGGAGCACGATGA  
 CTCTGAGTTTGAGCTATTAAAGT 3'.

20

## 【0022】

配列番号115の逆相補体は配列番号121である：

## 【化6】

ACTTTAATAGCTCAAACCTCAGAGTCATCGTGCTCCATTCCAAAGAGATTCCCTAAAGAGG  
 CAACTCGGCCGTTGAGAAGCCAGCGCTACCCACCCGGGTCTCTGTGCATTGACCTT  
 TGGGTGCTGACTTGGAGAAAAGCACAAACACGACCAGTCCCATCCTGGCTCCCGTGGGC  
 TTCTTCTATCTACGCATTGTATCGACTGCATTAGTTGGACTAAGATGATGACTCAGTTAAAG  
 GAGGAGACAAATGCTGACTGTC.

30

## 【0023】

本発明は、10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド領域は、配列番号116に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である。 40

## 【0024】

本発明は、長さ10～30ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号116に少なくとも90%（例えば100%など）相補性である10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む：

40

50

## 【化 7】

5'

CAACTAATGCAGTCGATAACAATGCGTAGATAGAAGAAGCCCCACGGGAGCCAGGATGGGA  
 CTGGTCGTGTTGTGCTTTCTCCAAGTCAGCACCCAAAGGTCAATGCACAGAGACCCCGG  
 GTGGGTGAGCGCTGGCTCTCAAACGGCCGAAGTTGCCTCTTTAGGAATCTCTTGGAAAT  
 TGGGAGCACGATGACTCTGAGTTGAGCTATTAAAGTACTTCTTACACATTGC 3'.

## 【0025】

配列番号 116 の逆相補体は配列番号 122 である :

10

## 【化 8】

GCAATGTGTAAGAAGTACTTTAATAGCTCAAACTCAGAGTCATCGTGCTCCCAATTCCAAAG  
 AGATTCCCTAAAAGAGGCAACTCGGCCGTTGAGAAGCCAGCGCTCACCCACCCGGGGTC  
 TCTGTGCATTGACCTTGGGTGCTGACTTGGAGAAAAGCACAAACACGACCAGTCCCATCC  
 TGGCTCCCGTGGGCTTCTATCTACGCATTGTATCGACTGCATTAGTTG.

## 【0026】

本発明は、10～30（例えば12～22など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド領域は、配列番号 117 に少なくとも 90%（例えば 100% など）相補性である。

20

## 【0027】

本発明は、長さ 10～30 ヌクレオチドのアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 117 に少なくとも 90%（例えば 100% など）相補性である 10～30（例えば 12～22 など）ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む：

## 【化 9】

5'

CAACTAATGCAGTCGATAACAATGCGTAGATAGAAGAAGCCCCACGGGAGCCAGGATGGGA  
 CTGGTCGTGTTGTGCTTTCTCCAAGTCAGCACCCAAAGGTCAATGCACAGAGACCCCGG  
 GTGGGTGAGCGCTGGCTCTCAAACGGCCGAAGTTGCCTCTTTAGGAATCTCTTGGAAAT  
 TGGGAGCACGATGACTCTGAGTTGAGCTATTAAAGTTACTTCTTAC 3'.

30

## 【0028】

配列番号 117 の逆相補体は配列番号 123 である :

## 【化 10】

GTAAGAAGTAACCTTAATAGCTCAAACTCAGAGTCATCGTGCTCCCAATTCCAAAGAGATTG  
 CTAAAAGAGGCAACTCGGCCGTTGAGAAGCCAGCGCTCACCCACCCGGGGTCTCTGTG  
 CATTGACCTTGGGTGCTGACTTGGAGAAAAGCACAAACACGACCAGTCCCATCCTGGCTC  
 CCGTGGGGCTTCTATCTACGCATTGTATCGACTGCATTAGTTG.

40

## 【0029】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列 5' g c a a t g t g t a a g a a g t 3'（配列番号 112）のものではない。一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列 5' g c a a t g t g t a a g a a g t 3' を含まない、又はそれからならない。一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列 5' g c a a t g t g t a a g a a g t 3' 中に存在する 10 又はそれ以上の連続ヌクレオチドを含まない、又はそれからならない。一部の実施形態では、本

50

発明のオリゴヌクレオチドは 5' G C A a t g t g t a a g a A G T 3' 以外であり、それにおいて大文字は L N A ヌクレオシドを表し(ベータ-D-オキシ L N A ヌクレオシドを使用した)、全ての L N A シトシンが 5'-メチルシトシンであり、小文字は D N A ヌクレオシドを表し、上付き文字 m が前に付く D N A シトシンは、5'-メチル C - D N A ヌクレオシドを表す。全てのヌクレオシド間連結がホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

#### 【 0 0 3 0 】

本発明は、配列番号 5 ~ 1 1 1 のいずれか 1 つにおいて存在する少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。10  
本発明は、配列番号 5 ~ 1 1 1 のいずれか 1 つにおいて存在する少なくとも 1 2 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。  
本発明は、配列番号 5 ~ 1 1 1 のいずれか 1 つにおいて存在する少なくとも 1 4 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。  
本発明は、配列番号 5 ~ 1 1 1 のいずれか 1 つにおいて存在する少なくとも 1 5 又は 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明はアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいてオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 5 ~ 1 1 1 のいずれか 1 つからなる群より選択される核酸塩基配列を含む、又はそれからなる。

#### 【 0 0 3 1 】

本発明は、配列番号 1 1 8 : 5' C T T C T T C T A T C T A C G C A T T G 3' に存在する少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は少なくとも 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。配列番号 1 1 8 の逆相補体は配列番号 2 3 1 : C A A T G C G T A G A T A G A A G A A G である。20

#### 【 0 0 3 2 】

本発明は、配列番号 2 3 1 に相補的な少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は少なくとも 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明は、配列番号 6 7 に存在する少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。30

#### 【 0 0 3 4 】

本発明は、配列番号 8 6 に存在する少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【 0 0 3 5 】

本発明は、配列番号 7 3 に存在する少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は 1 6 又は少なくとも 1 7 又は 1 8 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。40

#### 【 0 0 3 6 】

本発明は、配列番号 1 8 6 に相補的な少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明は、配列番号 2 0 5 に相補的な少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

#### 【 0 0 3 8 】

10

20

30

40

50

本発明は、配列番号 1 9 2 に相補的な少なくとも 1 0、又は少なくとも 1 2、又は少なくとも 1 3、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は少なくとも 1 6 又は少なくとも 1 7 又は 1 8 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、以下からなる群より選択されるオリゴヌクレオチドを含む又はそれからなるオリゴヌクレオチドを提供する：

【 化 1 1 】

$T_s T_s^m C_s t_s a_s t_s c_s t_s a_s^m C_s g_s c_s a_s T_s T_s G$  (配列番号 67,1),  
 ${}^m C_s T_s T_s^m C_s t_s a_s t_s c_s t_s a_s^m C_s g_s c_s A_s T$  (配列番号 73,1), 及び  
 $T_s A_s^m C_s T_s t_s a_s a_s t_s a_s g_s c_s T_s^m C_s A_s A$  (配列番号 86,1);

10

それにおいて大文字はベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 ${}^m C$  は 5 メチルシトシンベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、 ${}^m c$  は 5 メチルシトシン D N A ヌクレオシドを表す。

【 0 0 4 0 】

本発明は、式：

【 化 1 2 】

$T_s T_s^m C_s t_s a_s t_s c_s t_s a_s^m C_s g_s c_s a_s T_s T_s G$  (配列番号 67,1)

20

のオリゴヌクレオチドを提供し、

それにおいて大文字はベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 ${}^m C$  は 5 メチルシトシンベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、 ${}^m c$  は 5 メチルシトシン D N A ヌクレオシドを表す。

【 0 0 4 1 】

本発明は、式：

【 化 1 3 】

${}^m C_s T_s T_s^m C_s t_s t_s C_s t_s a_s t_s C_s t_s a_s^m C_s g_s c_s A_s T$  (配列番号 73,1)

30

のオリゴヌクレオチドを提供し、

それにおいて大文字はベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 ${}^m C$  は 5 メチルシトシンベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、 ${}^m c$  は 5 メチルシトシン D N A ヌクレオシドを表す。

【 0 0 4 2 】

本発明は、式：

【 化 1 4 】

$T_s A_s^m C_s T_s t_s a_s a_s t_s a_s g_s c_s T_s^m C_s A_s A$  (配列番号 86,1)

40

のオリゴヌクレオチドを提供し、

それにおいて大文字はベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドであり、下付き文字 s はホスホロチオエートヌクレオシド間連結を表し、 ${}^m C$  は 5 メチルシトシンベータ - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、 ${}^m c$  は 5 メチルシトシン D N A ヌクレオシドを表す。

【 0 0 4 3 】

本発明は、実施例において提供するオリゴヌクレオチドを提供する。

【 0 0 4 4 】

50

本発明は、本発明に従ったオリゴヌクレオチド、及び前記オリゴヌクレオチドに共有結合的に付着した少なくとも1つのコンジュゲート部分を含むコンジュゲートを提供する。

【0045】

本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートの医薬的に許容可能な塩を提供する。

【0046】

さらなる態様では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、又は組成物を効果的な量で前記細胞に投与することにより、HTRA1を発現している細胞中のHTRA1発現のインピボ又はインピトロ調節方法を提供する。

【0047】

さらなる態様では、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド、又はそのコンジュゲートの治療的又は予防的有効量を、疾患、障害、又は機能障害に罹患している又は罹患しやすい被験者に投与することを含む、HTRA1のインピボ活性に関連付けられる疾患、障害、又は機能障害を処置又は防止するための方法を提供する。

【0048】

さらなる態様では、本発明のオリゴヌクレオチド又は組成物を、黄斑変性症、及びHTRA1が関係している他の障害の処置又は防止のために使用する。

【0049】

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、関節炎（例えば変形性関節症など）、家族性虚血性脳小血管疾患、アルツハイマー（Alzheimer's）病、及びパーキンソン病を含むリストより選択される疾患又は障害の処置における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートを提供する。

20

【0050】

本発明は、黄斑変性症、例えば湿潤型又は乾燥型加齢黄斑変性症（例、wAMD、dAMD、地図状萎縮、早期AMD、中間AMD）、又は糖尿病性網膜症などの処置における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートを提供する。

【0051】

本発明は、黄斑変性症、例えば湿潤型又は乾燥型加齢黄斑変性症（例、wAMD、dAMD、地図状萎縮、中間dAMDなど）、又は糖尿病性網膜症の処置のための医薬の製造のための、本発明のオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、又は組成物の使用を提供する。

30

【0052】

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、関節炎（例えば変形性関節症など）、家族性虚血性脳小血管疾患、アルツハイマー（Alzheimer's）病、及びパーキンソン病からなる群より選択される疾患又は障害の処置のための医薬の製造のための、本発明のオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、又は組成物の使用を提供する。

【0053】

本発明は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、関節炎（例えば変形性関節症など）、家族性虚血性脳小血管疾患、アルツハイマー（Alzheimer's）病、及びパーキンソン病からなる群より選択される疾患又は障害に罹患している被験者の処置の方法を提供し、前記方法は、有効量の本発明のオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、又は組成物を被験者に投与する工程を含む。

40

【0054】

本発明は、眼疾患、例えば黄斑変性症など、例えば湿潤型又は乾燥型加齢黄斑変性症（例、wAMD、dAMD、地図状萎縮、中間dAMD）など、又は糖尿病性網膜症に罹患している被験者の処置の方法を提供し、前記方法は、有効量の本発明のオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、又は組成物を被験者に投与する工程を含む。

【0055】

本発明は、眼疾患、例えば黄斑変性症など、例えば湿潤型又は乾燥型加齢黄斑変性症（例、wAMD、dAMD、地図状萎縮、中間AMD）など、又は糖尿病性網膜症に罹患している被験者の処置の方法を提供し、前記方法は、本発明のオリゴヌクレオチド又はその

50

医薬的に許容可能な塩の少なくとも2つの投与量を、約10 μg～200 μgの投与量において眼内注射で投与することを含み、それにおいて連続投与間の投与間隔は少なくとも4週間（即ち、投与間隔は4週間）、又は少なくとも毎月（即ち、投与間隔は1ヶ月）である。

**【図面の簡単な説明】**

**【0056】**

【図1】図1 . n = 231 HTRA1 mRNAオリゴヌクレオチドのライブラリーをU251細胞株において5 μMでスクリーニングした。残留HTRA1 mRNA発現レベルをqPCRにより測定し、対照（PBS処理細胞）の%として示す。位置53113～53384の間にあるn = 10のオリゴは比較的活性であった。

【図2】図2 . n = 210 HTRA1 mRNAオリゴヌクレオチドのライブラリーをU251細胞株において5 μMでスクリーニングした。残留HTRA1 mRNA発現レベルをqPCRにより測定し、対照（PBS処理細胞）の%として示す。位置53113～53384の間にあるn = 33のオリゴは比較的活性であった。

【図3】図3 . n = 305 HTRA1 mRNAオリゴヌクレオチドのライブラリーをU251及びARPE19細胞株においてそれぞれ5及び25 μMでスクリーニングした。残留HTRA1 mRNA発現レベルをqPCRにより測定し、対照（PBS処理細胞）の%として示す。位置53113～53384の間にあるn = 95のオリゴは、残りと比較して比較的活性であった。

【図4】図4 . LNAオリゴヌクレオチドを用いたヒト初代RPE細胞の処理（10日間の処理）時のHTRA1 mRNAレベルの用量反応。組み換えたのは、Htra1標的配列に関連しない組換え配列を伴う対照オリゴである。

【図5A】図5 . NHP PK/PD試験、IVT投与、25 μg/眼。A) qPCRにより網膜において測定したHTRA1 mRNAレベル。B) オリゴELISAにより測定した網膜におけるオリゴ含量。C) ISHにより例証するHTRA1 mRNAレベル。D-E) IP-MSによる網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す（n = 3）。F-G) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルにおける低下。

【図5B】図5 . NHP PK/PD試験、IVT投与、25 μg/眼。A) qPCRにより網膜において測定したHTRA1 mRNAレベル。B) オリゴELISAにより測定した網膜におけるオリゴ含量。C) ISHにより例証するHTRA1 mRNAレベル。D-E) IP-MSによる網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す（n = 3）。F-G) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルにおける低下。

【図5C】図5 . NHP PK/PD試験、IVT投与、25 μg/眼。A) qPCRにより網膜において測定したHTRA1 mRNAレベル。B) オリゴELISAにより測定した網膜におけるオリゴ含量。C) ISHにより例証するHTRA1 mRNAレベル。D-E) IP-MSによる網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す（n = 3）。F-G) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルにおける低下。

【図5D】図5 . NHP PK/PD試験、IVT投与、25 μg/眼。A) qPCRにより網膜において測定したHTRA1 mRNAレベル。B) オリゴELISAにより測定した網膜におけるオリゴ含量。C) ISHにより例証するHTRA1 mRNAレベル。D-E) IP-MSによる網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す（n = 3）。F-G) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるHTRA1タンパク質レベルにおける低下。

10

20

30

40

50

【図5 E】図5 . N H P P K / P D 試験、I V T 投与、25 μg/眼。A) q P C R により網膜において測定したH T R A 1 m R N A レベル。B) オリゴE L I S A により測定した網膜におけるオリゴ含量。C) I S H により例証するH T R A 1 m R N A レベル。D - E ) I P - M S による網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す( n = 3 )。F - G ) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルにおける低下。

【図5 F】図5 . N H P P K / P D 試験、I V T 投与、25 μg/眼。A) q P C R により網膜において測定したH T R A 1 m R N A レベル。B) オリゴE L I S A により測定した網膜におけるオリゴ含量。C) I S H により例証するH T R A 1 m R N A レベル。D - E ) I P - M S による網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す( n = 3 )。F - G ) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルにおける低下。

【図5 G】図5 . N H P P K / P D 試験、I V T 投与、25 μg/眼。A) q P C R により網膜において測定したH T R A 1 m R N A レベル。B) オリゴE L I S A により測定した網膜におけるオリゴ含量。C) I S H により例証するH T R A 1 m R N A レベル。D - E ) I P - M S による網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルの定量。ドットは、個々の動物についてのデータを示す。エラーバーは、技術的な複製物についての標準誤差を示す( n = 3 )。F - G ) ウェスタンプロットにより例証する網膜及び硝子体のそれぞれにおけるH T R A 1 タンパク質レベルにおける低下。

【図6】図6 . 本発明の化合物(化合物番号6 7、1)。化合物は、医薬的塩(例えばナトリウム塩又はカリウム塩など)の形態でありうる。

【図7】図7 . 本発明の化合物(化合物番号8 6、1)。化合物は、医薬的塩(例えばナトリウム塩又はカリウム塩など)の形態でありうる。

【図8】図8 . 本発明の化合物(化合物番号7 3、1)。化合物は、医薬的塩(例えばナトリウム塩又はカリウム塩など)の形態でありうる。

【図9】図9 . 化合物6 7、1の医薬的塩の例: M + は適切な陽イオン、典型的には正の金属イオン(例えばナトリウムイオン又はカリウムイオンなど)である。陽イオンとオリゴヌクレオチド陰イオンの化学量論比は、使用する陽イオンの電荷に依存する。適切には、1、2、又は3つの正電荷を伴う陽イオン( M + 、 M + + 、又は M + + + を使用してもよい)。例証的な目的のために、二価陽イオン(例えばCa 2 + など)と比較し、2倍多い单一+電荷陽イオン(一価)(例えばNa + 又はK + など)が必要とされる。

【図10】図10 . 化合物8 6、1の医薬的塩の例: 陽イオンM + の記載については、図9についての図の説明を参照のこと。

【図11】図11 . 化合物7 3、1の医薬的塩の例: 陽イオンM + の記載については、図9についての図の説明を参照のこと。

【図12 A】図12 A . 化合物#15、3、及び#17をカニクイザルに硝子体内投与し、房水サンプルを注射後3、8、15、及び22日目に採取した。未希釈サンプルからのタンパク質は、Peggy Sue装置(Protein Simple)を使用したキャピラリー電気泳動により分析した。H T R A 1は、カスタムメイドのポリコロナールウサギ抗血清を使用して検出した。動物#J 6 0 1 5 4(溶媒)、J 6 0 1 5 8(C. I d #15, 3)、J 6 0 1 6 2(C. I d #17)からのデータを提示する。

【図12 B】図12 B . シグナル強度を、精製した組換え(S 3 2 8 A変異体)H T R A 1タンパク質(Origene、#T P 7 0 0 2 0 8)との比較により定量化した。検量線をここに示す。

【図12 C - 1】図12 C . 上パネル: 個々の動物から算出したH T R A 1房水濃度を、注射後の時間に対してプロットした。下パネル: 各々の時間点での溶媒群についての平均H T R A 1濃度を決定し、処置動物における対応する相対濃度を算出した。白丸: 個々の値、黒丸: 群平均。22日目についてのH T R A 1低下(%)を示す。

10

20

30

40

50

【図12C-2】図12C. 上パネル：個々の動物から算出したHTRA1房水濃度を、注射後の時間に対してプロットした。下パネル：各々の時間点での溶媒群についての平均HTRA1濃度を決定し、処置動物における対応する相対濃度を算出した。白丸：個々の値、黒丸：群平均。22日目についてのHTRA1低下（%）を示す。

【図12C-3】図12C. 上パネル：個々の動物から算出したHTRA1房水濃度を、注射後の時間に対してプロットした。下パネル：各々の時間点での溶媒群についての平均HTRA1濃度を決定し、処置動物における対応する相対濃度を算出した。白丸：個々の値、黒丸：群平均。22日目についてのHTRA1低下（%）を示す。

【図13】図13. HTRA1転写産物を標的とする種々のLNA分子を用いて処置したカニクイザルにおける房水（青色菱形）中又は網膜（赤色四角）中のHTRA1タンパク質レベルに対してプロットしたHTRA1 mRNA。値は、PBS対照に対して標準化したパーセンテージとして表す。10

【図14】図14. 房水中のHTRA1タンパク質と、(A) 網膜中のHTRA1タンパク質及び(B) HTRA1転写産物を標的とする種々のLNA分子を用いて処置したカニクイザルにおける網膜中のHTRA1 mRNAとの相関。値は、PBS対照に対して標準化したパーセンテージとして表す。

#### 【0057】

##### 定義

##### オリゴヌクレオチド

本明細書中で使用する用語「オリゴヌクレオチド」は、2つ又はそれ以上の共有結合的に連結されたヌクレオシドを含む分子として当業者により一般的に理解されるように定義する。そのような共有結合的に結合されたヌクレオシドはまた、核酸分子又はオリゴマーとして言及されうる。オリゴヌクレオチドは一般に、実験室において固相化学合成、それに続く精製により作製される。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合、共有結合的に連結されたヌクレオチド又はヌクレオシドの核酸塩基部分の配列もしくは順序、又はその修飾に言及する。本発明のオリゴヌクレオチドは人工であり、化学的に合成し、典型的には精製又は単離する。本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドを含みうる。20

#### 【0058】

##### アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書中で使用する用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸、特に標的核酸上の連続配列にハイブリダイズすることにより標的遺伝子の発現を調節することが可能であるオリゴヌクレオチドとして定義する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは本質的に二本鎖ではなく、従ってsiRNAではない。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖である。30

#### 【0059】

##### 連続ヌクレオチド領域

用語「連続ヌクレオチド領域」は、標的核酸に相補的であるオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書中では、用語「連続ヌクレオチド配列」又は「連続核酸塩基配列」及び用語「オリゴヌクレオチドモチーフ配列」と互換的に使用してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドが連続ヌクレオチド領域中に存在する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは連続ヌクレオチド領域を含み、場合により、さらなるヌクレオチド、例えば、官能基を連続ヌクレオチド配列に付着させるために使用されうるヌクレオチドリンカー領域を含みうる。ヌクレオチドリンカー領域は、標的核酸に相補的であってもなくてもよい。一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域のヌクレオチド間に存在するヌクレオシド間連結は、全てのホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域は1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシドを含む。40

#### 【0060】

##### ヌクレオチド

10

20

30

40

50

ヌクレオチドはオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの構成要素であり、本発明の目的のために、天然及び非天然ヌクレオチドの両方を含む。自然界では、ヌクレオチド（例えばDNAヌクレオチド及びRNAヌクレオチドなど）は、リボース糖部分、核酸塩基部分、及び1つ又は複数のリン酸基（ヌクレオシド中には存在しない）を含む。ヌクレオシド及びヌクレオチドはまた、「単位」又は「単量体」として互換的に言及してもよい。

#### 【0061】

##### 修飾ヌクレオシド

本明細書中で使用する用語「修飾ヌクレオシド」又は「ヌクレオシド修飾」は、糖部分又は（核酸）塩基部分の1つ又は複数の修飾の導入により、等価のDNA又はRNAヌクレオシドと比較して修飾されたヌクレオシドを指す。好ましい実施形態では、修飾ヌクレオシドは修飾糖部分を含む。用語「修飾ヌクレオシド」はまた、本明細書中で、用語「ヌクレオシド類似体」又は修飾「単位」又は修飾「単量体」と互換的に使用してもよい。

10

#### 【0062】

##### 修飾ヌクレオシド間連結

用語「修飾ヌクレオシド間連結」は、2つのヌクレオシドを共有結合的に共役させるホスホジエステル（PO）連結以外の連結として当業者により一般的に理解されているよう定義する。修飾ヌクレオシド間連結を伴うヌクレオチドはまた、「修飾ヌクレオチド」と呼ぶ。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結によって、ホスホジエステル連結と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性が増加する。天然オリゴヌクレオチドについて、ヌクレオシド間連結は、隣接ヌクレオシド間にホスホジエステル結合を作製するリン酸基が含まれる。修飾ヌクレオシド間連結は、インビボでの使用のためにオリゴヌクレオチドを安定化する際に特に有用であり、本発明のオリゴヌクレオチド中のDNA又はRNAヌクレオシドの領域で、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内の、ならびに修飾ヌクレオシドの領域中のヌクレアーゼ切断に対して保護するのに役立ちうる。

20

#### 【0063】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、天然ホスホジエステルから、例えばヌクレアーゼ攻撃により耐性のある連結へ修飾された1つ又は複数のヌクレオシド間連結を含む。ヌクレアーゼ耐性は、血清中でオリゴヌクレオチドをインキュベートすることにより、又はヌクレアーゼ耐性アッセイ（例、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ（SVPD））を使用することにより決定してもよく、両方とも当技術分野において周知である。オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増強することが可能であるヌクレオシド間連結は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間連結として言及する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結、又はその連続ヌクレオチド配列の全てを修飾する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドを非ヌクレオチド官能基（例えばコンジュゲートなど）に連結するヌクレオシドがホスホジエステルでありうることが認識されるであろう。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結、又はその連続ヌクレオチド配列の全てがヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間連結である。

