

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-540271
(P2024-540271A)

(43)公表日 令和6年10月31日(2024.10.31)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28		4 C 0 8 4
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16		4 C 0 8 6
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全69頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-526502(P2024-526502)	(71)出願人	591003013
(86)(22)出願日	令和4年11月2日(2022.11.2)		エフ．ホフマンーラ ロシュ アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和6年6月4日(2024.6.4)		F．HOFFMANN-LA ROCH
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/080478		E AKTIENGESSELLSCHA
(87)国際公開番号	WO2023/078883		FT
(87)国際公開日	令和5年5月11日(2023.5.11)		スイス・シーエイチー4070バーゼル
(31)優先権主張番号	21206278.0		・グレンツアーヘルストラツセ124
(32)優先日	令和3年11月3日(2021.11.3)	(74)代理人	110001508
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士法人 津国
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(72)発明者	フー, リネット
	最終頁に続く		スイス国、4070 バーゼル、グレンツァッハーシュトラーセ124、ツェー／オー・エフ．ホフマンーラ・ロシュ・アーゲー
		(72)発明者	キールピンスキー, ウカシュ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アポリポタンパク質E4発現を調節するためのオリゴヌクレオチド

(57)【要約】

本発明は、標的細胞においてアポリポタンパク質E4 (ApoE4) の発現を調節することができるアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。オリゴヌクレオチドはAPOE ε4 mRNAにハイブリダイズすることができる。本発明は更に、例えば、アルツハイマー病 (AD)、前頭側頭型認知症 (FTD)、ピック病 (PiD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、パーキンソン病 (PD) の運動障害、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病C1型等の処置のための、オリゴヌクレオチドのコンジュゲート、医薬組成物、および方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

8～50ヌクレオチド長、例えば10～30ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号1として示されるアポリポタンパク質（Apo）E4コード核酸の516位～556位内の標的配列に少なくとも80%相補的である少なくとも10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、前記標的配列が、配列番号1の535位を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号1の535位のヌクレオチドに相補的である前記連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドが、グアニン（g）核酸塩基を含むことを条件として、前記連続ヌクレオチド配列が、任意に1個のミスマッチ、2個のミスマッチ、および3個のミスマッチから選択される、前記標的配列と比較して0～3個のミスマッチを有する、請求項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の516位～556位内の標的配列に少なくとも90%相補的である、請求項1または2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の516位～556位内の標的配列に100%相補的である、請求項1～3のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の522位～548位内の標的配列に相補的である、請求項1～4のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の残基522～535（R__25）、残基525～537（R__40）、残基526～538（R__46）、残基530～546（R__66）および残基535～548（R__91）から選択される標的配列に相補的である、請求項1～5のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号4～96からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる、請求項1～6のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号25、40、46、66および91からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる、請求項1～7のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヒト等の哺乳動物のアポリポタンパク質（Apo）E4の発現を低下させることができる、請求項1～8のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下からなる群から選択される化合物であるか、またはそれを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド：

ACcAgGcgggcgcG	（配列番号91；化合物番号91__1）
CAGggcgggcgcgcacGT	（配列番号66；化合物番号66__1）
CGcgcgacgtCCTC	（配列番号46；化合物番号46__1）
CGcgcgacgtcCCTC	（配列番号46；化合物番号46__2）
CGcGcgacgtcCCTC	（配列番号46；化合物番号46__3）
CGCGcgacgtccCCTC	（配列番号46；化合物番号46__4）

10

20

30

40

50

C G c G C a c g t c c T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 5)
G C a c g t c c t c c A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 1)
G C A c g t c c t c c a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 2)
G C a c g t c c t c C a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 3)
G C a c g t c c t C c A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 4)
G C a c g t c c t C c a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 5)
G C a c g t c c t c C A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 6)
G C g c a c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 1)
G C g c A c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 2)
G C g C a c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 3)

10

(式中、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを示し、小文字はDNAヌクレオシドを示し、大文字Cは5-メチルシトシンベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを示し、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である)。

【請求項 1 1】

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と、前記オリゴヌクレオチドに共有結合した少なくとも 1 つのコンジュゲート部分とを含む、コンジュゲート。

【請求項 1 2】

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または請求項 1 1 に記載のコンジュゲートの、薬学的に許容され得る塩。