30

#### 【0064】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結はホスホロチオエートヌクレオシド間連結でありうる。一部の実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、本発明のオリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオエートのRNaseH動員と適合性がある。

40

#### 【0065】

一部の実施形態では、ヌクレオシド間連結は硫黄（S）（例えばホスホロチオエートヌクレオシド間連結など）を含む。

#### 【0066】

ホスホロチオエートヌクレオシド間連結は、ヌクレアーゼ耐性、有益な薬物動態、及び製造の容易さのために特に有用である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結、又はその連続ヌクレオチド配列の全てがホスホロチオエートである。

#### 【0067】

50

## 核酸塩基

用語「核酸塩基」は、核酸ハイブリダイゼーションにおいて水素結合を形成するヌクレオシド及びヌクレオチド中に存在するプリン（例、アデニン及びグアニン）及びピリミジン（例、ウラシル、チミン、及びシトシン）部分を含む。本発明の文脈において、用語「核酸塩基」はまた、天然核酸塩基とは異なりうるが、しかし、核酸ハイブリダイゼーションの間に機能的である修飾核酸塩基を包含する。この文脈において、「核酸塩基」は、天然核酸塩基（例えばアデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチン、及びヒポキサンチンなど）、ならびに非天然バリアントの両方を指す。そのようなバリアントは、例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1において記載されている。10

### 【0068】

一部の実施形態では、核酸塩基部分は、プリン又はピリミジンを、修飾プリン又はピリミジン、例えば置換プリン又は置換ピリミジンなど、例えばイソシトシン、プソイドイソシトシン、5 - メチルシトシン、5 - チオゾロ - シトシン、5 - プロピニル - シトシン、5 - プロピニル - ウラシル、5 - プロモウラシル 5 - チアゾロ - ウラシル、2 - チオ - ウラシル、2' - チオチミン、イノシン、ジアミノプリン、6 - アミノプリン、2 - アミノプリン、2', 6 - ジアミノプリン、及び2 - クロロ - 6 - アミノプリンより選択される核酸塩基などに変化させることにより修飾する。

### 【0069】

核酸塩基部分は、各々の対応する核酸塩基についての文字コード（例、A、T、G、C、又はU）により示してもよく、それにおいて各々の文字は、場合により、等価の機能の修飾核酸塩基を含みうる。例えば、例示するオリゴヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分は、A、T、G、C、及び5 - メチルシトシンより選択する。場合により、LNAギャップマーのために、5 - メチルシトシン LNAヌクレオシドを使用してもよい。一部の実施形態では、5' - c g 3' モチーフ中のシトシン核酸塩基は5 - メチルシトシンである。20

### 【0070】

#### 修飾オリゴヌクレオチド

用語「修飾オリゴヌクレオチド」によって、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド及び/又は修飾ヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチドを記載する。用語「キメラ」オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシドを伴うオリゴヌクレオチドを記載するために文献において使用してきた用語である。30

### 【0071】

#### 相補性

用語「相補性」によって、ヌクレオシド/ヌクレオチドのワツンクリック塩基対形成のための abilities を記載する。ワツン - クリック塩基対は、グアニン (G) - シトシン (C) 及びアデニン (A) - チミン (T) / ウラシル (U) である。オリゴヌクレオチドは、修飾核酸塩基を伴うヌクレオシドを含みうるが、例えば、5 - メチルシトシンがシトシンの代わりにしばしば使用され、そのようなものとして、用語「相補性」は、非修飾核酸塩基と修飾核酸塩基の間のワツンクリック塩基対形成を包含することが理解されるであろう（例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1を参照のこと）。40

### 【0072】

本明細書中で使用する用語「%相補的」は、所与の位置で、別々の核酸分子（例、標的核酸）の所与の位置で連続ヌクレオチド配列と相補的である（即ち、それとワツンクリック塩基対を形成する）核酸分子（例、オリゴヌクレオチド）中の連続ヌクレオチド領域又は配列のパーセントでのヌクレオチド数を指す。パーセンテージは、2つの配列間で対を形成する、整列された塩基の数をカウントし、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数により除し、100により乗じることにより算出する。そのような比較では、整列し50

ない（塩基対を形成しない）核酸塩基／ヌクレオチドをミスマッチと呼ぶ。

【0073】

2つの配列間の相補性に言及する場合、相補性の決定は、2つの配列のより短い方の長さ（例えば連続ヌクレオチド領域又は配列の長さなど）にわたって測定されることが理解されるであろう。

【0074】

用語「完全に相補的」は100%の相補性を指す。ミスマッチの%項値又は表示の非存在において、相補的は完全に相補的を意味する。

【0075】

同一性

本明細書中で使用する用語「同一性」は、所与の位置で、別々の核酸分子（例、標的核酸）の所与の位置で連続ヌクレオチド配列と（即ち、相補的ヌクレオシドとワトソンクリック塩基対を形成するそれらの能力において）同一である核酸分子（例、オリゴヌクレオチド）中の連続ヌクレオチド配列のパーセントでのヌクレオチド数を指す。パーセンテージは、2つの配列（ギャップを含む）間で同一である、整列された塩基の数をカウントし、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数により除し、100により乗じることにより算出する。同一性パーセント = (マッチ数 × 100) / 整列領域の長さ（ギャップを伴う）。

【0076】

オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域の同一性を決定する場合、同一性を連続ヌクレオチド領域の長さにわたって算出する。オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列全体が連続ヌクレオチド領域である実施形態では、同一性は従って、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列の長さにわたって算出する。これに関して、連続ヌクレオチド領域は、参照核酸配列の領域と同一であってもよく、又は一部の実施形態では、参照核酸全体と同一であってもよい。他に示さない場合、参照配列と100%の同一性を有する配列は同一であるとして言及する。

【0077】

例えば、参照配列は、配列番号5～111のいずれか1つからなる群より選択してもよい。

【0078】

しかし、オリゴヌクレオチドが、連続ヌクレオチド領域、例えば領域D'又はD''に隣接する追加のヌクレオチドを含む場合、これらの追加の隣接ヌクレオチドは、同一性を決定する場合に無視してもよい。一部の実施形態では、同一性をオリゴヌクレオチド配列全体にわたって算出してもよい。

【0079】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号5～111からなる群より選択される配列と同一である少なくとも10の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

【0080】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号5～111からなる群より選択される配列と同であるの少なくとも12の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

【0081】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号5～111からなる群より選択される配列と同一であるの少なくとも13の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

【0082】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号5～111からなる群より選択される配列と同一であるの少なくとも14の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

10

20

30

40

50

**【 0 0 8 3 】**

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 ~ 1 1 1 からなる群より選択される配列と同一である少なくとも 1 5 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

**【 0 0 8 4 】**

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 ~ 1 1 1 からなる群より選択される配列と同一である少なくとも 1 6 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。

**【 0 0 8 5 】**

一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域は、配列番号 1 1 3 ~ 1 1 8 、又は配列番号 5 ~ 1 1 1 ～からなる群より選択される配列の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 の連続ヌクレオチドなど、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列全体は、配列番号の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

10

**【 0 0 8 6 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列は、配列番号 1 1 9 の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

20

**【 0 0 8 7 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列は、配列番号 1 2 0 の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

**【 0 0 8 8 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列は、配列番号 1 2 1 の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

30

**【 0 0 8 9 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列は、配列番号 1 2 2 の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

**【 0 0 9 0 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列は、配列番号 1 2 3 の少なくとも 1 0 の連続ヌクレオチド、例えば 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 など、例えば 1 2 ~ 2 2 からなど、例えば 1 4 ~ 1 8 の連続ヌクレオチドからなどからなる、又はそれで構成される。

40

**【 0 0 9 1 】**

本発明は、少なくとも 1 0 、又は少なくとも 1 2 、又は少なくとも 1 3 、又は少なくとも 1 4 又は少なくとも 1 5 又は少なくとも 1 6 又は少なくとも 1 7 又は少なくとも 1 8 の連続ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。配列番号 1 1 8 : 5 ' C T T C T T C T A T C T A C G C A T T G 3 ' 。

**【 0 0 9 2 】**

一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域は、配列番号 6 7 と同一の 1 0 、 1 1 、 1

50

2、13、14、15、又は16の連続ヌクレオチドを含む。

【0093】

一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域は、配列番号73と同一の10、11、12、13、14、15、16、17、又は18の連続ヌクレオチドを含む。

【0094】

一部の実施形態では、連続ヌクレオチド領域は、配列番号86と同一の10、11、12、13、14、15、又は16の連続ヌクレオチドを含む。

【0095】

本発明は、長さ11～30ヌクレオチド(例えば長さ12～20ヌクレオチドなど)のアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいてオリゴヌクレオチドは配列番号5～111からなる群より選択される配列と同一の連続ヌクレオチド配列を含む。10

【0096】

本発明は、連続ヌクレオチド配列を含む又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド配列は、参照配列の少なくとも10の連続ヌクレオチドにわたって配列番号5～111からなる群より選択される参照配列と同一である。

【0097】

本発明は、連続ヌクレオチド配列を含む又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド配列は、参照配列の少なくとも12の連続ヌクレオチドにわたって配列番号5～111からなる群より選択される参照配列と同一である。20

【0098】

本発明は、連続ヌクレオチド配列を含む又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド配列は、参照配列の少なくとも14の連続ヌクレオチドにわたって配列番号5～111からなる群より選択される参照配列と同一である。

【0099】

本発明は、連続ヌクレオチド配列を含む又はそれからなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供し、それにおいて連続ヌクレオチド配列は、参照配列の長さにわたって配列番号5～111からなる群より選択される参照配列と同一である。30

【0100】

### ハイブリダイゼーション

本明細書中で使用する用語「ハイブリダイズしている」又は「ハイブリダイズする」は、2つの核酸鎖(例、オリゴヌクレオチド及び標的核酸)が反対鎖の塩基対間に水素結合を形成し、それにより二本鎖を形成すると理解すべきである。2つの核酸鎖間の結合の親和性は、ハイブリダイゼーションの強度である。それはしばしば、オリゴヌクレオチドの半分が標的核酸と二本鎖化される温度として定義される融解温度( $T_m$ )の観点から記載される。生理学的条件 $T_m$ は親和性に厳密に比例しない(Mergny and Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13:515-537)。標準状態のギブス自由エネルギー $G^\circ$ は、結合親和性のより正確な表現であり、 $G^\circ = -RT \ln(K_d)$ により反応の解離定数( $K_d$ )に関連し、式中、Rは気体定数であり、Tは絶対温度である。従って、オリゴヌクレオチドと標的核酸間の反応の非常に低い $G^\circ$ は、オリゴヌクレオチドと標的核酸間の強いハイブリダイゼーションを反映している。 $G^\circ$ は、水溶液の濃度が1Mであり、pHが7であり、温度が37である反応に関連付けられるエネルギーである。標的核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは自発的な反応であり、自発的な反応について、 $G^\circ$ はゼロ未満である。 $G^\circ$ は、例えば、Hansen et al., 1965, Chem. Comm. 36-38及びHoldgate et al., 2005, Drug Discov Todayにおいて記載されている等温滴定熱量測定(ITEC)方法の使用により実験的に測定することができる。当業者は、市販の機器を $G^\circ$ 測定のために利用可能であることを知っているであろう。 $G^\circ$ はまた、Sugimoto et al., 1995, Biochemistry 34:11211-11216及びMcTigue et al., 2004,40

Biochemistry 43:5388-5405により記載されている適宜導出された熱力学的パラメーターを使用して、SantaLucia, 1998, Proc Natl Acad Sci USA. 95: 1460-1465により記載されているように、最近傍モデルを使用することにより数値的に推定することができる。ハイブリダイゼーションによりその意図する核酸標的を調節する可能性を有するために、本発明のオリゴヌクレオチドは、長さ 10 ~ 30 ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドについて - 10 kca1 未満の推定 G° 値を伴い標的核酸にハイブリダイズする。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションの程度又は強度は、標準状態のギブス自由エネルギー G° により測定する。オリゴヌクレオチドは、長さ 8 ~ 30 ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドについて - 10 kca1 の範囲未満、例えば - 15 kca1 未満など、例えば - 20 kca1 未満など、例えば - 25 kca1 未満などの推定 G° 値を伴い標的核酸にハイブリダイズする。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、- 10 ~ - 60 kca1、例えば - 12 ~ - 40 など、例えば - 15 ~ - 30 kca1 又は - 16 ~ - 27 kca1 など、例えば - 18 ~ - 25 kca1 などの推定 G° 値を伴い標的核酸にハイブリダイズする。

#### 【0101】

##### 標的配列

オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子の部分配列に相補的である又はハイブリダイズする連続ヌクレオチド領域を含む。本明細書中で使用する用語「標的配列」は、本発明のオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域又は配列に相補的である核酸塩基配列を含む標的核酸中に存在するヌクレオチドの配列を指す。一部の実施形態では、標的配列は、本発明のオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域又は配列に相補的である標的核酸上の領域からなる。一部の実施形態では、標的配列は単一のオリゴヌクレオチドの相補的配列よりも長く、例えば、本発明のいくつかのオリゴヌクレオチドにより標的化されうる標的核酸の好みの領域を表す。

#### 【0102】

本発明のオリゴヌクレオチドは、標的核酸（例えば標的配列など）に相補的である連続ヌクレオチド領域を含む。

#### 【0103】

オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子中に存在する標的配列に相補的である又はハイブリダイズする少なくとも 10 のヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含む。連続ヌクレオチド領域（従って、標的配列）は、少なくとも 10 の連続ヌクレオチド、例えば 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 の連続ヌクレオチドなど、例えば 12 ~ 22 からなど、例えば 14 ~ 18 の連続ヌクレオチドからなどを含む。

#### 【0104】

一部の実施形態では、標的配列は、配列番号 113、114、115、116、117、及び 118 からなる群より選択される配列内に存在する。

#### 【0105】

##### 標的細胞

本明細書中で使用する用語「標的細胞」は、標的核酸を発現している細胞を指す。一部の実施形態では、標的細胞はインビボ又はインビトロでありうる。一部の実施形態では、標的細胞は、哺乳動物細胞、例えば靈長類細胞など、例えばサル細胞又はヒト細胞などである。一部の実施形態では、標的細胞は、網膜細胞、例えば網膜色素上皮（P R E）細胞などでありうる。一部の実施形態では、細胞は、R P E 細胞、双極細胞、アマクリン細胞、内皮細胞、神経節細胞、及びミクログリア細胞からなる群より選択する。インビトロ評価について、標的細胞は初代細胞又は樹立細胞株、例えば U 251、A R P E 19 . . . などである。

#### 【0106】

##### 標的核酸

本発明に従い、標的核酸は、哺乳動物 H T R A 1 をコードする核酸であり、例えば、遺

10

20

30

40

50

伝子、RNA、mRNA、及びプレmRNA、成熟mRNA又はcDNA配列でありうる。標的は従って、HTRA1標的核酸として言及されうる。

#### 【0107】

適切には、標的核酸は、HTRA1タンパク質、特に哺乳動物HTRA1、例えばヒトHTRA1などをコードする（例えば、ヒト及びラットHTRA1についてのmRNA及びプレmRNA配列を提供する表1及び2を参照のこと）。

#### 【0108】

一部の実施形態では、標的核酸は、配列番号1、2、3、及び4からなる群、又はその天然バリエント（例、哺乳動物HTRA1タンパク質をコードする配列）より選択する。

#### 【0109】

標的細胞は、HTRA1標的核酸を発現している細胞である。好ましい実施形態では、標的核酸は、HTRA1 mRNA、例えばHTRA1プレmRNA又はHTRA1成熟mRNAなどである。HTRA1 mRNAのポリAテールは典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化については無視する。

#### 【0110】

研究又は診断において本発明のオリゴヌクレオチドを用いる場合、標的核酸は、DNA又はRNAから由来するcDNA又は合成核酸でありうる。

#### 【0111】

標的配列は、標的核酸の部分配列であってもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド領域は、HTRA1部分配列、例えば配列番号113、114、115、116、117、又は231からなる群より選択される配列などに完全に相補的であるか、又は1つもしくは2つのミスマッチだけを含む。

20

#### 【0112】

標的配列は、標的核酸の部分配列であってもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド領域は、HTRA1部分配列、例えば配列番号124～230からなる群より選択される配列などに完全に相補的であるか、又は1つもしくは2つのミスマッチだけを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド領域は、HTRA1部分配列配列番号231に完全に相補的であるか、又は1つもしくは2つのミスマッチだけを含む。

#### 【0113】

30

標的又はその部分配列への相補性は、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域の長さにわたって測定する。

#### 【0114】

インビオ又はインビトロでの適用のために、本発明のオリゴヌクレオチドは典型的には、HTRA1標的核酸を発現している細胞においてHTRA1標的核酸の発現を阻害することが可能である。本発明のオリゴヌクレオチドの核酸塩基の連続配列は典型的には、場合により、1つ又は2つのミスマッチの例外を伴い、及び場合により、オリゴヌクレオチドを任意の官能基、例えばコンジュゲート又は他の非相補的末端ヌクレオチドなどに連結しうるヌクレオチドベースのリンカー領域（例、領域D）を除くオリゴヌクレオチドの長さ全体にわたって測定した場合、HTRA1標的核酸に相補的である。標的核酸は、一部の実施形態では、RNA又はDNA、例えばメッセンジャーRNAなど、例えば成熟mRNA又はプレmRNAなどでありうる。一部の実施形態では、標的核酸は、哺乳動物HTRA1タンパク質（例えばヒトHTRA1など）をコードするRNA又はDNA、例えば、配列番号1(NM\_002775.4、GI:190014575)として開示されているようなヒトHTRA1 mRNA配列である。例示的な標的核酸に関するさらなる情報を探る表1 & 2中に提供する。

40

50

## 【表 1】

表1. ヒト及びカニクイザル HTRA1 のゲノム及び構築情報。

種	Chr.	鎖	ゲノム座標 開始 終了		構築	mRNA についての NCBI 参照配列 * 受入 番号
ヒト	10	fwd	122461525	122514908	GRCh38.p2 release 107	NM_002775.4
カニクイ ザル	9	fwd	12176499 4	1218175 18	Macaca_fasciculari s_5.0	NC_022280.1**

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

\* 国立生物工学情報センターの参照配列データベースは、ゲノム、転写物、タンパク質を含む、包括的で統合された、冗長性のない、十分な注釈の付いた一連の参照配列である。それは [www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq) で主催されている。

\*\* NCBI 参照配列には、同一性が不明な位置126から位置227までの100ヌクレオチドのストレッチがある。配列番号3及び4では、このストレッチは、この領域中のヒト及びアカゲザル HTRA1 プレ mRNA 配列の両方ににおいて出現するヌクレオチドにより置換されている。

## 【表 2】

表2. ヒト及びカニクイザル HTRA1 についての配列詳細。

種	RNA 型	長さ (nt)	配列番号
ヒト	mRNA	2138	1
ヒト	プレ mRNA	53384	2
カニクイザル	mRNA	2123	3
カニクイザル	プレ mRNA	52575	4

## 【0115】

## 天然バリエント

用語「天然バリエント」は、標的核酸と同じ遺伝子座から由来する H T R A 1 遺伝子又は転写物のバリエントを指すが、しかし、例えば、同じアミノ酸をコードするコドンの多様性を起こす遺伝コードの縮重のため、又はプレ mRNA の選択的スプライシング、又は多型（例えば一塩基多型など）、及び対立遺伝子変異体の存在に起因して異なりうる。オリゴヌクレオチドに完全に相補的な配列の存在に基づき、本発明のオリゴヌクレオチドは従って、標的核酸及びその天然バリエントを標的としうる。一部の実施形態では、天然バリエントは、哺乳動物 H T R A 1 標的核酸（例えば配列番号 1、2、3、又は 4 からなる群より選択され標的核酸など）への少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% 又は少なくとも 99%などの相同性を有する。

## 【0116】

## 発現の調節

本明細書中で使用する用語「発現の調節」は、オリゴヌクレオチドの投与前の H T R A 1 の量と比較した場合に H T R A 1 の量を変えるオリゴヌクレオチドの能力についての全体的な用語として理解される。あるいは、発現の調節は、本発明のオリゴヌクレオチドが投与されない対照実験の参照により決定されうる。調節の 1 つの型は、例えば、mRNA の分解又は転写の遮断により H T R A 1 の発現を阻害、下方調節、低下、抑制、除去、停

止、遮断、防止、軽減、低減、回避、又は終結させるオリゴヌクレオチドの能力である。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、HTRA1の発現を阻害、下方調節、低下、抑制、除去、停止、遮断、防止、軽減、低減、回避、又は終結させることが可能である。

#### 【0117】

##### 高親和性修飾ヌクレオシド

高親和性修飾ヌクレオシドは、例えば融解温度( $T^m$ )により測定されるように、オリゴヌクレオチド中に組み入れられた場合、その相補的標的についてのオリゴヌクレオチドの親和性を増強する修飾ヌクレオシドである。本発明の高親和性修飾ヌクレオシドは、好みしくは、修飾ヌクレオシド当たり $+0.5 \sim +1.2$ 、より好みしくは $+1.5 \sim +1.0$ 、最も好みしくは $+3 \sim +8$ の間の融解温度における増加をもたらす。多数の高親和性修飾ヌクレオシドが当技術分野において公知であり、例えば、多くの2'置換ヌクレオシドならびにロックド核酸(LNA)を含む(例、Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213を参照のこと)。

10

#### 【0118】

##### 糖修飾

本発明のオリゴマーは、修飾糖部分、即ち、DNA及びRNA中に見出されるリボース糖部分と比較した場合での糖部分の修飾を有する1つ又は複数のヌクレオシドを含んでもよい。

#### 【0119】

リボース糖部分の修飾を伴う多数のヌクレオシドが、主に、オリゴヌクレオチドの特定の特性、例えば親和性及び/又はヌクレアーゼ耐性などを改善する目的で作製されてきた。

20

#### 【0120】

そのような修飾は、リボソーム環構造が、典型的にはリボース環(LNA)上のC2炭素とC4炭素の間にピラジカル架橋を有するヘキソース環(HNA)、もしくは二環式環、又は典型的にはC2炭素とC3炭素の間の結合を欠く非連結リボース環(例、UNA)を用いた置換により修飾されるものを含む。他の糖修飾ヌクレオシドは、例えば、ビシクロヘキソース核酸(WO2011/017521)又は三環式核酸(WO2013/154798)を含む。修飾ヌクレオシドはまた、例えばペプチド核酸(PNA)、又はモルホリノ核酸の場合において糖部分が非糖部分で置換されているヌクレオシドを含む。

30

#### 【0121】

糖修飾はまた、リボース環上の置換基を水素以外の基、又はDNA及びRNAヌクレオシドにおいて自然に見出される2'-OH基に変えることを介して作製される修飾を含む。置換基は、例えば、2'、3'、4'、又は5'の位置に導入してもよい。修飾糖部分を伴うヌクレオシドはまた、2'修飾ヌクレオシド(例えば2'置換ヌクレオシドなど)を含む。実際に、多くの焦点が2'置換ヌクレオシドの開発に当てられており、多数の2'置換ヌクレオシドが、オリゴヌクレオチド中に組み入れられた場合に有益な特性(例えば増強されたヌクレオシド耐性及び増強された親和性など)を有することが見出されている。

#### 【0122】

##### 2'修飾ヌクレオシド。

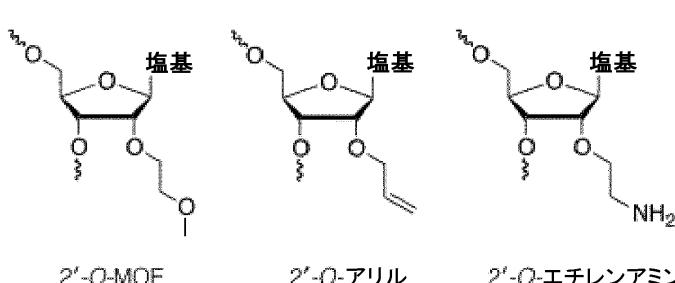
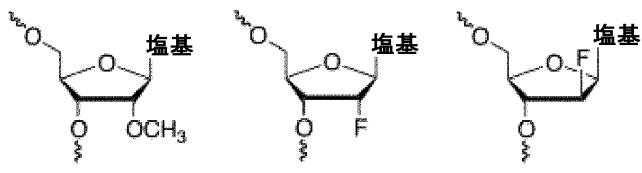
40

2'糖修飾ヌクレオシドは、2'位置にH又は-OH以外の置換基を有する(2'置換ヌクレオシド)、又は2'連結ピラジカルを含むヌクレオシドであり、2'置換ヌクレオシド及びLNA(2'-4'ピラジカル架橋)ヌクレオシドを含む。例えば、2'修飾糖は、オリゴヌクレオチドへの増強した結合親和性及び/又は増強したヌクレアーゼ耐性を提供しうる。2'置換修飾ヌクレオシドの例は、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA(MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、及び2'-F-ANAヌクレオシドである。さらなる例については、例えばFreier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213、ならびにDeleavy and Damha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937を是非参照のこと。

50

と。以下は、2'置換修飾ヌクレオシドの例証である。

【化15】



【0123】

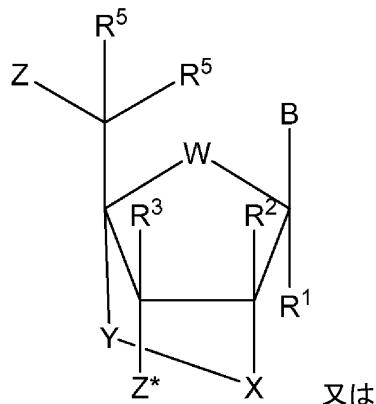
ロックド核酸ヌクレオシド(LNA)

LNAヌクレオシドは、ヌクレオチドのリボース糖環のC2' と C4' の間にリンカー基(ピラジカル又は架橋として言及する)を含む修飾ヌクレオシドである。これらのヌクレオシドはまた、文献において架橋核酸又は二環式核酸(BNA)と呼ぶ。

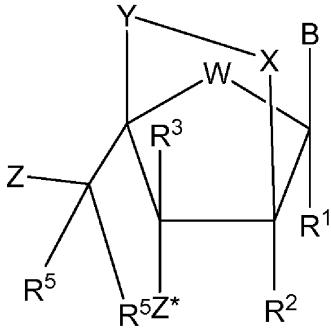
【0124】

一部の実施形態では、本発明のオリゴマーの修飾ヌクレオシド又はLNAヌクレオシドは、式I又はIIの一般構造を有する：

【化16】



ベータ-D



アルファー-L

式I

式II

式中、Wは-O-、-S-、-N(R<sup>a</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-より選択し、例えば一部の実施形態では-O-などである；

Bは核酸塩基部分を指定する；

Zは、隣接ヌクレオシド又は5'末端基へのヌクレオシド間連結を指定する；

Z\*は、隣接ヌクレオシド又は3'末端基へのヌクレオシド間連結を指定する；

Xは、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-及び>C=Zからなるリストより選択される群を指定する。

【0125】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、Xは、-O-、-S-、NH-、NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-CH<sub>2</sub>-、CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-C(=CH<sub>2</sub>)-、及び-C(=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-からなる群より選択する。

#### 【0126】

一部の実施形態では、Xは-O-である

Yは、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-、及び>C=Zからなる群より選択された基を指定する。

#### 【0127】

一部の実施形態では、Yは、-CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、及び-C(R<sup>a</sup>)=N-からなる群より選択する。

#### 【0128】

一部の実施形態では、Yは、-CH<sub>2</sub>-、-CHR<sup>a</sup>-、-CHCH<sub>3</sub>-、CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-からなる群より選択する、

又は-X-Y-は二価リンカー基（ラジカルとしても言及する）と一緒に指定し、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-、及び>C=Zからなる群より選択される1、2、又は3の基／原子からなる二価リンカー基と一緒に指定する。

#### 【0129】

一部の実施形態では、-X-Y-は、-X-CH<sub>2</sub>-、-X-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-、-X-CHR<sup>a</sup>-、-X-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-O-Y-、-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-、-O-CHCH<sub>3</sub>-、-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>、-O-CH(CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-、-O-NCH<sub>2</sub>-、-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-NR<sup>a</sup>-CH<sub>2</sub>-、N-O-CH<sub>2</sub>、-S-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-、及び-S-CHR<sup>a</sup>-からなる群より選択されるビラジカルを指定する。

#### 【0130】

一部の実施形態では、-X-Y-は-O-CH<sub>2</sub>-又は-O-CH(CH<sub>3</sub>)-を指定する。

式中、Zは-O-、-S-、及び-N(R<sup>a</sup>)-より選択し、

R<sup>a</sup>、及び存在する場合にはR<sup>b</sup>は、各々が、水素、場合により置換C<sub>1-6</sub>-アルキル、場合により置換C<sub>2-6</sub>-アルケニル、場合により置換C<sub>2-6</sub>-アルキニル、ヒドロキシ、場合により置換C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルコキシアルキル、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ及びジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ及びジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、モノ及びジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲンより独立して選択され、ここでアリール及びヘテロアリールを場合により置換してもよく、ここで2つのジェミナル置換基R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>は一緒に、場合により置換メチレン(=CH<sub>2</sub>)を指定しうるが、それにおいて全てのキラル中心について、不斉基はR又はSのいずれかの方向において見出されうる。

式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5</sup>\*は、水素、場合により置換C<sub>1-6</sub>-アルキル、場合により置換C<sub>2-6</sub>-アルケニル、場合により置換C<sub>2-6</sub>-アルキニル、ヒドロキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルコキシアルキル、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘ

10

20

30

40

50

テロアリール、ヘテロアリールオキシ - カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ及びジ (C<sub>1-6</sub>-アルキル) アミノ、カルバモイル、モノ及びジ (C<sub>1-6</sub>-アルキル) - アミノ - カルボニル、アミノ - C<sub>1-6</sub>-アルキル - アミノカルボニル、モノ及びジ (C<sub>1-6</sub>-アルキル) アミノ - C<sub>1-6</sub>-アルキル - アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキル - カルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲンからなる群より独立して選択し、ここでアリール及びヘテロアリールは場合により置換されてもよく、ここで2つのジェミナル置換基は一緒にオキソ、チオキソ、イミノ、又は場合により置換メチレンを指定しうる。

## 【0131】

10

一部の実施形態では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>は、C<sub>1-6</sub>アルキル（例えばメチルなど）及び水素より独立して選択する。

## 【0132】

一部の実施形態では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>は全て水素である。

## 【0133】

一部の実施形態では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>は全て水素であり、R<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>のいずれかも水素であり、R<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>の他方は水素以外、例えばC<sub>1-6</sub>アルキルなど（例えばメチルなど）である。

## 【0134】

一部の実施形態では、R<sup>a</sup>は水素又はメチルのいずれかである。一部の実施形態では、存在する場合、R<sup>b</sup>は水素又はメチルのいずれかである。

20

## 【0135】

一部の実施形態では、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>の一方又は両方が水素である。

## 【0136】

一部の実施形態では、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>の一方は水素であり、他方は水素以外である。

## 【0137】

一部の実施形態では、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>の一方はメチルであり、他方は水素である。

## 【0138】

一部の実施形態では、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>の両方がメチルである。

## 【0139】

30

一部の実施形態では、ピラジクル - X - Y - は - O - CH<sub>2</sub> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、WO99/014226、WO00/66604、WO98/039352、及びWO2004/046160に開示されており、それらを全て参照により本明細書により組み入れ、一般にベータ - D - オキシLNA及びアルファ - L - オキシLNAヌクレオシドとして公知であるものを含む。

## 【0140】

一部の実施形態では、ピラジクル - X - Y - は - S - CH<sub>2</sub> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのようなチオLNAヌクレオシドは、WO99/014226及びWO2004/046160に開示されており、それらを参考により本明細書により組み入れる。

40

## 【0141】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - NH - CH<sub>2</sub> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのようなアミノLNAヌクレオシドは、WO99/014226及びWO2004/046160に開示されており、それらを参考により本明細書により組み入れる。

## 【0142】

一部の実施形態では、ピラジクル - X - Y - は - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - 又は - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのようなLNAヌクレオシドはWO00/047599及びMorita et

50

al, Bioorganic & Med. Chem. Lett. 12 73-76に開示されており、それらを参照により本明細書により組み入れ、一般に 2' - O - 4' C - エチレン架橋核酸 (E N A) として公知であるものを含む。

#### 【0143】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CH<sub>2</sub> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>の全て、ならびにR<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>の一方は水素であり、R<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>の他方は水素以外、例えばC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキルなど(例えばメチルなど)である。そのような5'置換LNAヌクレオシドはWO 2007 / 134181に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。

#### 【0144】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> - であり、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>の一方又は両方が水素以外、例えばメチルなどであり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>の全て、及びR<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>の一方は水素であり、R<sup>5</sup>及びR<sup>5\*</sup>の他方は水素以外、例えばC<sub>1</sub>-<sub>6</sub>アルキルなど(例えばメチルなど)である。そのようなビス修飾LNAヌクレオシドはWO 2010 / 077578に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。

10

#### 【0145】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は、二価リンカー基 - O - CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) - (2' O - メトキシエチル二環式核酸 - Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81)を指定する。一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は、二価リンカー基 - O - CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - (2' O - エチル二環式核酸 - Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75(5) pp. 1569-81)を指定する。一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CHR<sup>a</sup> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのような6'置換LNAヌクレオシドはWO 10036698及びWO 070970071に開示されており、それらの両方を参照により本明細書により組み入れる。

20

#### 【0146】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのようなLNAヌクレオシドはまた、当技術分野において環状MOE(cMOE)として公知であり、WO 070970071に開示されている。

30

#### 【0147】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は、R - 又はS - 配置のいずれかにおける二価リンカー基 - O - CH(CH<sub>3</sub>) - を提示する。一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は一緒に二価リンカー基 - O - CH<sub>2</sub> - O - CH<sub>2</sub> - を指定する(Seth et al., 2010, J. Org. Chem.)。一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CH(CH<sub>3</sub>) - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのような6'メチルLNAヌクレオシドはまた、当技術分野においてcETヌクレオシドとして公知であり、WO 07090071(ベータ-D)及びWO 2010 / 036698(アルファ-L)に開示されているように、(S)cET又は(R)cET立体異性体のいずれかでありうるが、それらの両方を参照により本明細書により組み入れる。

40

#### 【0148】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - O - CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> - であり、それにおいてR<sup>a</sup>又はR<sup>b</sup>はいずれも水素ではなく、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。一部の実施形態では、R<sup>a</sup>及びR<sup>b</sup>は両方ともメチルである。そのような6'二置換LNAヌクレオシドはWO 2009006478に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。

#### 【0149】

一部の実施形態では、ピラジカル - X - Y - は - S - CHR<sup>a</sup> - であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>5\*</sup>の全てが全て水素である。そのような6'置換チオL

50

N A ヌクレオシドは W O 1 1 1 5 6 2 0 2 に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。一部の 6' 置換チオ L N A の実施形態では、R<sup>a</sup> はメチルである。

#### 【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、ビラジクル - X - Y - は - C ( = C H<sub>2</sub> ) - C ( R<sup>a</sup> R<sup>b</sup> ) - 、例えば - C ( = C H<sub>2</sub> ) - C H<sub>2</sub> - 、又は - C ( = C H<sub>2</sub> ) - C H ( C H<sub>3</sub> ) - などであり、W は O であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>5\*</sup> の全てが全て水素である。そのようなビニルカルボ L N A ヌクレオシドは W O 0 8 1 5 4 4 0 1 及び W O 0 9 0 6 7 6 4 7 に開示されており、それらの両方を参照により本明細書により組み入れる。

#### 【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、ビラジクル - X - Y - は - N ( - O R<sup>a</sup> ) - であり、W は O であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>5\*</sup> の全てが全て水素である。一部の実施形態では、R<sup>a</sup> は C 1 - 6 アルキル（例えばメチルなど）である。そのような L N A ヌクレオシドはまた、N 置換 L N A として公知であり、W O 2 0 0 8 / 1 5 0 7 2 9 に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。一部の実施形態では、ビラジクル - X - Y - は一緒に、二価リンカーベース - O - N R<sup>a</sup> - C H<sub>3</sub> - を指定する (Seth et al., 2010, J. Org. Chem.)。一部の実施形態では、ビラジクル - X - Y - は - N ( R<sup>a</sup> ) - であり、W は O であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>5\*</sup> の全てが全て水素である。一部の実施形態では、R<sup>a</sup> は C 1 - 6 アルキル（例えばメチルなど）である。

#### 【 0 1 5 2 】

一部の実施形態では、R<sup>5</sup> 及び R<sup>5\*</sup> の一方又は両方が水素であり、置換される場合、R<sup>5</sup> 及び R<sup>5\*</sup> の他方は C 1 - 6 アルキル（例えばメチルなど）である。そのような実施形態では、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup> は全て水素であってもよく、ビラジクル - X - Y - は - O - C H<sub>2</sub> - 又は - O - C ( H C R<sup>a</sup> ) - （例えば - O - C ( H C H<sub>3</sub> ) - など）より選択してもよい。

#### 【 0 1 5 3 】

一部の実施形態では、ビラジクルは - C R<sup>a</sup> R<sup>b</sup> - O - C R<sup>a</sup> R<sup>b</sup> - （例えば C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - など）であり、W は O であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>5\*</sup> の全てが全て水素である。一部の実施形態では、R<sup>a</sup> は C 1 - 6 アルキル（例えばメチルなど）である。そのような L N A ヌクレオシドはまた、立体構造的に制限されたヌクレオチド (C R N) として公知であり、W O 2 0 1 3 0 3 6 6 8 6 8 に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。

#### 【 0 1 5 4 】

一部の実施形態では、ビラジクルは - O - C R<sup>a</sup> R<sup>b</sup> - O - C R<sup>a</sup> R<sup>b</sup> - （例えば O - C H<sub>2</sub> - O - C H<sub>2</sub> - など）であり、W は O であり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>5\*</sup> の全てが全て水素である。一部の実施形態では、R<sup>a</sup> は C 1 - 6 アルキル（例えばメチルなど）である。そのような L N A ヌクレオシドはまた、C O C ヌクレオチドとして公知であり、Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009 37(4), 1225-1238 に開示されており、それを参照により本明細書により組み入れる。

#### 【 0 1 5 5 】

特定しない場合、L N A ヌクレオシドはベータ - D 又はアルファ - L 立体アイソフォームでありうることが認識されるであろう。

#### 【 0 1 5 6 】

L N A ヌクレオシドの例をスキーム 1 において提示する。

10

20

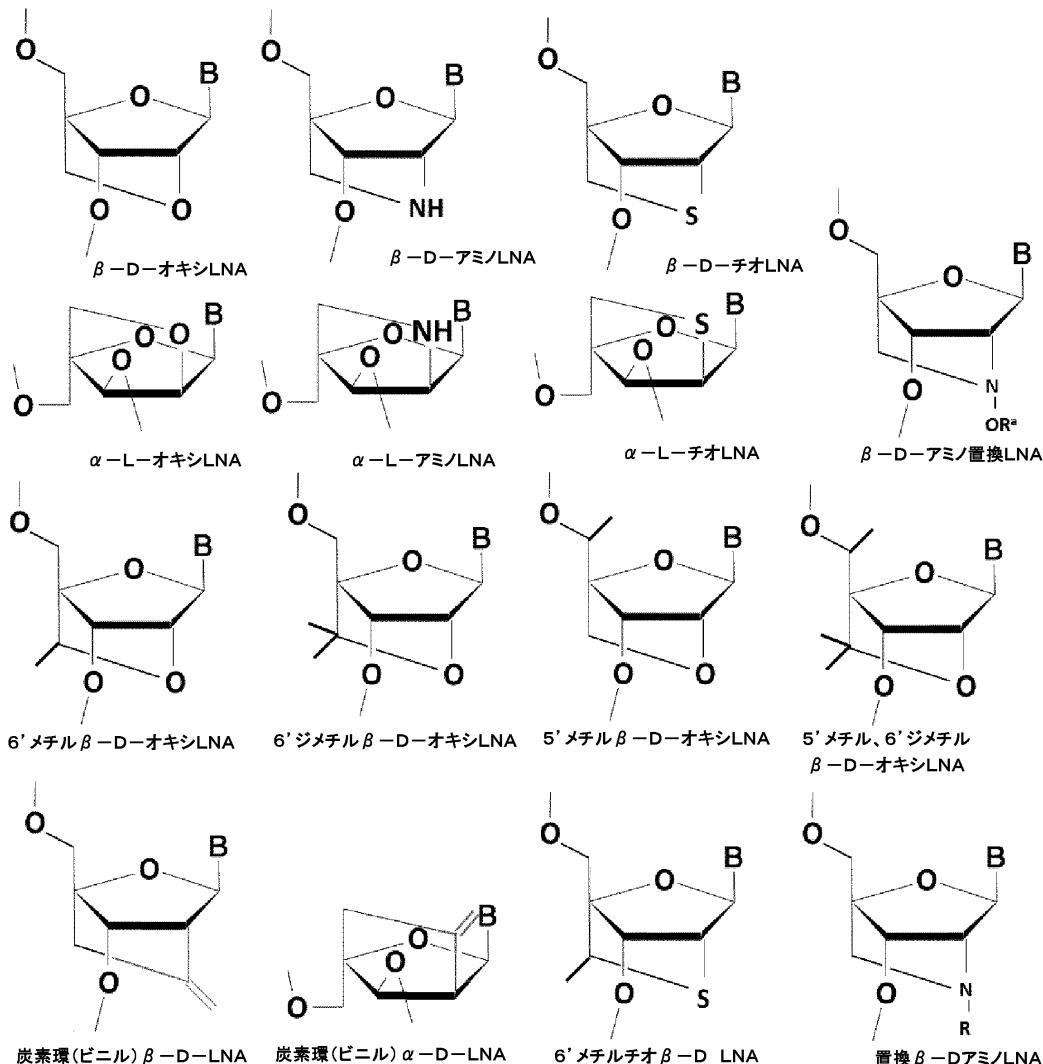
30

40

50

## 【化17】

スキーム1



## 【0157】

実施例において例証するように、本発明の一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド中のLNAヌクレオシドはベータ-D-オキシ-LNAヌクレオシドである。

## 【0158】

ヌクレアーゼ媒介性分解

ヌクレアーゼ媒介性分解は、相補的ヌクレオチド配列の分解を、そのような配列と二本鎖を形成する場合に媒介することが可能であるオリゴヌクレオチドを指す。

## 【0159】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的核酸のヌクレアーゼ媒介性分解を介して機能しうるが、ここで本発明のオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ、特にエンドヌクレアーゼ、好ましくはエンドリボヌクレアーゼ(RNase)、例えばRNase Hなどを動員することが可能である。ヌクレアーゼ媒介性機構を介して作動するオリゴヌクレオチド設計の例は、オリゴヌクレオチドは、典型的には少なくとも5又は6のDNAヌクレオシドの領域を含み、親和性増強ヌクレオシド、例えばギャップマー、ヘッドマー、及びテールマーにより片側又は両側に隣接するオリゴヌクレオチドである。

## 【0160】

RNase H活性及び動員

アンチセンスオリゴヌクレオチドのRNase H活性は、相補的RNA分子との二本

鎖における場合、RNase Hを動員するためのその能力を指す。WO 01 / 23613には、RNase H活性を決定するためのインビトロ方法が提供されており、それは、RNase Hを動員する能力を決定するために使用されうる。典型的には、オリゴヌクレオチドは、相補的な標的核酸配列を伴い提供された場合、テスト中の修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、しかし、DNA单量体だけを含み、オリゴヌクレオチド中の全ての单量体間のホスホロチオエート連結を伴うオリゴヌクレオチドを使用し、WO 01 / 23613の実施例91～95（参照により本明細書により組み入れる）により提供される方法論を使用した場合に決定された初期速度（pmol/l/分で測定される）の少なくとも5%、例えば少なくとも10%又は20%超などを有する場合、RNase Hを動員することが可能であると見なす。

10

#### 【0161】

##### ギャップマー

本明細書中で使用する用語「ギャップマー」は、1つ又は複数の親和性増強修飾ヌクレオシド（隣接又はウイング）を含む領域により5'及び3'が隣接されたRNase H動員オリゴヌクレオチド（ギャップ）の領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。種々のギャップマー設計を本明細書中に記載する。ヘッドマー及びテールマーは、隣接部の1つが欠落している、即ち、オリゴヌクレオチドの末端の1つだけが親和性増強修飾ヌクレオシドを含むRNase Hを動員することが可能なオリゴヌクレオチドである。ヘッドマーについて、3'隣接部が欠落している（即ち、5'隣接部は親和性増強修飾ヌクレオシドを含む）。

20

#### 【0162】

##### LNAギャップマー

用語「LNAギャップマー」は、親和性増強修飾ヌクレオシドの少なくとも1つがLNAヌクレオシドであるギャップマーオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、LNAギャップマー中のLNAヌクレオシドは、ベータ-D-オキシLNAヌクレオシド及び/又は6'メチルベータ-D-オキシLNAヌクレオシド（例えば(S)CETヌクレオシドなど）である。

#### 【0163】

##### 混合ウイングギャップマー

用語「混合ウイングギャップマー」は、隣接領域が少なくとも1つのLNAヌクレオシド及び少なくとも1つの非ヌクレオシド修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも1つのDNAヌクレオシド又は少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシド、例えば2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA(MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロRNA、及び2'-F-ANAヌクレオシドなどを含むLNAギャップマーを指す。一部の実施形態では、混合ウイングギャップマーは、LNAヌクレオシドを含む1つの隣接部（例、5'又は3'）を有し、他の隣接部（それぞれ3'又は5'）は2'置換修飾ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、混合ウイングギャップマー中のLNAヌクレオシドは、ベータ-D-オキシLNAヌクレオシド及び/又は6'メチルベータ-D-オキシLNAヌクレオシド（例えば(S)CETヌクレオシドなど）である。

30

#### 【0164】

##### コンジュゲート

本明細書中で使用する用語「コンジュゲート」は、非ヌクレオチド部分（コンジュゲート部分又は領域Cもしくは第3の領域）に共有結合的に連結されたオリゴヌクレオチドを指す。

40

#### 【0165】

本明細書中で使用する用語「コンジュゲート」は、非ヌクレオチド部分（コンジュゲート部分又は領域Cもしくは第3の領域）に共有結合的に連結されたオリゴヌクレオチドを指す。

#### 【0166】

50

一部の実施形態では、タンパク質（例えば酵素、抗体もしくは抗体断片又はペプチドなど）；親油性部分（例えば脂質、リン脂質、ステロールなど）；ポリマー（例えばポリエチレンギリコール又はポリプロピレンギリコールなど）；受容体リガンド；小分子；レポーター分子；及び非ヌクレオシド糖からなる群より選択される非ヌクレオチド部分。

#### 【0167】

##### リンカー

連結又はリンカーは、1つの化学基又は目的のセグメントを、1つ又は複数の共有結合を介して別の化学基又は目的のセグメントに連結する2つの原子間の接続である。コンジュゲート部分は、オリゴヌクレオチドに直接的に又は連結部分（例、リンカー又はテザー）を通じて付着させることができる。リンカーは、3番目の領域を共有的に接続するのに役立つ（例、オリゴヌクレオチドへのコンジュゲート部分（例、領域A又はCの末端））。

10

#### 【0168】

本発明の一部の実施形態では、本発明のコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは場合により、オリゴヌクレオチドとコンジュゲート部分の間に位置付けられるリンカー領域を含んでもよい。一部の実施形態では、コンジュゲートとオリゴヌクレオチドの間のリンカーは生体切断可能である。

#### 【0169】

哺乳動物の体内で通常遭遇する又は遭遇するものと類似の条件下で開裂可能である生理学的に不安定な結合を含む又はそれからなる生物分解性リンカー。生理学的に不安定なりンカーラーが化学的変換（例、切断）を受ける条件は、化学的条件、例えばpH、温度、酸化もしくは還元条件又は薬剤など、及び哺乳動物細胞中で見出される又は遭遇するものと類似の塩濃度を含む。哺乳動物の細胞内条件はまた、哺乳類細胞中に通常存在する酵素活性（例えばタンパク質分解酵素又は加水分解酵素又はヌクレアーゼなどから）の存在を含む。一実施形態では、生物分解性リンカーラーはS1ヌクレアーゼ切断に感受性である。好ましい実施形態では、ヌクレアーゼ感受性リンカーラーは、1と10の間のヌクレオシド、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10のヌクレオシドなど、より好ましくは2と6の間のヌクレオシド、最も好ましくは少なくとも2つの連続ホスホジエステル連結、例えば少なくとも3つ又は4つ又は5つの連続ホスホジエステル連結などを含む2と4の間の連結ヌクレオシドを含む。好ましくは、ヌクレオシドはDNA又はRNAである。生物分解性リンカーラーを含むホスホジエステルは、WO 2014 / 076195（参照により本明細書により組み入れる）により詳細に記載されており、本明細書中で領域Dとして言及してもよい。

20

#### 【0170】

コンジュゲートはまた、非生物分解性リンカーラーを介してオリゴヌクレオチドに連結してもよく、又は一部の実施形態では、コンジュゲートは、生物分解性リンカーラーに共有結合的に付着された非切断性リンカーラーを含んでもよい。必ずしも生物分解性ではないが、しかし、主にコンジュゲート部分をオリゴヌクレオチド又は生物分解性リンカーラーに共有結合的に接続するのに役立つリンカーラー。そのようなリンカーラーは、反復単位（例えばエチレンギリコール、アミノ酸単位、又はアミノアルキル基など）の鎖構造又はオリゴマーを含んでもよい。一部の実施形態では、リンカーラー（領域Y）は、アミノアルキル、例えばC<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>6アミノアルキル基など（例えば、C<sub>6</sub>からC<sub>12</sub>アミノアルキル基を含む）である。一部の実施形態では、リンカーラー（領域Y）はC<sub>6</sub>アミノアルキル基である。コンジュゲートリンカーラー基はルーチン的には、コンジュゲート基上のアミノ修飾オリゴヌクレオチド及び活性化エステル基の使用を介してオリゴヌクレオチドに付着されうる。