20

【請求項 1 3】

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、および／または請求項 1 1 に記載のコンジュゲート、および／または請求項 1 2 に記載の薬学的に許容され得る塩と、薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩および／またはアジュバントとを含む、医薬組成物。

【請求項 1 4】

疾患を処置または予防する方法に使用するための、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、請求項 1 1 に記載のコンジュゲート、請求項 1 2 に記載の薬学的に許容され得る塩、または請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

30

前記疾患が、ApoE4 のインビボ活性に関連する、請求項 1 4 に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩または医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記疾患が、認知症に関連する疾患である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩または医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記疾患が、アルツハイマー病 (AD)、前頭側頭型認知症 (FTD)、ピック病 (Pick)、進行性核上性麻痺 (PSP)、パーキンソン病 (PD) 等の運動障害、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病 C1 型から選択される、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物。

40

【請求項 1 8】

前記疾患が、AD である、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲートまたは医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、APOEε4 核酸 (例えば、mRNA 転写物等) に相補的であり、アポリポタンパク質 E4 (ApoE4) の発現を低下させるために有用であるオリゴヌクレオチド (オリゴマー) に関する。APOEε4 転写物および／または ApoE4 タンパク質の発

50

現の低下は、アルツハイマー病（A D）、前頭側頭型認知症（F T D）、ピック病（P i D）、進行性核上性麻痺（P S P）、パーキンソン病（P D）等の運動障害、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病C 1型等）含むがこれらに限定されない様々な医学的障害にとって有益である。

【背景技術】

【0002】

アポリポタンパク質E（A p o E）は、脂質輸送を目的としてコレステロールおよびリン脂質等の脂質の結合に関与するリポタンパク質である。A p o Eは、主として、肝臓の肝細胞およびクッパー細胞によって産生され、同様にまた、副腎および脂肪組織から少量産生される。中枢神経系において、A p o Eの主な産生者は、健康な神経系における星状膠細胞およびミクログリアであり、疾患状態において、ミクログリアおよびニューロンはA p o E産生により多く寄与する。

10

【0003】

A p o Eは、A P O E遺伝子（O M I M 1 0 7 7 4 1）によってコードされ、これは、19番染色体に位置し、2つの共通の一塩基多型（S N P）、r s 4 2 9 3 5 8およびr s 7 4 1 2を有する。これらの結果、A p o Eの3つの主要なアイソフォーム、A p o E 2、A p o E 3およびA p o E 4がもたらされ、これらは、タンパク質における112位および158位におけるアミノ酸が異なる。A p o E 3では、それらはそれぞれシステインおよびアルギニンによって占められており、一方、A p o E 2およびA p o E 4では、両方の部位がそれぞれシステインおよびアルギニンによって占められている。

20

【0004】

アミノ酸の相違は、A p o Eアイソフォームの立体配座に影響を及ぼし、異なる脂質およびタンパク質に結合するそれらの能力に影響を及ぼす。A p o E 4は、例えば、ヘパリン硫酸結合タンパク質および超低密度リポタンパク質に結合する傾向がより高く、L D L受容体L R P 1との相互作用が低く、その結果、アミロイド斑のクリアランスが低下する。前臨床研究はまた、A p o E 4が、アミロイドβとは無関係に、血液脳関門（B B B）の崩壊、脳血流の喪失、ニューロン喪失および行動欠陥を加速させ得ることを示している（M o n t a g n e e t a l . , N a t . A g i n g 2 0 2 1 ; 1 ; 5 0 6 - 2 0）。P 3 0 1 Sマウスモデル（タウオパチーのモデル）におけるA p o E 4の存在が、星状膠細胞反応性およびミクログリア反応性に依存する様式で既に広範なタウ媒介神経変性を悪化させることが更に明らかにされている（S h i e t a l . , N a t u r e 2 0 1 7 ; 5 4 9 (7 6 7 3) : 5 2 3 - 5 2 7）。更なる研究は、同じマウスモデルにおける星状膠細胞におけるA p o E 4の選択的除去がタウ媒介性神経変性を軽減させたことを示した。

30

【0005】

一般集団におけるA p o Eの最も優勢なアイソフォームがA p o E 3であるのに対して、世界人口の3パーセント（3%）がA p o E 4についてホモ接合性であり、14%がA p o E 4の少なくとも1つのコピーを保有する。しかしながら、A p o E 4の少なくとも1つのコピーを有するA D患者の割合は37%であり、一般集団におけるよりも高い。A p o E 4はまた、正常および軽度の認知障害患者の両方においてアミロイド陽性がより高く、遅発性A Dを発症するリスクがより高いことに関連している。

40

【0006】

A p o E 4は、A D以外の他の疾患および障害に関与している。A p o E 4の存在はまた、F T Dに関連する神経変性が生じる年齢を低下させる。P Dにおいて、A p o E 4ホモ接合P D患者は、他のA p o E遺伝子型と比較してより速い認知低下速度を示し、P D患者は、A p o E 4コピー数依存的様式で認知症をより早期に発症することがわかっている。タウタンパク質関連神経病理を伴う認知障害であるP i Dにおいて、A p o E 4対立遺伝子が過剰提示されることが見出されている。A p o E 4はまた、認知症がダウン症候群において生じる年齢を低下させることが報告されている。ニーマン・ピック病C型では、患者がA p o E 4対立遺伝子を有する場合、疾患の重症度が悪化する。A p o E 4対立

50

遺伝子頻度はまた、PSPのみを有する患者と比較して、ADを伴うPSPに罹患している患者においてより高いことが示されている。

【0007】

ApoE4に関連する疾患および障害ならびに他の疾患および障害を処置するための堅固で効果的な薬剤が大いに必要とされている。

【0008】

本発明の目的

本発明の目的は、mRNA等のAPOE ϵ 4核酸を標的とし、インビボおよびインビトロで標的細胞におけるApoE4発現を低下させる、ギャップマーオリゴヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することである。

【0009】

ApoE3発現よりもApoE4発現を低下させることができるそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することもまた目的である。

【0010】

ADを含むApoE4に関連する疾患および障害を処置または予防する方法において使用するためのそのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することもまた目的である。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、ApoE4をコードする核酸を標的とし、それにより、標的細胞におけるApoE4の発現を調節することができるオリゴヌクレオチドに関する。配列番号1の516位～556位に対応するセグメントを標的とするオリゴヌクレオチド、具体的には、標的配列が、APOE ϵ 4をAPOE ϵ 3と区別する多型の部位である配列番号1の残基535に対応する残基を含むオリゴヌクレオチドを同定する。

【0012】

したがって、本発明は、配列番号1の残基535に対応する残基を含むAPOE ϵ 4核酸の標的配列に対して少なくとも80%の相補性を有する少なくとも10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む8～50、例えば10～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを提供する。

【0013】

オリゴヌクレオチドは、好ましくはギャップマー設計を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の切断によってApoE4の発現を低下させることができる。切断は、好ましくは、ヌクレアーゼ動員を介して達成される。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、ApoE3の発現を低下させるよりもApoE4の発現を低下させることができる。

【0014】

更なる態様において、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、塩、および／またはアジュバントと、を含む、医薬組成物を提供する。

【0015】

更なる態様において、本発明は、本発明のオリゴヌクレオチドまたは組成物を有効量でApoE4を発現している標的細胞に投与することによって、当該細胞におけるApoE4発現を調節するための方法を提供する。方法には、インビボおよびインビトロ方法が含まれる。

【0016】

更なる態様において、本発明は、ApoE4のインビボ活性または発現レベルと関連する疾患、障害、または機能障害を処置または予防するための方法であって、治療的または予防的有効量の本発明のオリゴヌクレオチドを、上記疾患、障害、または機能障害に罹患しているか、またはそのリスクがある対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0017】

特定の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドまたは組成物は、ADの処置または

10

20

30

40

50

予防に使用される。

【0018】

定義

オリゴヌクレオチド

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」という用語は、2つ以上の共有結合したヌクレオシドを含む分子として当業者によって一般的に理解されるように規定される。このような共有結合したヌクレオシドはまた、核酸分子またはオリゴマーとも称され得る。オリゴヌクレオチドは、通常、固相化学合成と、その後の精製および単離によって研究室内で作製される。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合には、共有結合したヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸塩基部分の配列または順序、もしくはその修飾が言及される。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工であり、化学的に合成され、典型的には精製または単離される。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば2'糖修飾ヌクレオシド等の1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含んでもよい。