30

#### 【0171】

##### 処置

本明細書中で使用する用語「処置」は、既存の疾患（例、本明細書中で言及する疾患又は障害）の処置、又は疾患の防止（即ち、予防）の両方を指す。従って、本明細書中で言及する処置は、一部の実施形態では予防的でありうることが認識されるであろう。

40

#### 【0172】

50

## 発明の詳細な説明

### 本発明のオリゴヌクレオチド

本発明は、H T R A 1 の発現を阻害することが可能なオリゴヌクレオチドに関する。調節は、H T R A 1 をコードする、又はH T R A 1 の調節において含まれる標的核酸にハイブリダイズすることにより達成されうる。標的核酸は、哺乳動物H T R A 1 配列、例えば配列番号1、2、3、又は4からなる群より選択される配列などでありうる。

#### 【 0 1 7 3 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、H T R A 1 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば哺乳動物H T R A 1 などである。

#### 【 0 1 7 4 】

一部の実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それを阻害又は下方調節することにより標的の発現を調節することが可能である。好ましくは、そのような調節は、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも20%（例えば標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は90%の阻害など）の発現の阻害を產生する。一部の実施形態では、本発明の化合物は、A R P E - 1 9 細胞を使用してインビトロで、H T R A 1 m R N A の発現レベルを少なくとも60%又は70%だけ阻害することが可能でありうる。一部の実施形態では、本発明の化合物は、A R P E - 1 9 細胞を使用してインビトロで、H T R A 1 m R N A の発現レベルを少なくとも60%又は70%だけ阻害することが可能でありうる。一部の実施形態では、本発明の化合物は、A R P E - 1 9 細胞を使用してインビトロで、H T R A 1 タンパク質の発現レベルを少なくとも50%だけ阻害することが可能でありうる。適切には、実施例は、H T R A 1 RNA又はタンパク質阻害を測定するために使用されうるアッセイを提供する。標的調節は、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列と標的核酸の間でのハイブリダイゼーションにより引き起こされる。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドと標的核酸の間でのミスマッチを含む。ミスマッチにもかかわらず、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、H T R A 1 発現の所望の調節を示すのに依然として十分でありうる。ミスマッチに起因する結合親和性の低下は、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド数の増加及び／又はオリゴヌクレオチド配列内に存在する標的への結合親和性を増加させることができ修飾ヌクレオシド（例えばL N Aを含む2'修飾ヌクレオシドなど）数の増加により有利に代償されうる。

#### 【 0 1 7 5 】

本発明の一態様は、H T R A 1 標的配列に対して少なくとも90%の相補性を伴う（例えばH T R A 1 標的配列に完全に相補的であるなど）長さ10～30ヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド（例、配列番号1、2、3 & 4からなる群より選択される核酸）に関する。

#### 【 0 1 7 6 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の領域と少なくとも90%相補的である、例えば少なくとも91%など、例えば少なくとも92%など、例えば少なくとも93%など、例えば少なくとも94%など、例えば少なくとも95%など、例えば少なくとも96%など、少なくとも97%など、例えば少なくとも98%など、又は100%相補的である連続配列を含む。

#### 【 0 1 7 7 】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に完全に相補的（100%相補的）であり、又は一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドと標的核酸の間に1つ又は2つのミスマッチを含みうる。

#### 【 0 1 7 8 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも12ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号119、120、121、122、又は123からなる群より選択される配列の領域に少なくとも90%相補的であり、例えば完全に（又は100%）相補的である。

10

20

30

40

50

**【 0 1 7 9 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 2 4 - 2 3 0 からなる群より選択される配列の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 0 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 6 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 1 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 9 2 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 10

**【 0 1 8 2 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 5 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 3 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 3 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 6 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 20

**【 0 1 8 4 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 3 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 9 2 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 5 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 3 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 5 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 6 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 4 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 3 、 1 1 4 、 1 1 5 、 1 1 6 、 1 1 7 、及び 2 3 1 からなる群より選択される配列に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 30

**【 0 1 8 7 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 4 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 6 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 8 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 4 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 9 2 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 8 9 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 4 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 5 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 40

**【 0 1 9 0 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 5 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 6 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

**【 0 1 9 1 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 5 ヌクレオチドの連 50

続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 9 2 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 1 9 2 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 5 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 5 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 1 9 3 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 1 3 、 1 1 4 、 1 1 5 、 1 1 6 、 1 1 7 、及び 2 3 1 からなる群より選択される配列に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 10

#### 【 0 1 9 4 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 6 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 1 9 5 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 6 、例えば 1 6 、 1 7 、もしくは 1 8 ヌクレオチドなどの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 1 9 2 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 20

#### 【 0 1 9 6 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 2 0 5 の領域に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 1 9 7 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 1 1 3 、 1 1 4 、 1 1 5 、 1 1 6 、 1 1 7 、及び 2 3 1 からなる群より選択される配列からなる群より選択される配列に完全に（又は 1 0 0 %）相補的であり。

#### 【 0 1 9 8 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 1 2 4 ~ 2 3 0 からなる群より選択される配列からなる群より選択される配列に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 30

#### 【 0 1 9 9 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 1 8 6 に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 2 0 0 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 1 9 2 に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 2 0 1 】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 2 0 5 に完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。

#### 【 0 2 0 2 】

オリゴヌクレオチドモチーフ配列は、例えば、ヌクレアーゼ耐性及び／又は標的核酸への結合親和性を増加させるために修飾することができることが理解される。修飾は、定義において及び「オリゴヌクレオチド設計」のセクションにおいて記載している。 40

#### 【 0 2 0 3 】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、標的核酸の領域に完全に相補的（1 0 0 % 相補的）である、又は一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドと標的核酸の間に 1 つ又は 2 つのミスマッチを含みうる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、標的核酸配列に少なくとも 9 0 % 相補的であり、例えば完全に（又は 1 0 0 %）相補的である。 50

**【 0 2 0 4 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 2 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 5 ~ 1 1 1 からなる群より選択される配列に対して 1 0 0 % の同一性を有する。

**【 0 2 0 5 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 4 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 5 ~ 1 1 1 からなる群より選択される配列に対して 1 0 0 % の同一性を有する。

**【 0 2 0 6 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、配列番号 5 ~ 1 1 1 からなる群より選択される配列に対して 1 0 0 % の同一性を有する。 10

**【 0 2 0 7 】**

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、配列番号 5 ~ 1 1 1 より選択される配列を含む、又はそれからなる。

**【 0 2 0 8 】**

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは以下の群より選択する（標的部分配列はオリゴヌクレオチドモチーフの逆相補体であることに注意すること）：

**【表 3】**

配列番号	モチーフ	化合物の設計	標的的部分配列の配列番号	標的的部分配列
5	agttaaaggaggagacaaat	AGTTaaaggaggagacAAAT	124	atttgtctcctcccttaact
6	tcaagttaaaggaggagacaa	TCAgttaaaggaggagaCAA	125	ttgtctcctcccttaactga
7	ctcagttaaaggaggagaca	CTCagttaaaggaggagaCA	126	tgtctcctcccttaactgag
8	ctcagttaaaggaggagac	CTCagttaaaggaggagaGAC	127	gtctcctcccttaactgag
9	actcagttaaaggaggagac	ACTCagttaaaggaggagAC	128	gtctcctcccttaactgagt
10	actcagttaaaggaggaga	ACTCagttaaaggaggagaGA	129	tctcctcccttaactgagt
11	actcagttaaaggaggag	ACtcaagttaaggagaGGAG	130	ctcctcccttaactgagt
12	gatgactcagttaaaggagg	GAtgactcagttaaaggAGG	131	cctcccttaactgagtcatc

10

20

30

40

50

13	atgatgactcagttaaagga	ATGAtgactcagttaaaggGA	132	tcccttaactgagtcatacat
14	tgtatgactcagttaaagg	TGAtgactcagttAAAGG	133	cctttaactgagtcataca
15	gatgatgactcagttaaagg	GAAtgactcagttAAAGG	134	cctttaactgagtcatacatc
16	gatgatgactcagttaaag	GATGatgactcagttAAG	135	ctttaactgagtcatacatc
17	tatcgactgcattatgg	TATcgactgcattatGG	136	ccaactaatgcagtcgata
18	gtatcgactgcattatgg	GtatcgactgcattatGG	137	ccaactaatgcagtcgatac
19	tcgactqcattatgt	TCGActgcattatTTG	138	caactaatgcagtcga
19	tcgactgcattatgt	TCGActgcattatTG	138	caactaatgcagtcga
19	tcgactgcattatgt	TCGActgcattaGTTG	138	caactaatgcagtcga
20	tatcgactgcattatgt	TAtcgactgcattaGTTG	139	caactaatgcagtcgata
21	gtatcgactgcattatgt	GTAtcgactgcattatTG	140	caactaatgcagtcgatac
22	tgtatcgactgcattatgt	TGtatcgactgcattatTG	141	caactaatgcagtcgataca
23	atcgactgcattatgt	ATCgactgcattaGTT	142	aactaatgcagtcgat
23	atcgactgcattatgt	ATCGactgcattAGTT	142	aactaatgcagtcgat
23	atcgactgcattatgt	ATCGactgcattaGTT	142	aactaatgcagtcgat
24	tatcgactgcattatgt	TATCgactgcattaGTT	143	aactaatgcagtcgata
25	gtatcgactgcattatgt	GTATCgactgcattatTT	144	aactaatgcagtcgatac
26	tgtatcgactgcattatgt	TGTatcgactgcattatTT	145	aactaatgcagtcgataca
27	ttgtatcgactgcattatgt	TTGtatcgactgcattatTT	146	aactaatgcagtcgatacaa
28	tatcgactgcattatgt	TATCgactgcattaGT	147	actaatgcagtcgata
28	tatcgactgcattatgt	TATCgactgcattTAGT	147	actaatgcagtcgata
29	gtatcgactgcattatgt	GTATCgactgcattaGT	148	actaatgcagtcgatac
30	tgtatcgactgcattatgt	TGTatcgactgcattaGT	149	actaatgcagtcgataca
31	gtatcgactgcattatgt	GTAtcgactgcattAG	150	ctaattgcagtcgatac
31	gtatcgactgcattatgt	GTAtcgactgcattAG	150	ctaattgcagtcgatac
31	gtatcgactgcattatgt	GTATCgactgcattAG	150	ctaattgcagtcgatac
32	tgtatcgactgcattatgt	TGtatcgactgcattAG	151	ctaattgcagtcgataca
33	ttgtatcgactgcattatgt	TTGtatcgactgcattAG	152	ctaattgcagtcgatacaa
34	attgtatcgactgcattatgt	ATtgatcgactgcattAG	153	ctaattgcagtcgataaat
35	tgtatcgactgcattatgt	TGTatcgactgcattTA	154	taatgcagtcgataca
35	tgtatcgactgcattatgt	TGTatcgactgcATT	154	taatgcagtcgataca
36	attgtatcgactgcattatgt	ATTGtatcgactgcattTA	155	taatgcagtcgataacaat
37	ttgtatcgactgcattatgt	TTGtatcgactgcattT	156	aatgcagtcgatacaa
37	ttgtatcgactgcattatgt	TTGtatcgactgCATT	156	aatgcagtcgatacaa
38	attgtatcgactgcattatgt	ATTgtatcgactgCAT	157	atgcagtcgataacaat
38	attgtatcgactgcattatgt	ATTgtatcgactgCAT	157	atgcagtcgataacaat
38	attgtatcgactgcattatgt	ATTGtatcgactGCAT	157	atgcagtcgataacaat
39	acgcattgtatcgact	ACGcattgtatcgACT	158	agtgcataatgcgt
39	acgcattgtatcgact	ACGCattgtatcGACT	158	agtgcataatgcgt
40	tacgcattgtatcgac	TACgcattgtatcGAC	159	gtcgatacaatgcgt
40	tacgcattgtatcgac	TACGcattgtatCGAC	159	gtcgatacaatgcgt
41	ctacgcattgtatcgac	CTacgcattgtatCGAC	160	gtcgatacaatgcgt
42	tctacgcattgtatcgac	TCTAcgcattgtatcgAC	161	gtcgatacaatgcgt

10

20

30

40

50

43	atctacgcattgtatcgac	ATCtacgcattgtatcgAC	162	gtcgatacaatgcgtagat
44	tatctacgcattgtatcgac	TAtctacgcattgtatCGC	163	gtcgatacaatgcgtagata
45	ctacgcattgtatcg	CTAcgcattgtatCGA	164	tcgatacaatgcgtag
45	ctacgcattgtatcg	CTACGcattgtatTCGA	164	tcgatacaatgcgtag
46	tatctacgcattgtatcg	TAtctacgcattgtatCGA	165	tcgatacaatgcgtagata
47	tctacgcattgtatcg	TCTAcgcattgtatTCG	166	cgatacaatgcgtaga
47	tctacgcattgtatcg	TCTAcgcattgtatCG	166	cgatacaatgcgtaga
47	tctacgcattgtatcg	TCTAcgcattgtATCG	166	cgatacaatgcgtaga
48	atctacgcattgtatcg	ATCTAcgcattgtatTCG	167	cgatacaatgcgtagat
49	tatctacgcattgtatcg	TATCtacgcattgtatCG	168	cgatacaatgcgtagata
50	tctatctacgcattgtatcg	TCtatctacgcattgtatCG	169	cgatacaatgcgtagataga
51	atctacgcattgtatc	ATCtacgcattgtATC	170	gatacaatgcgtagat
51	atctacgcattgtatc	ATCTAcgcattgTATC	170	gatacaatgcgtagat
52	tatctacgcattgtatc	TATctacgcattgTATC	171	gatacaatgcgtagata
53	ctatctacgcattgtatc	CTtatctacgcattgTATC	172	gatacaatgcgtagataga
54	tctatctacgcattgtatc	TCTtatctacgcattgtatC	173	gatacaatgcgtagataga
55	ttctatctacgcattgtatc	TTCTtatctacgcattgtatC	174	gatacaatgcgtagatagaa
56	tatctacgcattgtat	TATctacgcattgTAT	175	atacaatgcgtagata
56	tatctacgcattgtat	TATCtacgcattGTAT	175	atacaatgcgtagata
57	ctatctacgcattgtat	CTAtctacgcattGTAT	176	atacaatgcgtagatag
58	tctatctacgcattgtat	TCtatctacgcattGTAT	177	atacaatgcgtagataga
59	ttctatctacgcattgtat	TTCTtatctacgcattGTAT	178	atacaatgcgtagatagaa
60	ctatctacgcattgtat	CTAtctacgcattGTA	179	tacaatgcgtagataga
60	ctatctacgcattgtat	CTATctacgcattTGTA	179	tacaatgcgtagataga
61	tctatctacgcattgtat	TCTtatctacgcattGTA	180	tacaatgcgtagataga
62	ttctatctacgcattgtat	TTCTtatctacgcattGTA	181	tacaatgcgtagatagaa
63	ttctatctacgcattgt	TTCTtatctacgcattTGT	182	acaatgcgtagatagaa
64	tcttctatctacgcattgt	TCTtctatctacgcattGT	183	acaatgcgtagatagaaga
65	tcttctatctacgcattgt	TtcttctatctacgcattGT	184	acaatgcgtagatagaagaa
66	tcttctatctacgcattg	TTCTtatctacgcattTG	185	caatgcgtagatagaagaa
67	ttctatctacgcattg	TTCTtatctacgcattTG	186	caatgcgtagatagaa
68	tttctatctacgcatt	CTTCTtatctacgcattCATT	187	aatgcgtagatagaag
69	tcttctatctacgcatt	TCTTtatctacgcattCATT	188	aatgcgtagatagaaga
70	tcttctatctacgcatt	TTCTTtatctacgcattATT	189	aatgcgtagatagaagaa
71	tcttctatctacgcatt	TCTTTtatctacgcattCAT	190	atgcgtagatagaaga
72	tcttctatctacgcatt	TTCTTtatctacgcattCAT	191	atgcgtagatagaagaa
73	tttcttctatctacgcatt	CTTCtttatctacgcattCAT	192	atgcgtagatagaagaag
74	tttcttctatctacgcatt	TTCTtttatctacgcattGCA	193	tgcgtagatagaagaa
75	tttcttctatctacgcatt	CTTCtttatctacgcattCA	194	tgcgtagatagaagaag
76	gtttcttctatctacgcatt	GttttcttctatctacgcattCA	195	tgcgtagatagaagaagc
77	tttcttctatctacgcatt	CTttttctatctacgcattACGC	196	gcgttagatagaagaag
78	gtttcttctatctacgcatt	GCTttttctatctacgcattACG	197	cgttagatagaagaagc
79	cgtggggcttcttcta	CGTggggcttcttCTA	198	tagaagaagccccacg

10

20

30

40

50

80	tgacttggagaaaaggcacaa	TGacttggagaaaaggcacAA	199	ttgtgccttcgtccaaagtca
81	ctgacttggagaaaaggcac	Ctgacttggagaaaaggcac	200	gtgccttcgtccaaagtca
82	agagtcatcggtctcc	AGAgcatcggtctcc	201	ggagcacgtactct
83	aagtacttaatagctcaa	AAGTacttaatagctCAA	202	tttagctattaaagtactt
84	aagtacttaatagctcaa	AAGTacttaatagctCAA	203	tttagctattaaagtactt
85	gaagtacttaatagctcaa	GAAGtacttaatagctCAA	204	tttagctattaaagtacttc
86	tacttaatagctcaa	TACTttaatagctCAA	205	tttagctattaaagta
87	aagtacttaatagctca	AAGTacttaatagctCA	206	tgagctattaaagtactt
88	gaagtacttaatagctca	GAAGtacttaatagctCA	207	tgagctattaaagtacttc
89	agaagtacttaatagctc	AGAAgtacttaatagCTC	208	gagctattaaagtacttct
90	aagaagtacttaatagctc	AAGAgtacttaatagCTC	209	gagctattaaagtacttctt
91	gaagtacttaatagct	GAAGtacttaatAGCT	210	agctattaaagtacttc
92	taagaagtacttaatagct	TAAGaagtacttaatAGCT	211	agctattaaagtacttc
93	agaagtacttaatagc	AGAAgtacttaaTAGC	212	gctattaaagtacttct
94	taagaagtacttaatagc	TAAGaagtacttaaTAGC	213	gctattaaagtacttc
95	gtaagaagtacttaatagc	GTaagaagtacttaaTAGC	214	gctattaaagtacttc
96	taagaagtacttaatag	TAAGaagtacttaATAG	215	ctattaaagtacttc
97	gtaagaagtacttaatag	GTAAGaagtacttaATAG	216	ctattaaagtacttc
98	tgttaagaagtacttaatag	TGTAagaagtacttaATAG	217	ctattaaagtacttc
99	aatgtgttaagaagtactt	AATGtgttaagaagtaCTTT	218	aaagtacttacacatt
100	caatgtgttaagaagtactt	CAATGtgttaagaagtaCTTT	219	aaagtacttacacatt
101	atgtgttaagaagtactt	ATGTgttaagaagtACTT	220	aagtacttacacat
102	aatgtgttaagaagtactt	AATGtgttaagaagtACTT	221	aagtacttacacatt
103	caatgtgttaagaagtactt	CAATGtgttaagaagtACTT	222	aagtacttacacatt
104	gcaatgtgttaagaagtactt	GCAtgtgttaagaagtACTT	223	aagtacttacacattgc
105	atgtgttaagaagtact	ATGtgttaagaagtACT	224	agtacttacacat
105	atgtgttaagaagtact	ATGTgttaagaagTACT	224	agtacttacacat
106	gcaatgtgttaagaagtact	GCAAAtgtgttaagaagtACT	225	agtacttacacattgc
107	aatgtgttaagaagtac	AATGtgttaagaaGTAC	226	gtacttacacatt
107	aatgtgttaagaagtac	AATGtgttaagaaGTAC	226	gtacttacacatt
108	caatgtgttaagaagtac	CAATGtgttaagaaGTAC	227	gtacttacacatt
109	gcaatgtgttaagaagtac	GCAAtgtgttaagaaGTAC	228	gtacttacacattgc
110	caatgtgttaagaagta	CAAtgtgttaagaGTA	229	tacttacacatt
110	caatgtgttaagaagta	CAAtgtgttaagaAGTA	229	tacttacacatt
110	caatgtgttaagaagta	CAATGtgttaagaAGTA	229	tacttacacatt
111	gcaatgtgttaagaagta	GCAAtgtgttaagaAGTA	230	tacttacacattgc

又はそのコンジュゲート；化合物の設計と題された欄について、大文字は LNA ヌクレオシドであり、小文字は DNA ヌクレオシドであり、シトシンヌクレオシドは場合により 5 メチルシトシンであり、ヌクレオシド間連結は少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 % 又は 100 % 修飾ヌクレオシド間連結など、例えばホスホロチオエートヌクレオシド間連結などである。一部の実施形態では、上の表中の化合物設計欄中の化合物の全てのヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。モチーフ及び標的部分配列は核酸塩基配列である。

#### 【 0 2 0 9 】

本発明は、以下のオリゴヌクレオチドを提供する：

10

20

30

40

50

【表 4】

CMP ID NO	化合物	
5,1	AGTTaaaggaggagacAAAT	10
6,1	TCAgttaaaggaggagaCAA	
7,1	CTCagttaaaggaggagaCA	
8,1	CTCagttaaaggaggagaGAC	
9,1	ACTCagttaaaggaggagaAC	
10,1	ACTCagttaaaggaggagaGA	
11,1	ACtcagttaaaggagaGGAG	
12,1	GAtgactcagttaaaggAGG	
13,1	ATGAtgactcagttaaaggGA	
14,1	TGAtgactcagttaAAGG	
15,1	GAtgatgactcagttaAAGG	
16,1	GATGatgactcagttaAAG	
17,1	TAT <sup>m</sup> cgactgcatttagttGG	20
18,1	Gtat <sup>m</sup> cgactgcatttagttGG	
19,1	TCGactgcatttagTTG	
19,2	TCGactgcatttagTG	
19,3	TCGActgcatttaGTTG	
20,1	TAt <sup>m</sup> cgactgcatttaGTTG	
21,1	GTAt <sup>m</sup> cgactgcatttagTG	
22,1	TGtat <sup>m</sup> cgactgcatttagTG	
23,1	ATCgactgcatttaGTT	
23,2	ATCGactgcattAGTT	
23,3	ATCGactgcatttaGTT	
24,1	TATCgactgcatttaGTT	30
25,1	GTAT <sup>m</sup> cgactgcatttagTT	
26,1	TGTat <sup>m</sup> cgactgcatttagTT	
27,1	TTGtat <sup>m</sup> cgactgcatttagTT	
28,1	TAT <sup>m</sup> cgactgcatttaGT	
28,2	TATCgactgcattTAGT	
29,1	GTAT <sup>m</sup> cgactgcatttaGT	
30,1	TGTat <sup>m</sup> cgactgcatttaGT	
31,1	GTAt <sup>m</sup> cgactgcattTAG	
31,2	GTAt <sup>m</sup> cgactgcattAG	
31,3	GTAT <sup>m</sup> cgactgcattTAG	
32,1	TGtat <sup>m</sup> cgactgcattTAG	40