10

【0019】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書で使用される場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」という用語は、標的核酸、特に標的核酸上の連続配列にハイブリダイズすることによって標的遺伝子の発現を調節することができるオリゴヌクレオチドとして定義される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一本鎖形態、二本鎖形態、本質的に一本鎖形態、または本質的に二本鎖形態で提供され得る。例えば、本質的に二本鎖ではなく、したがってsiRNAまたはshRNAではないとして提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが企図される。好ましくは、そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖である。二重鎖形態等の本質的に二本鎖形態で提供されるアンチセンスオリゴヌクレオチドも企図される。一本鎖オリゴヌクレオチドは、イントラまたはインター自己間相補性の程度がオリゴヌクレオチドの全長にわたって約50%を超える限り、ヘアピンまたは分子間二重鎖構造（同じオリゴヌクレオチドの2つの分子間の二重鎖）を形成することもできる。

20

【0020】

連続ヌクレオチド配列

「連続ヌクレオチド配列」という用語は、標的核酸または標的配列に相補的なオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書で「連続核酸塩基配列」という用語および「オリゴヌクレオチドモチーフ配列」という用語と互換的に用いられる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドは、連続ヌクレオチド配列を構成する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド配列、例えばF-G-F'ギャップマー領域を含み、任意に、更なるヌクレオチド（複数可）、例えば、官能基を連続ヌクレオチド配列に結合するのに使用され得るヌクレオチドリンカー領域を含んでもよい。ヌクレオチドリンカー領域は、標的核酸に対して相補的であっても相補的でなくてもよい。オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、それ自体としてオリゴヌクレオチドより長くなることはできないことと、オリゴヌクレオチドは連続ヌクレオチド配列より短くなることはできないことと、が理解される。

30

【0021】

ヌクレオチド

ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドおよ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は、天然に存在するヌクレオチドおよび非天然のヌクレオチドの両方を含む。本来、DNAヌクレオチドおよびRNAヌクレオチド等のヌクレオチドは、リボース糖部分、核酸塩基部分、および1つ以上のリン酸基（ヌクレオシドには存在しない）を含む。ヌクレオシドおよびヌクレオチドはまた、互換的に「単位」または「モノマー」と呼ぶことができる。

40

【0022】

修飾ヌクレオシド

本明細書で使用される場合、「修飾ヌクレオシド」または「ヌクレオシド修飾」という

50

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

【0023】

修飾ヌクレオシド間結合

「修飾ヌクレオシド間結合」という用語は、2つのヌクレオシドをともに共有結合する、ホスホジエステル（PO）結合以外の結合として当業者に一般的に理解されるように規定される。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増大させる。天然に存在するオリゴヌクレオチドでは、ヌクレオシド間結合は、隣接するヌクレオシド間のホスホジエステル結合を生成するリン酸基を含む。修飾ヌクレオシド間結合は、インビボ使用のためのオリゴヌクレオチドの安定化に特に有用であり、本発明のオリゴヌクレオチドのDNAまたはRNAヌクレオシドの領域、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域G内、ならびに領域FおよびF'等の修飾ヌクレオシドの領域におけるヌクレアーゼ切断から保護する役割を果たし得る。

【0024】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾ヌクレオシド間結合が、例えばヌクレアーゼ攻撃に対してより耐性であるように、天然のホスホジエステルから修飾された1つ以上のヌクレオシド間結合を含む。ヌクレアーゼ耐性は、オリゴヌクレオチドを血清中でインキュベートすることにより、またはヌクレアーゼ耐性アッセイ（例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ（SVPD））を用いることにより決定され得、これらは両方とも当技術分野で周知である。オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増強することができるヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合と称される。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列の少なくとも50%のヌクレオシド間結合が修飾され、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列の例えば少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも75%、例えば少なくとも80%、または例えば少なくとも90%のヌクレオシド間結合が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列のヌクレオシド間結合の全部は、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態において、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に結合するヌクレオシドは、ホスホジエステルであり得ることが認識されるであろう。

【0025】

修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオアート、ジホスホロチオアートおよびボラノホスファートを含む群より選択され得る。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合、例えば、ホスホロチオアート、ジホスホロチオアートまたはボラノホスファートは、本発明のオリゴヌクレオチドのRNAseH動員（recruitment）と適合する。

【0026】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の中性ヌクレオシド間結合、特にホスホトリエステル、メチルホスホナート、MMI、アミドー3、ホルムアセタールまたはチオホルムアセタールから選択されるヌクレオシド間結合を含む。