33,1	TTGtat <sup>m</sup> cgactgcatTAG	
34,1	ATtgat <sup>m</sup> cgactgcaTTAG	
35,1	TGTat <sup>m</sup> cgactgcaTTA	
35,2	TGTA <sup>m</sup> cgactgcATTa	
36,1	ATTGtat <sup>m</sup> cgactgcaTTA	
37,1	TTGtat <sup>m</sup> cgactgcaTT	
37,2	TTGtat <sup>m</sup> cgactgCATT	
38,1	ATTgtat <sup>m</sup> cgactgCAT	
38,2	ATTgtat <sup>m</sup> cgactgcAT	
38,3	ATTGtat <sup>m</sup> cgactGCAT	
39,1	ACGcattgtat <sup>m</sup> cgACT	
39,2	ACGCattgtat <sup>m</sup> cGACT	
40,1	TACgcattgtat <sup>m</sup> cGAC	
40,2	TACGcattgtatCGAC	
41,1	CTa <sup>m</sup> cgcattgtatCGAC	
42,1	TCTA <sup>m</sup> cgcattgtat <sup>m</sup> cgAC	
43,1	ATCta <sup>m</sup> cgcattgtat <sup>m</sup> cgAC	
44,1	TAtcta <sup>m</sup> cgcattgtatcGAC	
45,1	CTA <sup>m</sup> cgcattgtatCGA	
45,2	CTACgcattgtatTCGA	
46,1	TATcta <sup>m</sup> cgcattgtatCGA	
47,1	TCTa <sup>m</sup> cgcattgtatTCG	
47,2	TCTa <sup>m</sup> cgcattgtatCG	
47,3	TCTA <sup>m</sup> cgcatttgtATCG	
48,1	ATCTa <sup>m</sup> cgcattgtatTCG	
49,1	TATCta <sup>m</sup> cgcattgtatCG	
50,1	TCtatcta <sup>m</sup> cgcattgtatCG	
51,1	ATCta <sup>m</sup> cgcatgttATC	
51,2	ATCTa <sup>m</sup> cgcatggTATC	
52,1	TATcta <sup>m</sup> cgcatggTATC	
53,1	CTatcta <sup>m</sup> cgcatggTATC	
54,1	TCTatcta <sup>m</sup> cgcatgttATC	
55,1	TTCatatcta <sup>m</sup> cgcatgttATC	
56,1	TATcta <sup>m</sup> cgcatggTAT	
56,2	TATCTa <sup>m</sup> cgcatGGTAT	
57,1	CTAtcta <sup>m</sup> cgcatGGTAT	
58,1	TCtatcta <sup>m</sup> cgcatGGTAT	
59,1	TTCatatcta <sup>m</sup> cgcatggTAT	
60,1	CTAtcta <sup>m</sup> cgcatGTA	
60,2	CTATCTa <sup>m</sup> cgcatGTa	
61,1	TCTatcta <sup>m</sup> cgcatGGTA	
62,1	TTCatatcta <sup>m</sup> cgcatGGTA	
63,1	TTCatatcta <sup>m</sup> cgcatTGT	

10

20

30

40

50

64,1	TCtttatcta <sup>m</sup> cgattGT	
65,1	Ttcttatcta <sup>m</sup> cgattGT	
66,1	TTCtttatcta <sup>m</sup> cgcatTG	
67,1	TTCtatcta <sup>m</sup> cgaTTG	
68,1	CTTCtatcta <sup>m</sup> cgCATT	
69,1	TCTtatcta <sup>m</sup> cgCATT	
70,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgcATT	
71,1	TCTTtatcta <sup>m</sup> cgCAT	
72,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgCAT	
73,1	CTTCtttatcta <sup>m</sup> cgCAT	10
74,1	TTCtttatctacGCA	
75,1	CTTCtttatcta <sup>m</sup> cgCA	
76,1	Gcttcattatcta <sup>m</sup> cgCA	
77,1	CTtcttatctACGC	
78,1	GCTtcttatctACG	
79,1	CGTggggcttCTA	
80,1	TGacttggagaaaaggcacAA	
81,1	CtgacttggagaaaaggcAC	
82,1	AGAgtcat <sup>m</sup> cggtgcTCC	
83,1	AAGTacttaatagctCAAA	
84,1	AAGTacttaatagcTCAA	20
85,1	GAAGTacttaatagctCAA	
86,1	TACTtaatagcTCAA	
87,1	AAGTacttaatagcTCA	
88,1	GAAGTacttaatagcTCA	
89,1	AGAAgtacttaatagCTC	
90,1	AAAGAgtacttaatagCTC	
91,1	GAAGTacttaatAGCT	
92,1	TAAGaagtacttaatAGCT	
93,1	AGAAgtacttaatAGC	
94,1	TAAGAgtacttaatAGC	
95,1	GTaaaagtacttaatAGC	30
96,1	TAAGAgtacttaATAG	
97,1	GTAAGaagtacttaATAG	
98,1	TGTAAGaagtacttaATAG	
99,1	AATGtgaagaagtaCTTT	
100,1	CAATgtgaagaagtaCTTT	
101,1	ATGTgtgaagaagtACTT	
102,1	AATGtgaagaagtACTT	
103,1	CAATgtgaagaagtACTT	
104,1	GCatgtgaagaagtACTT	
105,1	ATGtgaagaagtACT	
105,2	ATGTgtgaagaagTACT	40

106,1	GCAA <del>tgtgtaagaagt</del> ACT
107,1	AATG <del>tgtgtaagaa</del> GTAC
107,2	AAT <del>tgtgtaagaa</del> GTAC
108,1	CAAT <del>tgtgtaagaa</del> GTAC
109,1	GCAat <del>tgtgtaagaa</del> GTAC
110,1	CAAt <del>tgtgtaagaa</del> GTA
110,2	CAAt <del>tgtgtaaga</del> AGTA
110,3	CAAT <del>tgtgtaaga</del> AGTA
111,1	GCAat <del>tgtgtaaga</del> AGTA

10

又はそのコンジュゲート；それにおいて上の表の化合物において、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、全てのLNAシトシンは5-メチルシトシン（上付き文字mにより示す）であり、小文字はDNAヌクレオシドを表し、小文字cの前の上付き文字mは5メチルシトシンDNAヌクレオシドを表す。全てのヌクレオシド間連結がホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

#### 【0210】

##### オリゴヌクレオチド設計

オリゴヌクレオチド設計は、オリゴヌクレオチド配列におけるヌクレオシド糖修飾のパターンを指す。本発明のオリゴヌクレオチドは糖修飾ヌクレオシドを含み、DNA又はRNAヌクレオシドも含みうる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは糖修飾ヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。本発明のオリゴヌクレオチド中への修飾ヌクレオシドの組み入れによって、標的核酸についてのオリゴヌクレオチドの親和性が増強しうる。その場合において、修飾ヌクレオシドは、親和性増強修飾ヌクレオチドとして言及することができる。

20

#### 【0211】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、又は少なくとも16の修飾ヌクレオシドなどを含む。一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1~10の修飾ヌクレオシド、例えば2~9の修飾ヌクレオシドなど、例えば3~8の修飾ヌクレオシドなど、例えば4~7の修飾ヌクレオシドなど、例えば6又は7の修飾ヌクレオシドなどを含む。一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、これら3種類の修飾（修飾糖、修飾核酸塩基、及び修飾ヌクレオシド間連結）又はそれらの組み合わせより独立して選択される修飾を含みうる。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドなどを含む。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、及びLNAヌクレオシドからなる群より独立して選択される1つ又は複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む。さらにより好ましくは、1つ又は複数の修飾ヌクレオシドはLNAである。

30

#### 【0212】

一部の実施形態では、修飾ヌクレオシドの少なくとも1つはロックド核酸(LNA)であり、修飾ヌクレオシドの例えば少なくとも2など、例えば少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つはLNAである。さらなる実施形態では、全ての修飾ヌクレオシドはLNAである。

40

#### 【0213】

さらなる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間

50

連結を含む。好ましい実施形態では、連続ヌクレオチド配列内のヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエート又はボラノホスフェートのヌクレオシド間連結である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列中の全てのヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート連結である。

#### 【0214】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、2' - M O E - R N A である少なくとも1つの修飾ヌクレオシド、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の2' - M O E - R N A ヌクレオシド単位などを含む。一部の実施形態では、前記修飾ヌクレオシドの少なくとも1つが2' - フルオロD N A、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の2' - フルオロ-D N A ヌクレオシド単位などである。

10

#### 【0215】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのL N A 単位、例えば1、2、3、4、5、6、7、又は8のL N A 単位など、例えば2~6のL N A 単位など、例えば3~7のL N A 単位など、4~8のL N A 単位、又は3、4、5、6、もしくは7のL N A 単位を含む。一部の実施形態では、全ての修飾ヌクレオシドはL N A ヌクレオシドである。一部の実施形態では、全てのL N A シトシン単位は5 - メチル - シトシンである。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド領域は、ヌクレオチド配列の5' 末端に少なくとも1つのL N A 単位及び3' 末端に少なくとも2つのL N A ユニットを有する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド中に存在する全てのシトシン核酸塩基は、5 - メチル - シトシンである。

20

#### 【0216】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは少なくとも1つのL N A 単位及び少なくとも1つの2' 置換修飾ヌクレオシドを含む。

#### 【0217】

本発明の一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは2' 糖修飾ヌクレオシド及びD N A 単位の両方を含む。

#### 【0218】

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

#### 【0219】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド領域はギャップマーオリゴヌクレオチドである。

30

#### 【0220】

##### ギャップマー設計

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、本明細書中で単に「ギャップマー」としても言及されるギャップマー設計又は構造を有する。ギャップマー構造では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも3つの異なる構造領域、5' - 隣接部、ギャップ、及び3' - 隣接部、F - G - F' を「5 - > 3」方向に含む。この設計において、隣接領域F 及びF' ( ウィング領域とも呼ぶ ) は、領域G に隣接する少なくとも1つの糖修飾ヌクレオシドを含み、一部の実施形態では、2~7の糖修飾ヌクレオシドの連続ストレッチ、又は糖修飾及びD N A ヌクレオシドの連続ストレッチ( 糖修飾及びD N A ヌクレオシドの両方を含む混合ウィング ) を含みうる。結果的に、ギャップ領域に隣接する5' 隣接領域及び3' 隣接領域のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシド( 例えば2' 修飾ヌクレオシドなど ) である。ギャップ領域G は、オリゴヌクレオチドがH T R A 1 標的核酸との二本鎖中にある場合、R N a s e H を動員することが可能である連続ヌクレオチドのストレッチを含む。一部の実施形態では、領域G は、5~16のD N A ヌクレオシドの連続ストレッチを含む。ギャップマー領域F - G - F' はH T R A 1 標的核酸に相補的であり、従って、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド領域でありうる。

40

#### 【0221】

領域F 及びF' は、領域G の5' 及び3' 末端に隣接し、1つ又は複数の親和性増強修飾又

50

クレオシドを含みうる。一部の実施形態では、3'隣接部は、少なくとも1つのLNA又クレオシド、好ましくは少なくとも2つのLNA又クレオシドを含む。一部の実施形態では、5'隣接部は、少なくとも1つのLNA又クレオシドを含む。一部の実施形態では、5'及び3'隣接領域の両方がLNA又クレオシドを含む。一部の実施形態では、隣接領域中の全ての又クレオシドがLNA又クレオシドである。他の実施形態では、隣接領域は、LNA又クレオシド及び他の又クレオシド(混合隣接部)の両方、例えばDNA又クレオシド及び/又は非LNA修飾又クレオシドなど、例えば2'置換又クレオシドなどを含みうる。この場合には、ギャップは、親和性増強修飾又クレオシド、例えばLNAなど(例えばベータ-D-オキシ-LNAなど)により5'及び3'末端で隣接する少なくとも5つのRNase H動員又クレオシド(例えば5~16のDNA又クレオシドなど)の連続配列として定義する。

## 【0222】

## 領域F

領域Gの'5末端に付着した領域F(5'隣接部又は5'ウイング)は、少なくとも1つの糖修飾又クレオシド、例えば少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7の修飾又クレオシドなどを含む、含有する、又はそれからなる。一部の実施形態では、領域Fは、1~7の修飾又クレオシド、例えば2~6の修飾又クレオシドなど、例えば2~5の修飾又クレオシドなど、例えば2~4の修飾又クレオシドなど、例えば1~3の修飾又クレオシドなど、例えば1、2、3、又は4の修飾又クレオシドなどを含む、又はそれらからなる。

## 【0223】

一実施形態では、領域F中の修飾又クレオシドの1つ又は複数あるいは全てが、2'修飾又クレオシドである。

## 【0224】

さらなる実施形態では、領域F中の2'修飾又クレオシドの1つ又は複数は、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-O-メチル-RNA、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-アルコキシ-RNA、MOE単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位、及び2'-フルオロ-ANA単位より選択する。

## 【0225】

本発明の一実施形態では、領域F中の全ての修飾又クレオシドはLNA又クレオシドである。さらなる実施形態では、領域F中のLNA又クレオシドは、ベータ-Dもしくはアルファ-L配置のいずれか又はそれらの組み合わせにおいて、オキシ-LNA、チオ-LNA、アミノ-LNA、cET、及び/又はENAからなる群より独立して選択する。好ましい実施形態では、領域Fは、連続配列の5'末端に少なくとも1つのベータ-D-オキシLNA単位を有する。

## 【0226】

## 領域G

領域G(ギャップ領域)は、RNase Hを動員することが可能な5~16の連続DNA又クレオシドを含む、含有する、又はそれからなる。さらなる実施形態では、領域Gは、RNase Hを動員することが可能である5~12、又は6~10、又は7~9、例えば8つなどの連続又クレオチド単位を含む、含有する、又はそれらからなる。

## 【0227】

さらなる実施形態では、領域G中の少なくとも1つの又クレオシド単位は、DNA又クレオシド単位、例えば4~20又は6~18のDNA単位、例えば5~16などである。一部の実施形態では、領域Gの又クレオシドの全てがDNA単位である。

## 【0228】

さらなる実施形態では、領域Gは、DNAと、RNase H切断を媒介することが可能な他の又クレオシドとの混合物からなりうる。一部の実施形態では、領域Gの又クレオシドの少なくとも50%がDNA、例えば少なくとも60%、少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%のDNAなどである。

10

20

30

40

50

## 【0229】

領域 F '

領域 G の' 3 末端に付着した領域 F ' (3' 隣接部又は 3' ウィング) は、少なくとも 1 つの糖修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7 の修飾ヌクレオシドなどを含む、含有する、又はそれからなる。一部の実施形態では、領域 F ' は、1 ~ 7 の修飾ヌクレオシド、例えば 2 ~ 6 の修飾ヌクレオシドなど、例えば 2 ~ 5 の修飾ヌクレオシドなど、例えば 2 ~ 4 の修飾ヌクレオシドなど、例えば 1 ~ 3 の修飾ヌクレオシドなど、例えば 1、2、3、又は 4 の修飾ヌクレオシドなどを含む、又はそれらからなる。

## 【0230】

10

一実施形態では、領域 F ' 中の修飾ヌクレオシドの 1 つ又は複数あるいは全てが、2' 修飾ヌクレオシドである。

## 【0231】

さらなる実施形態では、領域 F ' 中の 2' 修飾ヌクレオシドの 1 つ又は複数は、2' - O - アルキル - RNA 単位、2' - O - メチル - RNA、2' - アミノ - DNA 単位、2' - フルオロ DNA 単位、2' - アルコキシ RNA、MOE 単位、LNA 単位、アラビノ核酸 (ANA) 単位、及び 2' - フルオロ - ANA 単位より選択する。

## 【0232】

本発明の一実施形態では、領域 F ' 中の全ての修飾ヌクレオシドは LNA ヌクレオシドである。さらなる実施形態では、領域 F ' 中の LNA ヌクレオシドは、ベータ - D もしくはアルファ - L 配置のいずれか又はそれらの組み合わせにおいて、オキシ - LNA、チオ - LNA、アミノ - LNA、cET、及び / 又は ENA からなる群より独立して選択する。好み深い実施形態では、領域 F ' は、連続配列の 5' 末端に少なくとも 1 つのベータ - D - オキシ LNA 単位を有する。

## 【0233】

領域 D、D'、及び D''

本発明のオリゴヌクレオチドは、標的核酸に相補的である連続ヌクレオチド領域を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書において領域 D として言及する連続ヌクレオチド領域の 5' 及び / 又は 3' に位置付けられる追加のヌクレオチドをさらに含みうる。領域 D' 及び D'' は、それぞれ領域 F の 5' 末端又は領域 F ' の 3' 末端に付着させることができる。D 領域 (領域 D' 又は D'') は、一部の実施形態では、標的核酸に相補的である連続ヌクレオチド配列の部分を形成しうる、又は他の実施形態では、D 領域は標的核酸に非相補的でありうる。

## 【0234】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド領域、及び場合により 1 ~ 5 の追加の 5' ヌクレオチド (領域 D') からなる、又はそれを含む。

## 【0235】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド領域、及び場合により 1 ~ 5 の追加の 3' ヌクレオチド (領域 D'') からなる、又はそれを含む。

## 【0236】

領域 D' 又は D'' は、標的核酸に相補的又は非相補的でありうる 1、2、3、4、又は 5 の追加のヌクレオチドを独立して含みうる。この点において、本発明のオリゴヌクレオチドは、一部の実施形態では、追加のヌクレオチドにより 5' 及び / 又は 3' 末端で隣接される標的を調節することが可能である連続ヌクレオチド配列を含みうる。そのような追加のヌクレオチドは、ヌクレアーゼ感受性の生物分解性リンカーとしての役割を果たしうるが、従って、官能基 (例えばコンジュゲート部分など) を本発明のオリゴヌクレオチドに付着させるために使用されうる。一部の実施形態では、追加の 5' 及び / 又は 3' 末端ヌクレオチドを、ホスホジエステル連結を用いて連結し、DNA 又は RNA でありうる。別の実施形態では、追加の 5' 及び / 又は 3' 末端ヌクレオチドは、例えば、ヌクレアーゼ安定性を増強するため、又は合成の容易さのために含まれうる修飾ヌクレオチドである。一部の

40

50

実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド領域に加えて領域D'及び/又はD''を含む。

#### 【0237】

一部の実施形態では、本発明のギャップマーオリゴヌクレオチドは、以下の式により表すことができる：

F - G - F' ; 特に  $F_1 - 7 - G_{4-12} - F'_{1-7}$

D' - F - G - F' 、特に  $D'_{1-3} - F_{1-7} - G_{4-12} - F'_{1-7}$

F - G - F' - D'' 、特に  $F_7 - G_{4-12} - F'_{1-7} - D''_{1'-3}$

D' - F - G - F' - D'' 、特に  $D'_{1-3} - F_{1-7} - G_{4-12} - F'_{1-7} - D''_{1'-3}$

#### 【0238】

##### 製造の方法

さらなる態様では、本発明は、ヌクレオチド単位を反応させ、それによりオリゴヌクレオチド中に含まれる共有結合的に連結された連続ヌクレオチド単位を形成することを含む、本発明のオリゴヌクレオチドの製造のための方法を提供する。好ましくは、この方法ではホスホラミダイト化学を使用する（例えば、Caruthers et al, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, pages 287-313を参照のこと）。さらなる実施形態では、この方法は、連続ヌクレオチド配列をコンジュゲート部分（リガンド）と反応させることをさらに含む。さらなる態様では、本発明のオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートオリゴヌクレオチドを医薬的に許容可能な希釈剤、溶媒、担体、塩及び/又はアジュバントと混合することを含む、本発明の組成物を製造するための方法を提供する。

#### 【0239】

##### 医薬的塩

治療薬としての使用のために、本発明のオリゴヌクレオチドは、適切な医薬的塩（例えばナトリウム又はカリウム塩など）として提供してもよい。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドはナトリウム塩である。

#### 【0240】

##### 医薬的組成物

さらなる態様では、本発明は、上記のオリゴヌクレオチド及び/又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートのいずれか、ならびに医薬的に許容可能な希釈剤、担体、塩及び/又はアジュバントを含む医薬的組成物を提供する。医薬的に許容可能な希釈剤は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含み、医薬的に許容可能な塩は、ナトリウム塩及びカリウム塩を含むが、これらに限定しない。一部の実施形態では、医薬的に許容可能な希釈剤は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、50～300 μM溶液の濃度で医薬的に許容可能な希釈剤中で使用する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、10～1000 μgの用量で投与する。

#### 【0241】

WO 2007 / 031091では、医薬的に許容可能な希釈剤、担体、及びアジュバントの適切で好ましい例が提供されている（参照により本明細書により組み入れる）。適切な投与量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療薬剤との組み合わせ、プロドラッグ製剤もWO 2007 / 031091において提供されている。

#### 【0242】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、医薬的組成物又は製剤の調製のために医薬的に許容可能な活性又は不活性物質と混合してもよい。医薬的組成物の製剤化のための組成及び方法は、多くの基準（投与経路、疾患の程度、又は投与される用量を含むがこれらに限定しない）に依存的である。

#### 【0243】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートはプロドラッグである。特に、オリゴヌクレオチドコンジュゲートについて、コンジュゲート部分は、一度プロドラッグが作用部位（例、標的細胞）に送達されると、オリゴヌクレオチドが切断される。

10

20

30

40

50

**【 0 2 4 4 】****適用**

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

**【 0 2 4 5 】**

研究では、そのようなオリゴヌクレオチドを使用し、細胞（例、インビトロ細胞培養）及び実験動物において H T R A 1 タンパク質の合成を特異的に調節し、それにより標的の機能分析又は治療的介入のための標的としてのその有用性の評価を促進しうる。典型的には、標的調節は、タンパク質を産生する m R N A を分解又は阻害することにより達成し、それによりタンパク質形成を防止する、タンパク質を産生する遺伝子又は m R N A のミュレーターを分解又は阻害する。

10

**【 0 2 4 6 】**

診断では、オリゴヌクレオチドを使用し、ノーザンプロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、又は同様の技術により、細胞及び組織中での H T R A 1 発現を検出及び定量化しうる。

**【 0 2 4 7 】**

治療のために、H T R A 1 の発現を調節することにより処置することができる疾患又は障害を有する疑いのある動物又はヒト。

**【 0 2 4 8 】**

本発明は、本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬的組成物の治療的又は予防的有効量を疾患に罹患している又は感受性である被験者に投与することを含む、疾患を処置又は防止するための方法を提供する。

20

**【 0 2 4 9 】**

本発明はまた、医薬としての使用のための本明細書中で定義するオリゴヌクレオチド、組成物、又はコンジュゲートに関する。

**【 0 2 5 0 】**

本発明に従ったオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬的組成物は、典型的には有効量で投与する。

**【 0 2 5 1 】**

本発明はまた、本明細書中で言及する障害の処置のための医薬の製造について、又は本明細書中で言及する障害としての処置の方法について記載する本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートの使用を提供する。

30

**【 0 2 5 2 】**

疾患又は障害は、本明細書中で言及するように、H T R A 1 の発現に関連付けられる。一部の実施形態では、疾患又は障害は、H T R A 1 遺伝子、又はそのタンパク質産物が H T R A 1 に関連付けられる、もしくは相互作用する遺伝子における変異に関連付けられる。従って、一部の実施形態では、標的核酸は H T R A 1 配列の変異形態であり、他の実施形態では、標的核酸は H T R A 1 配列の調節因子である。

**【 0 2 5 3 】**

本発明の方法は、好ましくは、H T R A 1 の異常なレベル及び／又は活性により起こされる疾患に対する処置又は予防のために用いる。

40

**【 0 2 5 4 】**

本発明はさらに、H T R A 1 の異常なレベル及び／又は活性の処置のための医薬の製造のための、本明細書中で定義するオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬的組成物の使用に関する。

**【 0 2 5 5 】**

一実施形態では、本発明は、眼障害、例えば黄斑変性症（加齢黄斑変性症（A M D）、例えば乾燥型 A M D 又は湿潤型 A M Dなどを含む）など、及び糖尿病性網膜症より選択される疾患又は障害の処置における使用のためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬的組成物に関する。一部の実施形態では、本発明のオリゴヌク

50

レオチドコンジュゲート又は医薬的組成物は、地図状萎縮又は中間 d A M D の処置における使用のためありうる。H T R A 1 はまた、アルツハイマー病及びパーキンソン病において適応されており、従って、一部の実施形態では、本発明のオリゴスクレオチドコンジュゲート又は医薬的組成物は、アルツハイマー病又はパーキンソン病の処置における使用のためありうる。H T R A 1 はまた、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、関節炎（例えば変形性関節症など）、家族性虚血性脳小血管疾患において適応されており、従って、一部の実施形態では、本発明のオリゴスクレオチドコンジュゲート又は医薬的組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、関節炎（例えば変形性関節症など）、又は家族性虚血性脳小血管疾患の処置における使用のためありうる。

#### 【 0 2 5 6 】

##### 投与

本発明のオリゴスクレオチド又は医薬的組成物は、局所（例えば皮膚、吸入、眼、又は耳など）又は経腸（例えば経口又は胃腸管を通じてなど）又は非経口（例えば静脈内、皮下、筋肉内、脳内、脳室内、又は髄腔内など）投与しうる。

#### 【 0 2 5 7 】

一部の実施形態では、本発明のオリゴスクレオチド、コンジュゲート、又は医薬的組成物は、非経口経路（静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、又は筋肉内注射もしくは注入、くも膜下腔内又は頭蓋内（例、脳内又は脳室内）投与を含む）により投与する。一部の実施形態では、活性オリゴスクレオチド又はオリゴスクレオチドコンジュゲートは静脈内投与する。別の実施形態では、活性オリゴスクレオチド又はオリゴスクレオチドコンジュゲートは皮下投与する。