【0027】

更なるヌクレオシド間結合は国際公開第2009/124238号（参照により本明細

10

20

30

40

50

書に組み込まれる)に開示されている。一実施形態において、ヌクレオシド間結合は、国際公開第2007/031091号(参照により本明細書に組み込まれる)に開示されるリンカーから選択される。特に、ヌクレオシド間結合は、 $-O-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O, S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$ 、 $-S-P(O)_2-O-$ 、 $-S-P(O, S)-O-$ 、 $-S-P(S)_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-S-$ 、 $-O-P(O, S)-S-$ 、 $-S-P(O)_2-S-$ 、 $-O-PO(R^H)-O-$ 、 $O-PO(OCH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NR^H)-O-$ 、 $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NHR^H)-O-$ 、 $-O-P(O)_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ 、 $-NR^H-CO-NR^H-$ から選択することができるか、および/またはヌクレオシド間リンカーは、以下、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CO-NR^H-CH_2-$ 、 $-CH_2-NR^H-CO-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-SO_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-CO-$ 、 $-CH_2-NCH_3-O-CH_2-$ からなる群から選択されてもよく、 R^H は水素およびC1-4-アルキルから選択される。

10

【0028】

ホスホロチオエートヌクレオシド間結合

1つの好ましい修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートである。ホスホロチオエートヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性、有益な薬物動態、および製造の容易さに起因して、特に有用である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列の少なくとも50%のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートであり、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列の例えば少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも80%、または例えば少なくとも90%のヌクレオシド間結合がホスホロチオエートである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列のヌクレオシド間結合の全てが、ホスホロチオエートである。

20

【0029】

ホスホロチオエート結合等のヌクレアーゼ耐性結合は、標的核酸と二重鎖を形成するときにヌクレアーゼを動員することができるオリゴヌクレオチド領域、例えばギャップマーの領域Gにおいて特に有用である。しかしながら、ホスホロチオエート結合は、非ヌクレアーゼ動員領域および/または親和性増強領域、例えばギャップマーの領域FおよびF'においても有用であり得る。ギャップマー型オリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態において、領域FもしくはF'、または領域FおよびF'の両方に1つ以上のホスホジエステル結合を含んでもよく、領域Gのヌクレオシド間結合は、完全にホスホロチオエートであってもよい。

30

【0030】

有利には、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列の全ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0031】

欧州特許第2742135号に開示されているように、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、他のヌクレオシド間結合(ホスホジエステルおよびホスホロチオエート以外)、例えば、欧州特許第2742135号によれば別のDNAホスホロチオエートのギャップ領域内で耐性であり得る、アルキルホスホネート/メチルホスホネートヌクレオシド間結合等を含んでもよいことが認識されよう。

40

【0032】

核酸塩基

核酸塩基という用語は、ヌクレオシドおよびヌクレオチドに存在するプリン(例えばアデニンおよびグアニン)およびピリミジン(例えばウラシル、チミンおよびシトシン)部分を含み、これらは核酸ハイブリダイゼーションにおいて水素結合を形成する。本発明の

50

文脈において、核酸塩基という用語は、天然に存在する核酸塩基とは異なり得るが、核酸ハイブリダイゼーション中に機能的である修飾核酸塩基も包含する。この文脈において、「核酸塩基」とは、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、キサンチン、およびヒポキサンチン等の天然に存在する核酸塩基と、天然に存在しないバリエーションとの両方を指す。そのようなバリエーションは、例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45, page 2055、Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1.4.1、またはPCT/EP2021/065266に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0033】

いくつかの実施形態において、核酸塩基部分は、プリンまたはピリミジン修飾プリンまたはピリミジン、例えば置換プリンまたは置換ピリミジン、例えばイソシトシン、シュードイソシトシン、5-メチルシトシン、5-チオゾロシトシン、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、7-デアザ-8-アザグアニン、および2-クロロ-6-アミノプリンから選択される核酸塩基に変えることにより修飾される。

【0034】

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

20

【0035】

修飾オリゴヌクレオチド

修飾オリゴヌクレオチドという用語は、1つ以上の糖修飾ヌクレオチドおよび／または修飾ヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチドを表す。「キメラ」オリゴヌクレオチドという用語は、修飾ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを表すために文献で使われている用語である。