#### 【 0 2 5 8 】

眼障害、例えば黄斑変性症など（例、A M D（湿潤型又は乾燥型））を処置する際での使用のために、眼内注射を使用してもよい。

#### 【 0 2 5 9 】

一部の実施形態では、本発明の化合物、又はその医薬的に許容可能な塩は、眼内注射を介して、眼当たり約 $1\text{0 }\mu\text{g}$ ～約 $2\text{0}\text{0 }\mu\text{g}$ 、例えば眼当たり約 $5\text{0 }\mu\text{g}$ ～約 $1\text{5}\text{0 }\mu\text{g}$ など、例えば眼当たり約 $1\text{0}\text{0 }\mu\text{g}$ などの用量で投与する。一部の実施形態では、投与間隔、即ち、連続投与間の期間は、少なくとも1ヶ月1回、例えば少なくとも2ヶ月に1回、又は少なくとも3ヶ月に1回である。

#### 【 0 2 6 0 】

##### 併用療法

一部の実施形態では、本発明のオリゴスクレオチド、オリゴスクレオチドコンジュゲート、又は医薬的組成物は、別の治療薬剤との併用処置における使用のためである。治療薬剤は、例えば、上に記載する疾患又は障害のための標準治療でありうる。

#### 【 0 2 6 1 】

##### 実施例

##### 材料及び方法

##### オリゴスクレオチド合成

オリゴスクレオチド合成は、当技術分野において一般的に公知である。以下は適用されるプロトコールである。本発明のオリゴスクレオチドは、使用される装置、支持体、及び濃度に関してわずかに変動する方法により製造されていたであろう。

#### 【 0 2 6 2 】

オリゴスクレオチドは、 $1\text{ }\mu\text{mole}$ スケールのO l i g o m a k e r 4 8でのホスホルアミダイトアプローチを使用し、ウリジンユニバーサル支持体上で合成する。合成の終了時、オリゴスクレオチドを、60℃で5～16時間にわたりアンモニア水を使用して固体支持体から切断する。オリゴスクレオチドを逆相H P L C (R P - H P L C)により又は固相抽出により精製し、U P L C により特徴付けし、分子量をE S I - M S によりさらに確認する。

#### 【 0 2 6 3 】

10

20

30

40

50

### オリゴヌクレオチドの伸長 :

- シアノエチル - ホスホラミダイト (DNA - A (Bz)、DNA - G (ibu)、DNA - C (Bz)、DNA - T、LNA - 5 - メチル - C (Bz)、LNA - A (Bz)、LNA - G (dmf)、LNA - T) の共役を、アセトニトリル中の 0.1M の 5' - O - DMT 保護アミダイト及びアセトニトリル (0.25M) 中の DCI (4,5 - ジシアノイミダゾール) (アクティベーターとして) の溶液を使用して実施する。最終サイクルについては、所望の修飾を伴うホスホルアミダイトを使用することができる (例、コンジュゲート基又はコンジュゲート基自体を付着させるための C6 リンカー)。ホスホロチオエート連結の導入のためのチオール化は、キサンタン水素化物 (アセトニトリル / ピリジン 9 : 1 中 0.01M) を使用して行う。ホスホジエステル (phosphordiester) 連結を、THF / ピリジン / 水 7 : 2 : 1 中の 0.02M ヨウ素を使用して導入することができる。試薬の残りは、オリゴヌクレオチド合成のために典型的に使用されるものである。

#### 【0264】

固相合成後のコンジュゲーションについては、市販の C6 アミノリンカーホルホラミダイト (phorphoramidite) を固相合成の最後のサイクルにおいて使用することができ、脱保護及び固体支持体からの切断後、アミノ連結された脱保護オリゴヌクレオチドを単離する。コンジュゲートを、標準的な合成方法を使用して官能基の活性化を介して導入する。

#### 【0265】

##### RP - HPLC による精製 :

粗化合物を、Phenomenex Jupiter C18 10 μ 150 × 10 mm カラムでの分取 RP - HPLC により精製する。0.1M 酢酸アンモニウム (pH 8) 及びアセトニトリルを、5 mL/分の流速で緩衝液として使用する。収集した画分を凍結乾燥し、典型的には白色固体として精製化合物を与える。

#### 【0266】

##### 略語 :

DCI : 4,5 - ジシアノイミダゾール

DCM : ジクロロメタン

D MF : ジメチルホルムアミド

DMT : 4,4' - ジメトキシトリチル

THF : テトラヒドロフラン

Bz : ベンゾイル

iPr : イソブチリル

RP - HPLC : 逆相高速液体クロマトグラフィー

#### 【0267】

##### Tm アッセイ :

オリゴヌクレオチド及び RNA 標的 (リン酸連結、PO) 二本鎖を 500 ml の RNase フリー水中で 3 mM に希釈し、500 ml の 2 × Tm 緩衝液 (200 mM NaCl、0.2 mM EDTA、20 mM Na リン酸、pH 7.0) と混合する。溶液を 3 分間にわたり 95 °C に加熱し、次に室温で 30 分間にわたりアニールする。二重融解温度 (Tm) を、PE Templab ソフトウェア (Perkin Elmer) を使用し、ペルチェ温度プログラマー PTP 6 を備えた Lambda 40 UV/VIS 分光光度計で測定する。温度を 20 °C から 95 °C に上昇させ、次に 25 °C に下落させ、260 nm での吸収を記録する。融解及びアニーリングの両方の 1 次導関数及び局所最大値を使用して二本鎖 Tm を評価する。

#### 【0268】

##### 使用するオリゴヌクレオチド :

10

20

30

40

50

【表 5】

配列番号	モチーフ	CMP ID NO	化合物
5	agttaaaggaggagacaaat	5,1	AGTTaaaggaggagacAAAT
6	tcatgttaaaggaggagacaa	6,1	TCAgttaaaggaggagaCAA
7	ctcagttaaaggaggagaca	7,1	CTCagttaaaggaggagaCA
8	ctcagttaaaggaggagac	8,1	CTCagttaaaggaggagaGAC
9	actcagttaaaggaggagac	9,1	ACTCagttaaaggaggagaAC
10	actcagttaaaggaggaga	10,1	ACTCagttaaaggaggagaGA
11	actcagttaaaggaggag	11,1	ACtcatgttaaaggagaGGAG
12	gatgactcagttaaaggagg	12,1	GAtgactcagttaaaggAGG
13	atgatgactcagttaaagg	13,1	ATGAtgactcagttaaaggGA
14	tgatgactcagttaaagg	14,1	TGAtgactcagttaaaggAGG
15	gatgatgactcagttaaagg	15,1	GAtgatgactcagttaaaggAGG
16	gatgatgactcagttaaag	16,1	GATGAtgactcagttaaaggAAG
17	tatcgactgcattagttgg	17,1	TAT <sup>m</sup> cgactgcattagttGG
18	gtatcgactgcattagttgg	18,1	Gtat <sup>m</sup> cgactgcattagttGG
19	tcgactgcattagttg	19,1	TCGactgcattagTTG
19	tcgactgcattagttg	19,2	TCGactgcattagTG
19	tcgactgcattagttg	19,3	TCGActgcattaGTTG
20	tatcgactgcattagttg	20,1	TAt <sup>m</sup> cgactgcattaGTTG
21	gtatcgactgcattagttg	21,1	GTAt <sup>m</sup> cgactgcattagTG
22	tgtatcgactgcattagttg	22,1	TGtat <sup>m</sup> cgactgcattagTG

10

20

30

40

50

23	atcgactgcattagtt	23,1	ATCgactgcattaGTT
23	atcgactgcattagtt	23,2	ATCGactgcattAGTT
23	atcgactgcattagtt	23,3	ATCGactgcattaGTT
24	tatcgactgcattagtt	24,1	TATCgactgcattaGTT
25	gtatcgactgcattagtt	25,1	GTAT <sup>m</sup> cgactgcattagTT
26	tgtatcgactgcattagtt	26,1	TG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattagTT
27	ttgtatcgactgcattagtt	27,1	TTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattagTT
28	tatcgactgcattagtt	28,1	TAT <sup>m</sup> cgactgcattaGT
28	tatcgactgcattagtt	28,2	TATCgactgcattAGT
29	gtatcgactgcattagtt	29,1	GTAT <sup>m</sup> cgactgcattaGT
30	tgtatcgactgcattagtt	30,1	TG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattaGT
31	gtatcgactgcattagtt	31,1	GTAt <sup>m</sup> cgactgcattAG
31	gtatcgactgcattagtt	31,2	GTAt <sup>m</sup> cgactgcattAG
31	gtatcgactgcattagtt	31,3	GTAT <sup>m</sup> cgactgcattAG
32	tgtatcgactgcattagtt	32,1	TG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattAG
33	ttgtatcgactgcattagtt	33,1	TTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattAG
34	attgtatcgactgcattagtt	34,1	ATt <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattAG
35	tgtatcgactgcattagtt	35,1	TG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattTA
35	tgtatcgactgcattagtt	35,2	TGT <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattTA
36	attgtatcgactgcattagtt	36,1	ATTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattTA
37	ttgtatcgactgcattagtt	37,1	TTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattT
37	ttgtatcgactgcattagtt	37,2	TTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattCATT
38	attgtatcgactgcattagtt	38,1	ATT <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattCAT
38	attgtatcgactgcattagtt	38,2	ATT <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactgcattCAT
38	attgtatcgactgcattagtt	38,3	ATTG <sup>Tat</sup> <sup>m</sup> cgactGCAT
39	acgcattgtatcgact	39,1	ACGcattgtat <sup>m</sup> cgACT
39	acgcattgtatcgact	39,2	ACGCattgtat <sup>m</sup> cGACT
40	tacgcattgtatcgac	40,1	TACgcattgtat <sup>m</sup> cGAC
40	tacgcattgtatcgac	40,2	TACGcattgtatCGAC
41	ctacgcattgtatcgac	41,1	CTa <sup>m</sup> cgcatgtatCGAC
42	tctacgcattgtatcgac	42,1	TCTA <sup>m</sup> cgcatgtat <sup>m</sup> cgAC
43	atctacgcattgtatcgac	43,1	ATCta <sup>m</sup> cgcatgtat <sup>m</sup> cgAC
44	tatctacgcattgtatcgac	44,1	TAtcta <sup>m</sup> cgcatgtatcGAC
45	ctacgcattgtatcgac	45,1	CTA <sup>m</sup> cgcatgtatCGA
45	ctacgcattgtatcgac	45,2	CTACgcattgtatTCGA
46	tatctacgcattgtatcgac	46,1	TAtcta <sup>m</sup> cgcatgtatCGA
47	tctacgcattgtatcgac	47,1	TCTa <sup>m</sup> cgcatgtatTCG
47	tctacgcattgtatcgac	47,2	TCTa <sup>m</sup> cgcatgtatCG
47	tctacgcattgtatcgac	47,3	TCTA <sup>m</sup> cgcatgtatATCG
48	atctacgcattgtatcgac	48,1	ATCTa <sup>m</sup> cgcatgtatTCG
49	tatctacgcattgtatcgac	49,1	TATCta <sup>m</sup> cgcatgtatCG
50	tctatctacgcattgtatcgac	50,1	TCtatcta <sup>m</sup> cgcatgtatCG
51	atctacgcattgtatcgac	51,1	ATCta <sup>m</sup> cgcatgtatATC
51	atctacgcattgtatcgac	51,2	ATCTa <sup>m</sup> cgcatgtatTATC
52	tatctacgcattgtatcgac	52,1	TATcta <sup>m</sup> cgcatgtatTATC
53	ctatctacgcattgtatcgac	53,1	CTatcta <sup>m</sup> cgcatgtatTATC

10

20

30

40

50

54	tctatctacgcattgtatc	54,1	TCTatcta <sup>m</sup> cgcattgtatC
55	ttctatctacgcattgtatc	55,1	TTCTatcta <sup>m</sup> cgcattgtatC
56	tatctacgcattgtat	56,1	TATcta <sup>m</sup> cgcattTAT
56	tatctacgcattgtat	56,2	TATCta <sup>m</sup> cgcattGTAT
57	ctatctacgcattgtat	57,1	CTAtcta <sup>m</sup> cgcattGTAT
58	tctatctacgcattgtat	58,1	TCtatcta <sup>m</sup> cgcattGTAT
59	ttctatctacgcattgtat	59,1	TTCTatcta <sup>m</sup> cgcattTAT
60	ctatctacgcattgtat	60,1	CTAtcta <sup>m</sup> cgcattGTA
60	ctatctacgcattgtat	60,2	CTATCta <sup>m</sup> cgcattTGTA
61	tctatctacgcattgtat	61,1	TCTatcta <sup>m</sup> cgcattGTA
62	ttctatctacgcattgtat	62,1	TTCTatcta <sup>m</sup> cgcattGTA
63	ttctatctacgcattgt	63,1	TTCTatcta <sup>m</sup> cgcattTGT
64	tcttctatctacgcattgt	64,1	TCttctatcta <sup>m</sup> cgcattGT
65	ttcttctatctacgcattgt	65,1	Ttcttctatcta <sup>m</sup> cgcattGT
66	ttcttctatctacgcattg	66,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgcattTG
67	ttctatctacgcattg	67,1	TTCTatcta <sup>m</sup> cgcattTG
68	cttctatctacgcatt	68,1	CTTCtatcta <sup>m</sup> cgcattCATT
69	tcttctatctacgcatt	69,1	TCTtatcta <sup>m</sup> cgcattCATT
70	ttcttctatctacgcatt	70,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgcattCATT
71	tcttctatctacgcatt	71,1	TCTTtatcta <sup>m</sup> cgcattCAT
72	ttcttctatctacgcatt	72,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgcattCAT
73	tttcttctatctacgcatt	73,1	CTTCtatcta <sup>m</sup> cgcattCAT
74	ttcttctatctacgcata	74,1	TTCTtatcta <sup>m</sup> cgcattGCA
75	tttcttctatctacgcata	75,1	CTTCtatcta <sup>m</sup> cgcattCA
76	gtttcttctatctacgcata	76,1	Gttttcttctatcta <sup>m</sup> cgcattCA
77	tttcttctatctacgc	77,1	CTtcttctatcta <sup>m</sup> ACGC
78	gtttcttctatctacgc	78,1	GCTtcttctatcta <sup>m</sup> ACG
79	cgtggggcttcata	79,1	CGTggggcttcata
80	tgacttggagaaaagcacaa	80,1	TGacttggagaaaagcacAA
81	ctgacttggagaaaagcac	81,1	CtgacttggagaaaagcacAC
82	agagtcatcgatgtcc	82,1	AGAgtcat <sup>m</sup> cgtgcTCC
83	aagtactttaatagctcaa	83,1	AAGTactttaatagctCAA
84	aagtactttaatagctcaa	84,1	AAGTactttaatagctCAA
85	gaagtactttaatagctcaa	85,1	GAAGTactttaatagctCAA
86	tactttaatagctcaa	86,1	TACTttaatagctCAA
87	aagtactttaatagctca	87,1	AAGTactttaatagctTCA
88	gaagtactttaatagctca	88,1	GAAGTactttaatagctTCA
89	agaagtactttaatagctc	89,1	AGAAgtactttaatagCTC
90	aagaagtactttaatagctc	90,1	AAAAGtactttaatagCTC
91	gaagtactttaatagct	91,1	GAAGTactttaatAGCT
92	taagaagtactttaatagct	92,1	TAAGaagtactttaatAGCT
93	agaagtactttaatagc	93,1	AGAAgtactttaaTAGC
94	taagaagtactttaatagc	94,1	TAAGaagtactttaaTAGC
95	gtaagaagtactttaatagc	95,1	GTaagaagtactttaaTAGC
96	taagaagtactttaatag	96,1	TAAGaagtactttaaTAG
97	gtaagaagtactttaatag	97,1	GTAAGaagtactttaaTAG

10

20

30

40

50

98	tgttaagaagtactttatag	98,1	TGTAAgaagtactttaATAG
99	aatgtgttaagaagtacttt	99,1	AATGtgttaagaagtaCTTT
100	caatgtgttaagaagtacttt	100,1	CAATgtgttaagaagtaCTTT
101	atgtgttaagaagtactt	101,1	ATGTgttaagaagtACTT
102	aatgtgttaagaagtactt	102,1	AATGtgttaagaagtACTT
103	caatgtgttaagaagtactt	103,1	CAATgtgttaagaagtACTT
104	gcaatgtgttaagaagtactt	104,1	GCAtgtgttaagaagtACTT
105	atgtgttaagaagtact	105,1	ATGTgttaagaagtACT
105	atgtgttaagaagtact	105,2	ATGTgttaagaagTACT
106	gcaatgtgttaagaagtact	106,1	GCAAtgtgttaagaagtACT
107	aatgtgttaagaagtac	107,1	AATGtgttaagaaGTAC
107	aatgtgttaagaagtac	107,2	AATgtgttaagaaGTAC
108	caatgtgttaagaagtac	108,1	CAATgtgttaagaaGTAC
109	gcaatgtgttaagaagtac	109,1	GCAatgtgttaagaaGTAC
110	caatgtgttaagaagta	110,1	CAAtgtgttaagaaGTA
110	caatgtgttaagaagta	110,2	CAAtgtgttaagaAGTA
110	caatgtgttaagaagta	110,3	CAATgtgttaagaAGTA
111	gcaatgtgttaagaagta	111,1	GCAatgtgttaagaAGTA
112	gcaatgtgttaagaagt	112,1	GCAatgtgttaagaAGT
		A	以下を参照のこと。
		B	以下を参照のこと。

化合物について:大文字はLNAヌクレオシドを表し(ベーターデオキシLNAヌクレオシドを使用した)、全てのLNAシトシンは5-メチルシトシンであり、小文字はDNAヌクレオシドを表し、上付き文字<sup>m</sup>で始まるDNAシトシンは5-メチルC-DNAヌクレオシドを表す。全てのヌクレオシド間連結はホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。EP16177508. 5及びEP17170129. 5において、化合物Aは化合物143, 1として開示されており、化合物Bは化合物145, 1として開示されており、陽性対照化合物として使用されている。

### 【0269】

実施例1. 単一濃度でのU251細胞株におけるLNAオリゴヌクレオチドのインビトロ効力の試験。

HTRA1についての有望な「ホットスポット」領域の同定。n=231のHTRA1 LNAオリゴヌクレオチドのライブラリーをU251細胞株において5μM、6日間の処理でスクリーニングした。このライブラリーから、本発明者らは、図1(配列番号116又は117)に示すように、位置53113~53384の間のヒトHTRA1プレmRNAを標的とする一連の活性オリゴヌクレオチドを同定した。

### 【0270】

ヒト膠芽腫U251細胞株をECCACから購入し、供給者により推奨されるように5%CO<sub>2</sub>を伴う37℃で、加湿インキュベーター中で維持した。アッセイのために、96マルチウェルプレートにおいて、15000個のU251細胞/ウェルを飢餓培地(10%の代わりの1%FBSを除く、供給者により推奨される培地)中に播種した。細胞を、PBS中に溶解したオリゴヌクレオチドの添加前に、24時間にわたりインキュベートした。オリゴヌクレオチドの濃度:5μM。オリゴヌクレオチドの添加後3~4日に、培地を除去し、新しい培地(オリゴヌクレオチドを伴わない)を加えた。オリゴヌクレオチドの添加後6日に、細胞を回収した。RNAを、PureLink Pro 96 RNA精製キット(Ambion、製造者の指示に従う)を使用して抽出した。cDNAを次に、M-MLT逆転写酵素、ランダム10量体RETROscript、RNase阻害剤(Ambion、製造者の指示に従う)と100mM dNTPセットPCRグレード(Invitrogen)及びDNase/RNase不含水(Gibco)を使用して合成した。遺伝子発現分析のために、qPCRを、TagMan Fast Advanced Master Mix(2×)(Ambion)を使用し、二重設定において実施し

10

20

30

40

50

た。以下の T a q M a n プライマーアッセイを q P C R のために使用した：Life Technologiesからの H T R A 1 、 H s 0 1 0 1 6 1 5 1 \_ m 1 ( F A M - M G B ) 、及びハウスキーピング遺伝子、 T B P 、 H s 4 3 2 6 3 2 2 E ( V I C - M G B ) 。 n = 2 つの非依存的な生物学的複製物。表中の残留 H T R A 1 mRNA 発現レベルを、対照 ( P B S 処理細胞 ) の % として示す。

【表 6】

配列番号	CMP ID NO	mRNA レベル
19	19.1	16
31	31.1	2
38	38.1	9
47	47.1	3
78	78.1	4
79	79.1	21
82	82.1	35
107	107.1	17
110	110.1	24
112	112.1	15

10

20

30

## 【0271】

実施例 2 . 単一濃度での U 2 5 1 細胞株における L N A オリゴヌクレオチドのインビトロ効力の試験。

実施例 1 において記載する「ホットスポット」領域 5 3 1 1 3 ~ 5 3 3 8 4 を、 5  $\mu$  M で U 2 5 1 細胞株においてスクリーニングされた n = 2 1 0 の H T R A 1 L N A オリゴヌクレオチドの新たなライブラリー中でさらに検証した。 n = 3 3 の L N A オリゴヌクレオチドは、位置 5 3 1 1 3 ~ 5 3 3 8 4 の間でヒト H T R A 1 プレ m R N A を標的としたが、これらのオリゴは、図 2 に示すように、残りとの比較において、比較的活性であった。

## 【0272】

アッセイを、実施例 1 に記載するように実施した。 n = 2 つの非依存的な生物学的複製物。残留 H T R A 1 mRNA 発現レベルを、対照 ( P B S 処理細胞 ) の % として表中に示す。

40

50

【表 7】

配列番号	CMP ID NO	miRNA レベル	
19	19.2	3	
19	19.3	16	
23	23.1	1	
23	23.2	44	10
28	28.1	2	
28	28.2	19	
31	31.2	0.4	
31	31.3	9	
35	35.1	24	
35	35.2	5	
37	37.1	0.3	
37	37.2	7	
38	38.2	1	
38	38.3	17	20
39	39.1	5	
39	39.2	17	
40	40.1	6	
40	40.2	34	
45	45.1	4	
45	45.2	23	
47	47.2	1	
47	47.3	4	
51	51.1	6	
51	51.2	13	30
56	56.1	2	
56	56.2	12	
60	60.1	2	
60	60.2	5	
105	105.1	30	
105	105.2	76	
107	107.2	25	
110	110.2	27	
110	110.3	20	40

## 【0273】

実施例3. 単一濃度でのU251及びARPE19細胞株におけるLNAオリゴヌクレオチドのインビトロ効力の試験。

実施例1及び2に記載する「ホットスポット」領域53113～53384を、それぞれ5μM及び25μMでU251及びARPE19細胞株でスクリーニングされたn=305のHTRA1 LNAオリゴヌクレオチドの新たなライブラリーにおいてさらに検証した。n=95のLNAオリゴヌクレオチドは、位置53113～53384の間でヒトHTRA1プレmRNAを標的としたが、これらのオリゴは、図3に示すように、残りとの比較において、比較的活性であった。

## 【0274】

ヒト網膜色素上皮ARPE19細胞株をATCCから購入し、37、5%CO<sub>2</sub>の加湿インキュベーターにおいてD MEM - F12 (Sigma、D8437)、10%FBS、1%ペニシリン／ストレプトマイシン中で維持した。U251細胞株を実施例1において記載する。アッセイのために、2000個のU251又はARPE19細胞／ウェルを、96マルチウェルプレートにおいて、供給者により推奨される培地中に播種した。細胞を、PBS中に溶解したオリゴヌクレオチドの添加前に、2時間にわたりインキュベートした。オリゴの濃度は、U251及びARPE19細胞中でそれぞれ5及び25μMであった。オリゴヌクレオチドの添加後4日に細胞を回収した。RNA抽出を、実施例1に記載するように実施し、cDNA合成及びqPCRを、qScript XLTワンステップRT-qPCR Toughmix Low ROX、95134-100 (Quanta Biosciences)を使用して実施した。以下のTaqManプライマーアッセイを、二重設定においてU251及びARPE19細胞のために使用した：HTRA1、Hs01016151\_m1 (FAM-MGB)、及びハウスキーピング遺伝子、GAPDH、Hs4310884E (VIC-MGB)。全てのプライマーセットをLife Technologiesから購入した。n = 1の生物学的複製物。表中の相対的なHTRA1 mRNA発現レベルを、対照 (PBS処理細胞) の%として示す。

10

20

30

40

50

【表 8】

配列番号	CMP ID NO	ARPE19 mRNA レベル	U251 mRNA レベル
5	5,1	90	56
6	6,1	107	60
7	7,1	92	74
8	8,1	83	57
9	9,1	98	64
10	10,1	77	67
11	11,1	71	56
12	12,1	81	43
13	13,1	84	65
14	14,1	36	20
15	15,1	37	29
16	16,1	55	28
17	17,1	53	43
18	18,1	69	59
20	20,1	41	42
21	21,1	24	22
22	22,1	38	51
23	23,3	53	37
24	24,1	52	27
25	25,1	27	18
26	26,1	16	26
27	27,1	28	42
29	29,1	24	16
30	30,1	18	22
31	31,2	23	3
32	32,1	14	23
33	33,1	11	23
34	34,1	14	34
35	35,1	8	3
36	36,1	12	18
37	37,1	24	5
41	41,1	51	26
42	42,1	39	26
43	43,1	53	42
44	44,1	67	49
46	46,1	59	43

10

20

30

40

50

47	47,2	16	8
48	48,1	23	15
49	49,1	39	29
50	50,1	45	42
51	51,1	14	28
52	52,1	15	22
53	53,1	32	23
54	54,1	12	31
55	55,1	46	36
56	56,1	9	11
57	57,1	62	38
58	58,1	77	30
59	59,1	29	31
60	60,1	47	22
61	61,1	25	18
62	62,1	32	26
63	63,1	32	17
64	64,1	67	43
65	65,1	51	78
66	66,1	24	18
67	67,1	11	0,7
68	68,1	37	17
69	69,1	36	17
70	70,1	23	12
71	71,1	34	15
72	72,1	16	15
73	73,1	16	14
74	74,1	17	8
75	75,1	29	13
76	76,1	74	43
77	77,1	58	13
80	80,1	127	98
81	81,1	119	104
83	83,1	49	49
84	84,1	52	31
85	85,1	29	10
86	86,1	13	5
87	87,1	32	28
88	88,1	29	15
89	89,1	28	16
90	90,1	21	14
91	91,1	74	53
92	92,1	76	51
93	93,1	40	22

10

20

30

40

50

94	94,1	33	20
95	95,1	10	31
96	96,1	49	35
97	97,1	34	20
98	98,1	16	21
99	99,1	66	43
100	100,1	51	21
101	101,1	87	66
102	102,1	52	32
103	103,1	49	24
104	104,1	79	51
106	106,1	71	49
108	108,1	47	32
109	109,1	59	48
111	111,1	66	41
A	A	21	28

10

## 【0275】

20

実施例4. 用量反応曲線におけるU251及びARPE19細胞株中の選択化合物のインビトロ効力及び有効性の試験。

U251及びARPE19細胞株をそれぞれ実施例1及び3に記載した。U251アッセイを、実施例1に記載するとおりに実施した。ARPE19アッセイを以下のように実施した：5000個のARPE19細胞／ウェルを、96マルチウェルプレートにおいて、供給者により推奨される培地（10%の代わりの1%FBSを除く）中に播種した。細胞を、PBS中に溶解したオリゴヌクレオチドの添加前に、2時間にわたりインキュベートした。オリゴヌクレオチドの濃度：50 μMから、半対数希釈、8ポイント。オリゴヌクレオチドの添加後4日に細胞を回収した。RNA抽出、cDNA合成、及びqPCRを、実施例1に記載するように実施した。n=2の非依存的な生物学的複製物。50 μMでのEC50値及び残留HTRA1 mRNAレベルを、対照の%（PBS）として表中に示す。

30

## 【表9】

配列番号	CMP ID NO	ARPE19		U251	
		EC50 (μM)	最高KDでの mRNAレベル	EC50 (μM)	最高KDでの mRNAレベル
19	19.2	2.3	54	0.6	3
31	31.2	2.3	12	0.40	0.2
37	37.1	4.0	11	0.46	0.2
38	38.2	7.4	19	0.70	0.2
47	47.2	4.6	8	0.62	0.2
23	23.1	6.8	25	0.80	1
35	35.1	3.5	4	0.38	0.1

40

50

## 【0276】

実施例5. 用量応答曲線におけるU251及びARPE19細胞株中の選択化合物のインピトロ効力及び有効性の試験。

アッセイを、実施例3に記載するように実施した。オリゴヌクレオチドの濃度：50 μMから、半対数希釈、8ポイント。それぞれU251及びARPE19についてのn = 2及びn = 1の非依存的な生物学的複製物。50 μMでのEC50値及び残留HTRA1 mRNAレベルを、対照の%（PBS）として表中に示す。

## 【表10】

配列番号	CMP ID NO	ARPE19		U251	
		EC50 (μM)	最高KDでの mRNAレベル	EC50 (μM)	最高KDでの mRNAレベル
31	31.2	3.2	15	0.90	0.38
37	37.1	11	22	1.3	0.75
47	47.2	2.8	13	0.89	0.83
35	35.1	2.6	8.3	0.79	0.40
85	85.1	8.2	24	0.48	3.6
90	90.1	3.3	16	0.50	2.2
95	95.1	0.55	28	1.0	4.1
98	98.1	1.7	24	0.86	4.5
30	30.1	1.2	20	1.00	2.2
32	32.1	1.7	22	1.6	1.4
26	26.1	1.1	14	1.4	0.45
33	33.1	0.75	28	0.66	0.63
34	34.1	0.44	21	0.80	0.35
36	36.1	5.2	28	1.1	0.80
52	52.1	2.1	28	1.1	1.1
54	54.1	0.79	25	0.62	1.4
72	72.1	2.9	33	0.71	1.7
70	70.1	1.9	36	0.52	1.5
74	74.1	0.78	24	0.35	1.1
73	73.1	0.78	11	0.59	0.33
75	75.1	1.7	22	0.60	0.80
86	86.1	1.7	6.5	0.47	0.65
67	67.1	0.59	4.3	0.38	0.23
A	A	6.5	24	1.2	3.6
B	B	8.1	30	0.79	4.2

## 【0277】

実施例6. 用量応答曲線におけるU251細胞株中の選択化合物のインピトロ効力及び

10

20

30

40

50

有効性の試験。

アッセイを、実施例 3 に記載するように実施した。オリゴヌクレオチドの濃度：50 μM から、半対数希釈、8 ポイント。n = 2 の非依存的な生物学的複製物。50 μM での EC50 値及び残留 H T R A 1 mRNA レベルを、対照の% (P B S) として表中に示す。

【表 11】

配列番号	CMP ID NO	U251	
		EC50 (μM)	最高 KD での mRNA レベル
38	38.1	3.3	3
78	78.1	0.58	2
31	31.2	1.2	0.4
37	37.1	1.6	0.6
47	47.2	0.91	0.6
35	35.1	0.52	0.3
39	39.1	0.82	3
40	40.1	1.3	4
45	45.1	0.89	3
51	51.1	2.7	2
56	56.1	2.7	1
60	60.1	2.1	1
37	37.2	8.0	24
31	31.3	2.8	10
35	35.2	1.3	4
47	47.3	0.86	4
60	60.2	1.3	3
26	26.1	0.52	1
73	73.1	0.24	0.7
86	86.1	0.27	0.9
67	67.1	0.46	0.2
A	A	1.1	3.1
B	B	1.2	3.3

10

20

30

40

### 【0278】

実施例 7 . 用量反応曲線における U 2 5 1 細胞株中の選択化合物のインビトロ効力及び有効性の試験。

A R P E 1 9 細胞株を実施例 3 において記載した。アッセイのために、A R P E 1 9 細胞、2 4 0 0 0 個細胞 / ウェルを、96 マルチウェルプレートにおいて、1 0 0 μL の飢餓培地 (10 % の代わりの 1 % F B S を除く、供給者により推奨される培養培地) 中に播種した。細胞を、P B S 中に溶解したオリゴヌクレオチドの添加前に、2 時間にわたりイン

50

キュベートした。オリゴヌクレオチドの濃度：50 μMから、半対数希釈、8ポイント。オリゴヌクレオチド化合物の添加後4及び7日目に、オリゴヌクレオチドを伴わない75 μLの新鮮な餓餓培地を細胞に加えた（古い培地の除去を伴わない）。RNA抽出、cDNA合成、及びqPCRを、実施例3に記載するように実施した。n=2の非依存的な生物学的複製物。50 μMでのEC50値及び残留HTRA1 mRNAレベルを、対照の%（PBS）として表中に示す。

【表12】

配列番号	CMP ID NO	ARPE19	
		EC50 (μM)	最高 KD での mRNA レベル
30	30,1	0,31	1
33	33,1	0,60	0,5
35	35,1	0,58	1
35	35,2	2,7	4
36	36,1	0,97	2
37	37,1	1,0	4
40	40,1	3,8	21
45	45,1	1,6	3
56	56,1	5,8	2
67	67,1	0,84	1
73	73,1	0,36	2
86	86,1	0,59	4
90	90,1	0,75	5
95	95,1	0,74	3
A	A	1,3	1,9
B	B	0,84	1,5

## 【0279】

## 実施例8

ヒト初代RPE細胞中でのインビトロ有効性の試験。

ヒト初代網膜色素上皮（hP R P E）細胞をScienCell（カタログ番号6540）から購入した。アッセイのために、5000個のhP R P E細胞／ウェルを、ラミニン（ラミニン521、BioLamina カタログ番号LN521-03）でコーティングした96マルチウェルプレートにおいて培養培地（EpiCM、ScienCell カタログ番号4101）中に播種した。それらをこの培地で1週間にわたり増殖させ、以下の培地を2週間にわたり使用して分化させた：N1サプリメント（Sigma カタログ番号N-6530）、グルタミン・ペニシリン・ストレプトマイシン（Sigma カタログ番号G-1146）、非必須アミノ酸（NEAA、Sigma カタログ番号M-7145）、タウリン（Sigma カタログ番号T-0625）、ヒドロコルチゾン（Sigma カタログ番号H-03966）、トリヨードサイロニン（Sigma カタログ番号T-5516）、及びウシ血清アルブミン（BSA、Sigma カタログ番号A-9647）を添加したMEアルファ培地（Sigma カタログ番号M-4526）。細胞を加湿したインキュベーター中で37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

## 【0280】

実験日に、細胞を、オリゴヌクレオチドの添加前に、新鮮な分化培地と1時間にわたり

10

20

30

40

50

インキュベートした。これらを P B S 中に溶解し、0 日目及び 4 日目に細胞に適用した。7 日目に培地を交換し、10 日目に細胞を - メルカプトエタノールを伴う 50  $\mu$ l の R L T 緩衝液 (Qiagen カタログ番号 79216) で回収した。R N A の抽出は、D N a s e I 処理 (カタログ番号 79254; ロット 151042674) を含む Qiagen RNeasy Mini Kit (カタログ番号 74104; ロット 151048073) のユーザーマニュアルに従って実施した。R N A の品質管理は、Agilent Bioanalyzer Nano Kit (Agilent; カタログ番号 5067-1511; ロット 1446) を用いて実施した。c D N A へのトータル R N A の逆転写 (c D N A 合成) を、製造者の指示 (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 4368814; ロット 00314158) に従って、高容量 c D N A 逆転写キット (ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドに基づく) を使用して実施した。c D N A サンプルの測定を、7900 HTリアルタイム P C R 装置 (Thermo Fisher Scientific) で、384 ウェルプレートフォーマットにおいて 3 通りに行った。以下の TaqMan プライマーアッセイを q P C R のために使用した：H T R A 1、H s 0 1 0 1 6 1 5 1 \_m 1 及び H s 0 0 1 7 0 1 9 7 \_m 1、ハウスキーピング遺伝子、G A P D H、H s 9 9 9 9 9 0 5 \_m 1 及び P P I A、H s 9 9 9 9 9 9 0 4 \_m 1 (Life Technologies から)。n = 3 の生物学的複製物。残留 H T R A 1 m R N A 発現レベルを図 4 及び次の表中に対照 (P B S) の % として示す。

10

20

30

40

50

【表 1 3】

配列番号	CMP ID NO	mRNA レベル		
		50μM	10μM	1μM
37	37.1	32	60	77
35	35.1	9	20	64
85	85.1	22	49	46
90	90.1	22	39	61
95	95.1	20	47	74
98	98.1	14	27	55
30	30.1	19	41	75
32	32.1	14	25	53
26	26.1	21	39	73
33	33.1	18	70	58
34	34.1	16	35	63
52	52.1	13	31	61
54	54.1	7	20	53
72	72.1	7	18	56
70	70.1	8	18	53
74	74.1	3	12	40
73	73.1	13	13	65
75	75.1	7	15	55
86	86.1	8	27	70
67	67.1	8	27	77
A	A	31	57	72

## 【0 2 8 1】

実施例 9 . カニクイザルのインビボ薬物動態学及び薬力学試験、21日間の処置、硝子体内(IVT)注射、単回投与。

ノックダウンを、網膜中のmRNAならびに網膜中及び硝子体中のタンパク質レベルの両方で、位置53113～53384の間のヒトHTRA1プレmRNAにおいて「ホットスポット」を標的とする3つのHTRA1-LNAオリゴヌクレオチドについて観察した(図5を参照のこと)。

## 【0 2 8 2】

## 動物

全ての実験をカニクイザル(*Macaca fascicularis*)において実施した。

## 【0 2 8 3】

4匹の動物を試験の各々の群中に含め、合計20匹であった。

## 【0 2 8 4】

## 化合物及び投与手順

10

20

30

40

50

ブプレノルフィン鎮痛剤を、試験化合物注射の前及び2日後に投与した。動物を、ケタミン及びキシラジンの筋肉内注射を用いて麻酔した。試験項目及び陰性対照（P B S）を、テトラカイン麻酔薬の局所適用後の試験1日目に、麻酔動物の両眼において硝子体内投与（投与当たり $50 \mu\text{L}$ ）した。

#### 【0285】

##### 安楽死

生存期の終了時（22日目）に、全てのサルを、ペントバルビタールの腹腔内及び過剰投与注射により安楽死させた。

#### 【0286】

##### q P C RによるH t r a 1 RNA発現のオリゴ含量測定及び定量化

10

安楽死の直後に、眼組織を氷上で素早く慎重に切開し、出荷まで-80°で保存した。網膜サンプルを $700 \mu\text{L}$ のMagNa Pure 96 LC RNA Isolation Tissue緩衝液中で溶解し、Precellys Evolutionホモジナイザーを使用して2mLチューブ $2 \times 1.5$ 分当たり1つのステンレススチールビーズを加え、それに続く室温での30分間のインキュベートによりホモジナイズした。サンプルを13000 rpm、5分間遠心分離した。半分を生物分析用に取っておき、残りの半分については、RNA抽出を直接続けた。

#### 【0287】

生物分析のために、サンプルを、ハイブリダイゼーションE L I S A方法を用いたオリゴ含量測定のために10~50倍に希釈した。ビオチニル化L N A捕捉プローブ及びジゴキシゲニン結合L N A検出プローブ（両方とも $5 \times$ SSCT中で $35 \text{nM}$ 、各々が検出されるL N Aオリゴヌクレオチドの一端に相補的である）を希釈ホモジネート又は関連標準と混合し、R Tで30分間にわたりインキュベートし、次にストレプトアビシン被覆E L I S Aプレート（Nuncカタログ番号436014）に加えた。

20

#### 【0288】

プレートを室温で1時間にわたりインキュベートし、 $2 \times$ SSCT（ $300 \text{mM}$ 塩化ナトリウム、 $30 \text{mM}$ クエン酸ナトリウム、 $0.05\% \text{v/v}$  Tween-20、p H 7.0）中で洗浄した。捕捉されたL N A二本鎖を、アルカリホスファターゼ（Roche Applied Scienceカタログ番号11093274910）及びアルカリホスファターゼ基質システム（Blue Phos基質、KPL製品コード50-88-00）を結合させた抗D I G抗体を使用して検出した。オリゴ複合体の量を、Bioteckリーダーで $615 \text{nm}$ での吸光度として測定した。

30

#### 【0289】

R N A抽出のために、細胞R N A大容量キット（05467535001、Roche）を、D N A s e処理を含む製造者の指示に従って、プログラム組織F F標準L V 3.1を伴うMagNA Pure 96システムにおいて使用した。R N Aの品質管理及び濃度を、E onリーダー（Bioteck）を用いて測定した。R N A濃度をサンプル全体で標準化し、その後のc D N A合成及びq P C Rを、qScript XLTワンステップRT-qPCR ToughMix Low ROX、95134-100（Quanta Biosciences）を使用し、ワンステップ反応において実施した。以下のTaqManプライマーアッセイをsingleplex反応において使用した：H t r a 1、M f 0 1 0 1 6 1 5 0 \_、M f 0 1 0 1 6 1 5 2 \_m 1 及びR h 0 2 7 9 9 5 2 7 \_m 1、ならびにハウスキーピング遺伝子、A R F G A P 2、M f 0 1 0 5 8 4 8 8 \_g 1 及びR h 0 1 0 5 8 4 8 5 \_m 1、及びA R L 1、M f 0 2 7 9 5 4 3 1 \_m 1（Life Technologiesから）。q P C R分析をViiA7機器（Life Technologies）で実行した。眼 / 群：n = 3眼。各々の眼を個別のサンプルとして処理した。相対的なH t r a 1 m R N A発現レベルを対照（P B S）の%として示す。

40

#### 【0290】

##### 組織学

眼球を取り出し、10%中性緩衝ホルマリン中で24時間にわたり固定し、トリミングしてパラフィン中に包埋した。

#### 【0291】

50

I S H 分析のために、ホルマリン固定パラフィン包埋された厚さ 4  $\mu$ M のカニクイザル網膜組織の切片を、RNAscope 2.5 VS Probe-Mmu-HTRA1、REF 486979(Advanced Cell Diagnostics, Inc.)を使用し、完全自動化Ventana Discovery ULTRA染色モジュール(手順:mRNA Discovery Ultra Red 4.0 - v0.00.0152)を使用して処理した。使用する色素原はFastred、ヘマトキシリン II 対比染色剤である。

#### 【0292】

プレートベースの免疫沈降質量分析(I P - M S)アプローチを使用したH T R A 1タンパク質の定量化

サンプル調製、網膜

#### 【0293】

網膜を、Precellys 24(5500、15秒、2サイクル)を使用し、プロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA-free、Roche)を伴う4容量(w/v)のR I P A緩衝液(50mM Tris-HCl、pH 7.4、150mM NaCl、0.25%デオキシコール酸、1%NP-40、1mM EDTA、Millipore)中で均質化した。ホモジネートを遠心分離し(13,000rpm、3分)、上清のタンパク質含量を測定した(Pierce BCAタンパク質アッセイ)。

10

#### 【0294】

サンプル調製、硝子体

硝子体液(300  $\mu$ l)を、プロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA-free、Roche)を伴う5×R I P A緩衝液(最終濃度:50mM Tris-HCl、pH 7.4、150mM NaCl、0.25%デオキシコール酸、1%NP-40、1mM EDTA)を用いて希釈し、Precellys 24(5500、15秒、2サイクル)を使用して均質化した。ホモジネートを遠心分離し(13,000rpm、3分)、上清のタンパク質含量を測定した(Pierce BCAタンパク質アッセイ)。

20

#### 【0295】

プレートベースのH T R A 1免疫沈降及びトリプシン消化

96ウェルプレート(Nunc MaxiSorp)を抗H T R A 1マウスモノクローナル抗体(R & D M A B 2 9 1 6、500  $\mu$ g/ウェル、P B S 50  $\mu$ l)でコーティングし、4で一晩インキュベートした。プレートをP B S(200  $\mu$ l)で2回洗浄し、20で30分間にわたり、P B S中の3%(w/v)B S Aでブロックし、続いてP B Sで2回洗浄した。サンプル(75  $\mu$ g網膜、50  $\mu$ l P B S中の100  $\mu$ g硝子体)を無作為化し、プレートに加え、続いてシェーカー(150rpm)で4で一晩インキュベートした。プレートを次に、P B Sで2回、水で1回洗浄した。50mM T E A B中の10mM D T T(30  $\mu$ l)を次に各々のウェルに加え、続いて20で1時間にわたりインキュベートしてシステインスルフヒドリルを還元した。50mM T E A B(5  $\mu$ l)中の150mMヨードアセトアミドを次に各々のウェルに加え、システインスルフヒドリルをブロックするために、暗所で20で30分間にわたりインキュベートした。10  $\mu$ lの消化液を各々のウェルに加え(最終濃度:1.24ng/ $\mu$ lトリプシン、20fmol/ $\mu$ l B S Aペプチド、26fmol/ $\mu$ l同位体標識H T R A 1ペプチド、1fmol/ $\mu$ l i R T ペプチド、Biognosys)、続いて20で一晩インキュベートした。

30

#### 【0296】

標的質量分析によるH T R A 1ペプチドの定量化(選択された反応モニタリング、S R M)。

40

#### 【0297】

質量分析を、TSQ Quantivaトリプル四重極質量分析計(Thermo Scientific)に共役されたUltimate RSLC nano LCで実施した。サンプル(20  $\mu$ L)を、I Pのために使用する96ウェルプレートから直接的に注入し、添加緩衝液(0.5%v/vギ酸、2%v/vACN)中のAcclaim Pepmap 100トラップカラム(100  $\mu$ M × 2cm、C18、5  $\mu$ M、100A、Thermo Scientific)に5  $\mu$ L/分で6分間にわたり添加した。ペプチドを次に、40に加熱した統合エレクトロスプレーエミッターを伴うPepMap Easy-SP

50

RAY分析カラム (75 μM × 15 cm、3 μM、100 A、Thermo Scientific) で、250 nL/分の流量で以下の勾配を使用して分離した：6分、98%緩衝液A (2%ACN、0.1%ギ酸)、2%緩衝液B (ACN + 0.1%ギ酸)；36分、30%緩衝液B；41分、60%緩衝液B；43分、80%緩衝液B；49分、80%緩衝液B；50分、2%緩衝液B。TSQ Quantivaを、以下のパラメーターを用いてSRMモードで操作した：サイクル時間、1.5秒；スプレー電圧、1800V；衝突ガス圧、2 mTorr。Q1及びQ3分解能、0.7 FWHM；イオン移動管温度300。SRM移行を、HTRA1ペプチド「LHRPPVIQLQR」及び同位体標識(L-[U-13C, U-15N]R)合成バージョンで取得し、内部標準として使用した。

## 【0298】

10

データ分析は、Skylineバージョン3.6を使用して実施した。

## 【0299】

## ウェスタンプロット

0.5 Preceylsesチューブ(CK14\_0.5 ml、Bertin Technologies)中の切開した網膜サンプルを、プロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA-free Proteases-Inhibitor Mini、11836170001、Roche)を伴うRIPA溶解緩衝液(20-188、Milipore)中で溶解及びホモジナイズした。

## 【0300】

硝子体サンプルを0.5 Preceylsesチューブ(CK14\_0.5 ml、Bertin Technologies)に加え、プロテアーゼ阻害剤(Complete EDTA-free Proteases-Inhibitor Mini、11836170001、Roche)を伴う1/4×RIPA溶解緩衝液(20-188、Milipore)中でホモジナイズした。

20

## 【0301】

サンプル(網膜20 μgタンパク質、硝子体40 μgタンパク質)を還元条件下で、4~15%勾配ゲル(#567-8084 Bio-Rad)で分析し、Trans-Blot Turbo Device(Bio-Radから)を使用してニトロセルロース(#170-4159 Bio-Rad)にプロットした。

## 【0302】

一次抗体：ウサギ抗ヒトHTRA1(SF1)はSascha Fauser(University of Cologne)からのご厚意である(マウス抗ヒトGapdh(#98795 Sigma-Aldrich))。二次抗体：ヤギ抗ウサギ800CW及びヤギ抗マウス680RDはLi-Corからであった。

30

## 【0303】

プロットをOdyssey CLX(Li-Corから)で画像化し、分析した。

## 【0304】

実施例10 カニクイザルのインビオ評価：房水中でのHTRA1タンパク質の測定ならびに網膜中でのHTRA1 mRNA及びタンパク質阻害との比較。

実験方法：上の実施例を参照のこと。実施例9の硝子体液サンプルに従って、房水サンプルを採取し、サンプルを調製した。カニクイザルの房水サンプル(AH)を分析方法論：キャビラリー電気泳動システム(Peggy Sue(商標)、Proteinsimple)のサイズベースアッセイで分析した。

40

## 【0305】

サンプルを氷上で解凍し、希釈せずに使用した。定量化のために、組換えHTRA1-S328A変異体(Origene#TP700208)。調製は供給者により記載される通りであった。

一次ウサギ抗ヒトHTRA抗体SF1は、Sascha Fauser教授により提供され、1:300希釈で使用した。全ての他の試薬はProteinsimpleからであった。

## 【0306】

サンプルを、12~230 kDa分離モジュールを使用し、技術的に3通りに、検量線を2通りに処理した。ピーク下面積を、Xlfit(IDBSソフトウェア)を使用して計算及び分

50

析した。

**【表 14】**

**結果**

図面の番号付け	化合物 ID	mRNA(網膜)	タンパク質(網膜)	タンパク質 AH
PBS	-	82	101	95
PBS	-	107	99	118
# 15,3	B	56	73	51
# 15,3	B	52	53	68
# 17	# 73,1	23	41	47
# 17	# 73,1	26	44	44
# 18	# 86,1	32	29	44
# 18	# 86,1	23	28	64
# 19	# 67,1	34	39	44
# 19	# 67,1	34	61	42

**【0307】**

注意 - 図 12～14 に示す化合物 ID では、実施例の残りとして異なる番号付けシステムを利用する。上の表は、以前の実施例及び本明細書中の他の箇所において使用するものと比較した、図 12～14 で使用する番号付けのキーを提供する。

**【0308】**

図 12 A は、化合物 B 及び # 73, 1 を用いて投与したサルの房水中での HTRA1 タンパク質レベルの視覚化を示し、サンプルを注射後 3、8、15、及び 22 日目に採取した。図 12 B には、HTRA1 タンパク質レベルの算出において使用する検量線を提供する。図 12 C には、注射後の時間に対してプロットした個々の動物からの房水から算出した HTRA1 レベルを提供する。

**【0309】**

図 13 は、房水中の HTRA1 タンパク質のレベルと網膜中の HTRA1 mRNA のレベルの間での直接的な相関関係を例証する。房水 HTRA1 タンパク質レベルは、従つて、HTRA1 網膜 mRNA レベル又は HTRA1 網膜 mRNA 阻害についてのバイオマークターとして使用してもよい。

**【0310】**

図 14 は、網膜中の HTRA1 タンパク質レベルと房水中の HTRA1 タンパク質レベルの間にも相関があることを例証しているが、相関は、この実験では、網膜中の HTRA1 mRNA 阻害と房水中の HTRA1 タンパク質レベルの相関ほど強くはなく、房水 HTRA1 タンパク質レベルが HTRA1 mRNA アンタゴニストについてのバイオマークターとして特に適していることを示す。

10

20

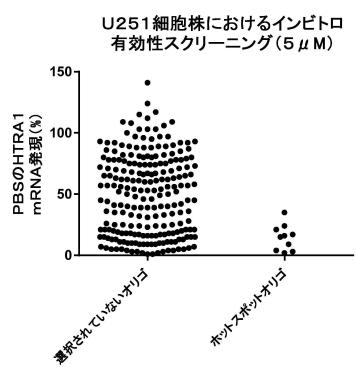
30

40

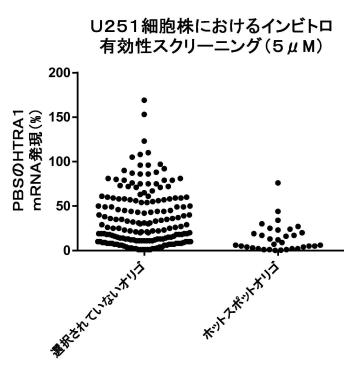
50

## 【図面】

## 【図 1】

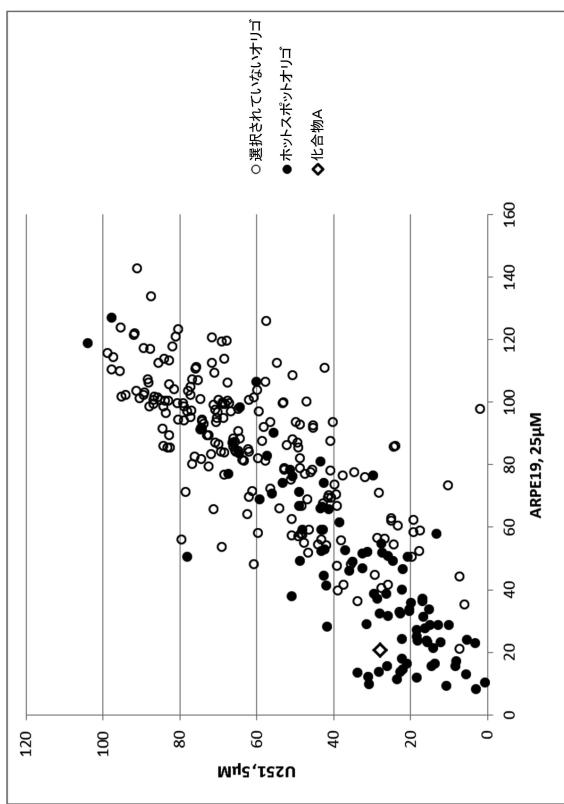


## 【図 2】

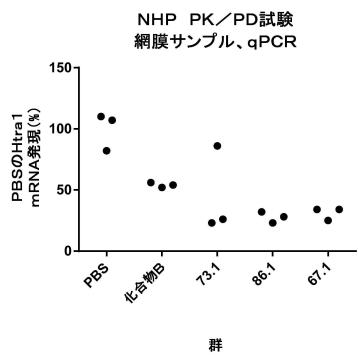


10

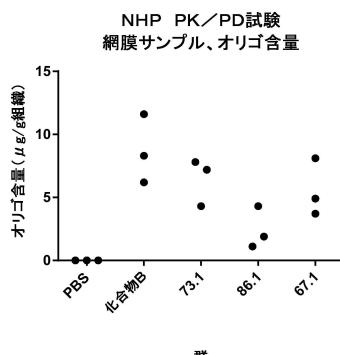
## 【図 3】



【図 5 A】

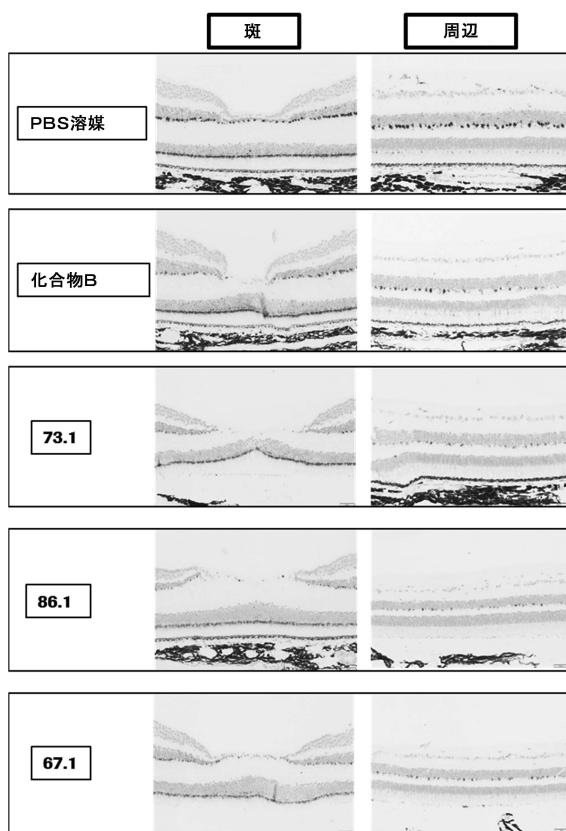


【図 5 B】

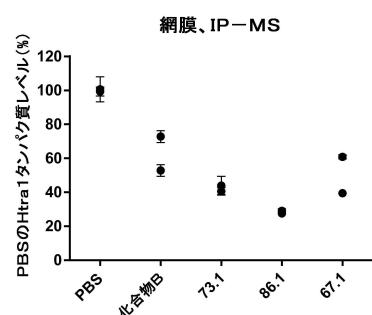


10

【図 5 C】



【図 5 D】



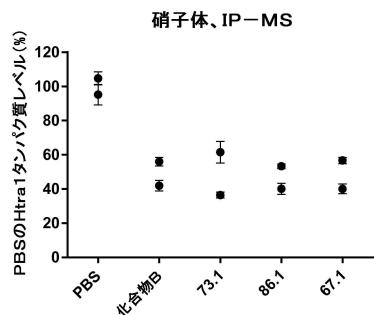
20

30

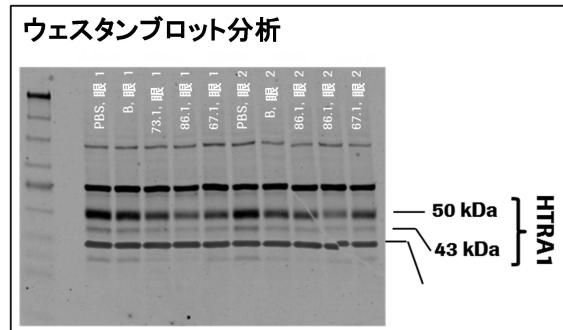
40

50

【図 5 E】

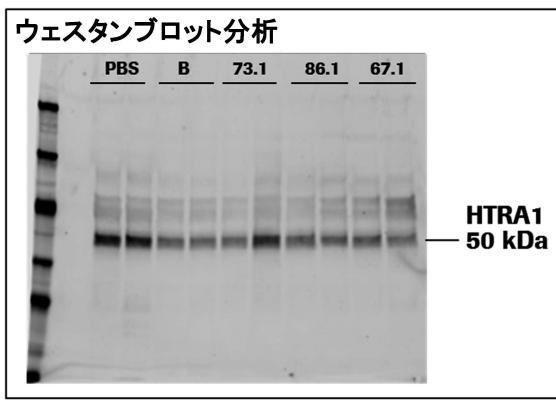


【図 5 F】

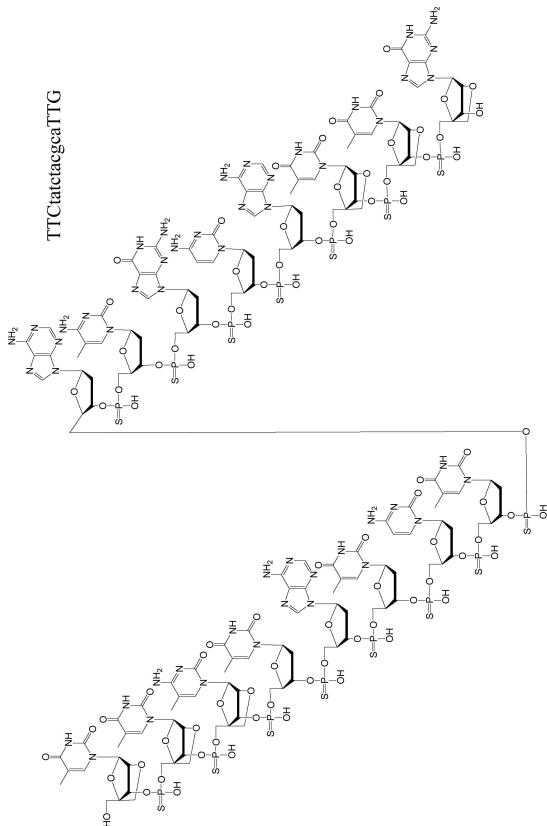


10

【図 5 G】



【図 6】



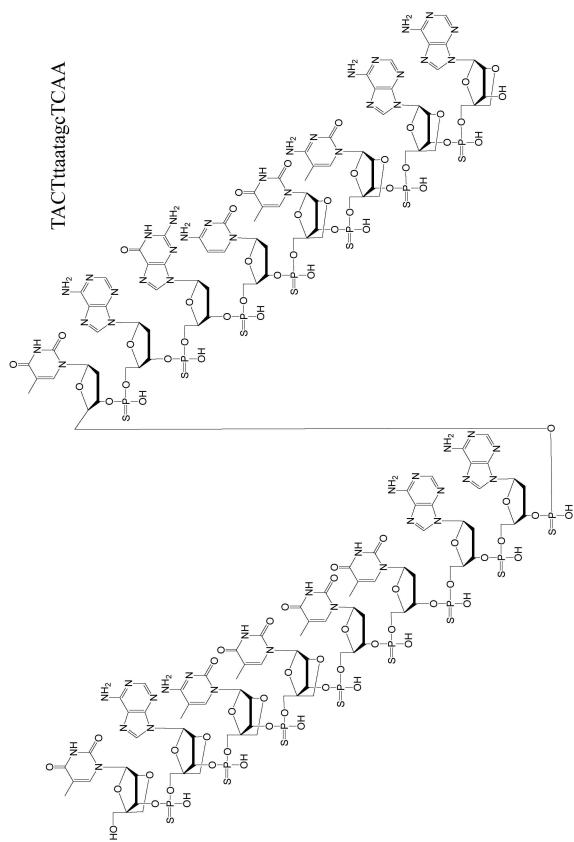
20

30

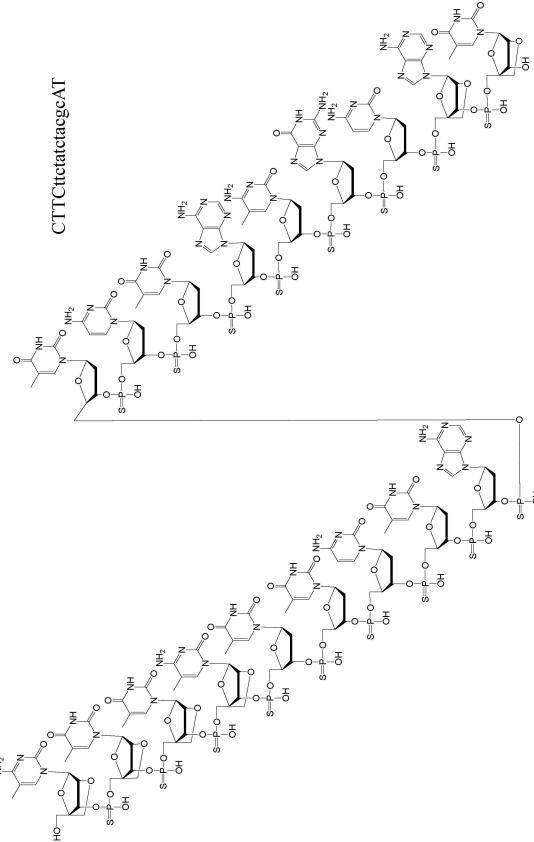
40

50

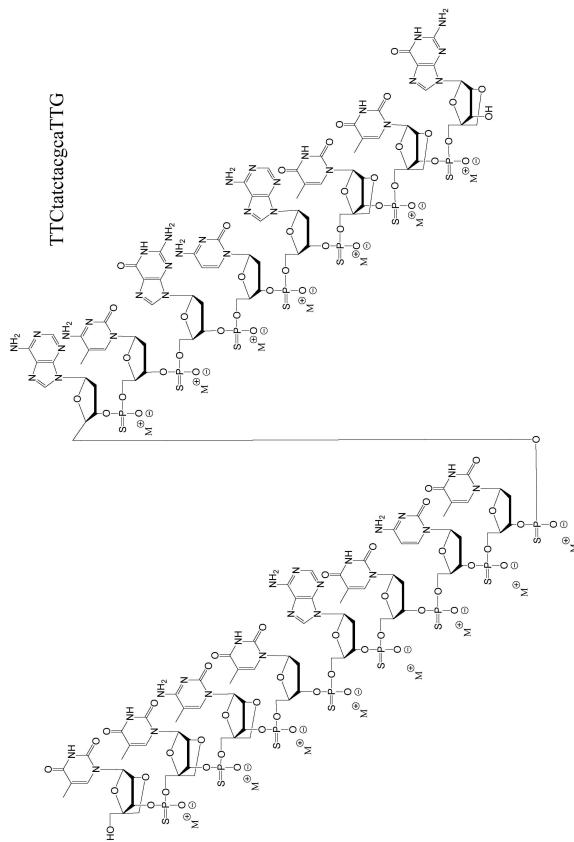
【図7】



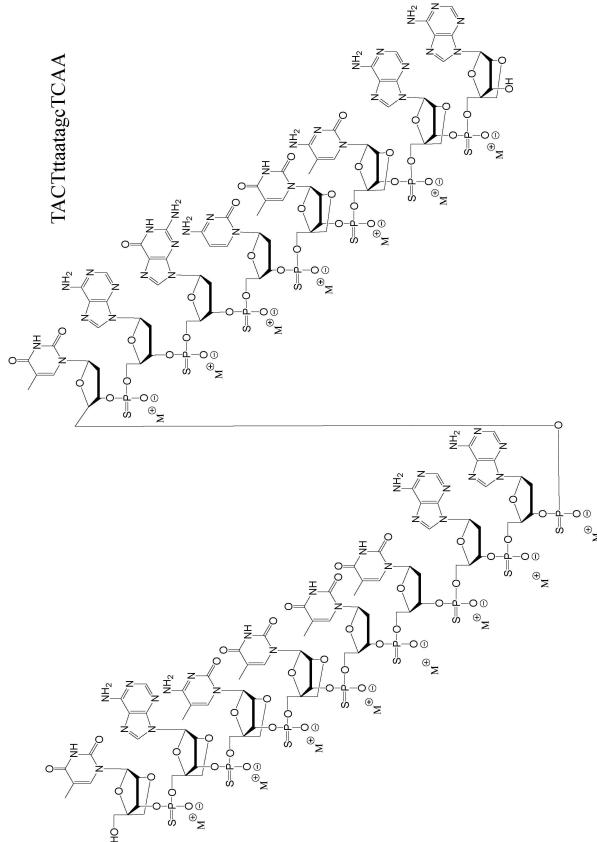
【 四 8 】



【 四 9 】



【図10】



10

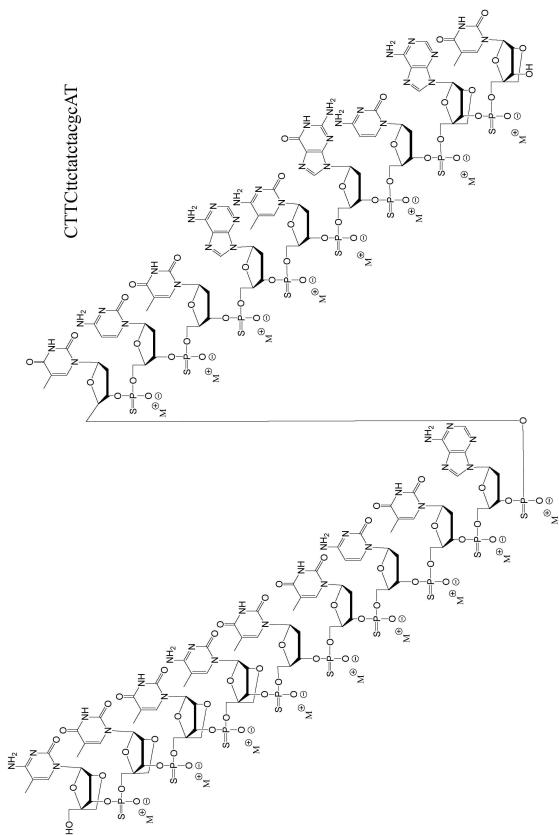
20

30

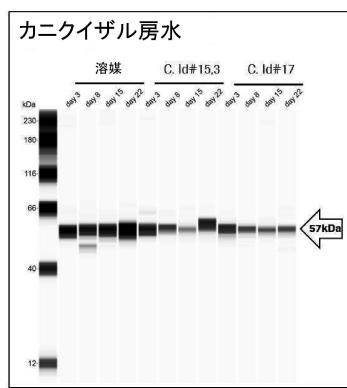
40

50

【図 1 1】

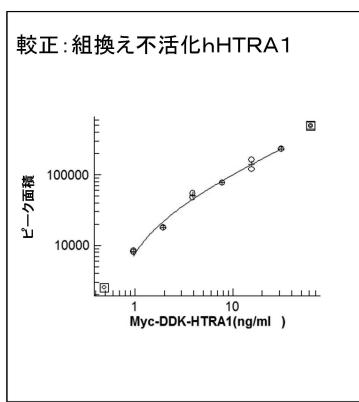


【図 1 2 A】

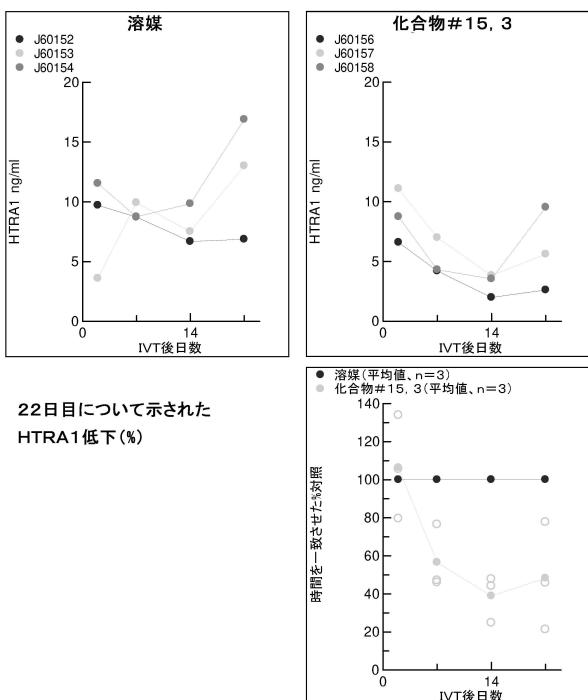


10

【図 1 2 B】



【図 1 2 C - 1】



20

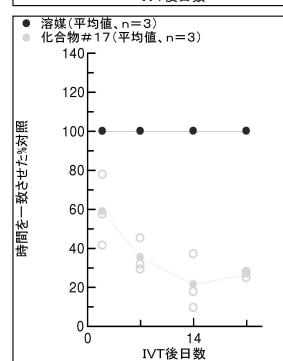
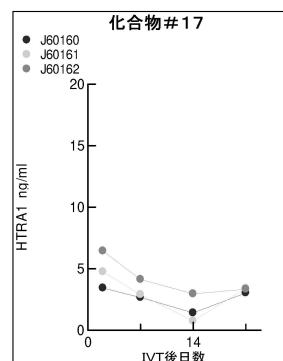
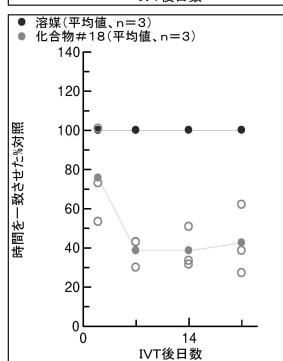
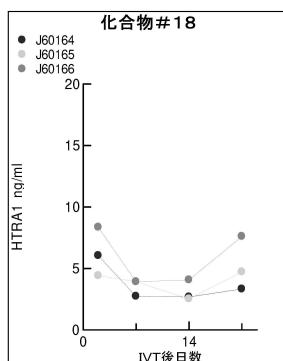
20

30

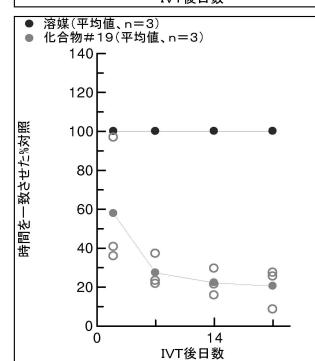
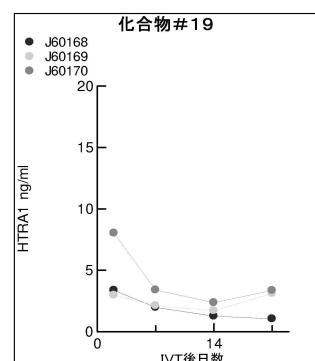
40

50

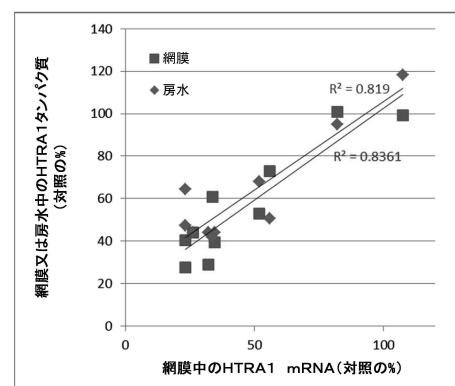
【図 1 2 C - 2】

22日目について示された  
HTRA1低下(%)

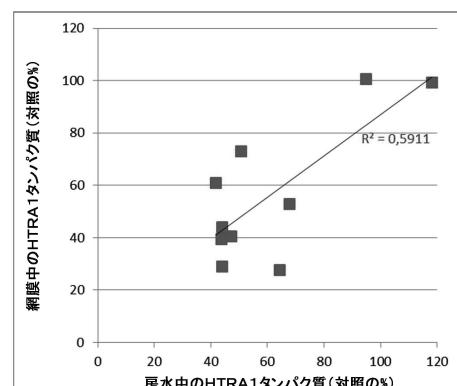
【図 1 2 C - 3】

22日目について示された  
HTRA1低下(%)

【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0007169995000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K	47/51 (2017.01)	F I	A 6 1 K	47/51	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)		A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 17209535.8

(32)優先日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

ツアッハーシュトラーセ 124、ツェー／オー・エフ・ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー

(72)発明者 ハーゲドルン,ペーター

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 カムラ,スサネ

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 オトセン,セーアン

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 トラウスタソン,シンドリ

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 フルレブッシュ,ハイディ・リュ

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ピーダスン,リュケ

デンマーク国、2970 ヘルスホルム、フレティズヴァイ 3、ツェー／オー・ロシュ・イノベーション・センター・コペンハーゲン・アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ベレラ,マルコ

スイス国、4070 バーゼル、グレンツアッハーシュトラーセ 124、ツェー／オー・エフ・ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー

(72)発明者 ディークマン,アンドレアス

スイス国、4070 バーゼル、グレンツアッハーシュトラーセ 124、ツェー／オー・エフ・ホフマン - ラ・ロシュ・アーゲー

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第2009/006460 (WO, A1)

国際公開第2012/038668 (WO, A1)

KURRECK J. et al., Nucleic Acids Research, 2002年, Vol.30 No.9, p.1911-1918

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90

A 61 K 31/33 - 33/44

A 61 K 48/00

A 61 K 47/00 - 47/69

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 )