30

【0036】

相補性

「相補性」という用語は、ヌクレオチド／ヌクレオチドのWatson-Crick塩基対形成の能力を表す。ワトソン・クリック塩基対は、グアニン(G)-シトシン(C)およびアデニン(A)-チミン(T)/ウラシル(U)である。オリゴヌクレオチドは修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを含んでもよく、例えば5-メチルシトシンは、しばしばシトシンの代わりに用いられ、したがって、相補性という用語は、非修飾核酸塩基と修飾核酸塩基との間のワトソン・クリック塩基対合を包含することが理解されよう(例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45, page 2055 and Bergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37, 1.4.1を参照されたい)。

40

【0037】

本明細書で使われる場合、「%相補的」という用語は、連続ヌクレオチド配列にわたって参照配列(例えば、標的配列または配列モチーフ)に相補的である、核酸分子(例えば、オリゴヌクレオチド)の連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドの割合(パーセント)を指す。相補性のパーセンテージは、2つの配列間(標的配列5'-3'と3'-5'からのオリゴヌクレオチド配列とを整列させた場合)で相補的である(ワトソン・クリック塩基対合から)整列した核酸塩基の数を数え、その数をオリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数で割り、100を掛けることによって計算される。このような比較において、整列

50

(塩基対を形成)しない核酸塩基／ヌクレオチドは、ミスマッチと称される。挿入および欠失は、連続ヌクレオチド配列の%相補性の計算において許容されない。相補性の決定において、核酸塩基の化学的修飾は、核酸塩基がワトソン・クリック塩基対合を形成する機能的能力が保持される限り、無視されることが理解されるであろう(例えば、5-メチルシトシンは、%同一性の計算の目的のために、シトシンと同一であると見なされる)。

【0038】

「完全に相補的な」という用語は、100%の相補性を指す。

【0039】

同一性

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

【0040】

ハイブリダイゼーション

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

10

20

30

40

50

ブリダイゼーションの程度または強度は、標準状態ギブス自由エネルギー ΔG° により測定される。オリゴヌクレオチドは、8～30ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドに対して -10 kcal の範囲未満、例えば -15 kcal 未満、例えば -20 kcal 未満、および例えば -25 kcal 未満の推定 ΔG° 値で標的核酸にハイブリダイズし得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、 -10 から -60 kcal 、例えば -12 から -40 、例えば -15 から -30 kcal 、または -16 から -27 kcal 、例えば -18 から -25 kcal の推定 ΔG° 値で、標的核酸にハイブリダイズする。

【0041】

標的核酸

本発明によれば、標的核酸は、哺乳動物ApoE4をコードする核酸であり、例えば遺伝子、RNA、mRNA、プレmRNA、成熟mRNAまたはcDNA配列であり得る。したがって、標的は、ApoE4標的核酸またはAPOE ϵ 4標的核酸と称され得、これらの用語は互換的に使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、APOE ϵ 4プレ-mRNAまたはmRNAを標的とし得る。

【0042】

適切には、標的核酸は、ApoE4タンパク質、特に、哺乳動物ApoE4タンパク質、例えば、ヒトApoE4タンパク質をコードする。

【0043】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号1の少なくとも残基522～548を含み、哺乳動物、例えば、ヒトのApoE4タンパク質をコードする。

【0044】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号1の少なくとも残基516～556を含み、哺乳動物、例えば、ヒトのApoE4タンパク質をコードする。

【0045】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号1、または、ヒト等の哺乳動物のApoE4タンパク質をコードするその任意の天然に存在するバリエーションである。したがって、標的核酸は配列番号1であり得る。

【0046】

配列番号2は、NCBI参照配列：NM_001302690.2 (Genbank) に示されるヒトApoE核酸であり、ヒトApoE3アイソフォームをコードする。配列番号2は、rs429358一塩基多型 (SNP) のため、残基535が配列番号1とは異なる。

【0047】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、t535c置換を有する配列番号2の少なくとも残基522～548を含み、哺乳動物、例えば、ヒトのApoE4タンパク質をコードする。

【0048】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、t535c置換を有する配列番号2の少なくとも残基516～556を含み、哺乳動物、例えば、ヒトのApoE4タンパク質をコードする。

【0049】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、t535c置換を有する配列番号2、または哺乳動物、例えば、ヒトのApoE4タンパク質をコードするその任意の天然に存在するバリエーションである。したがって、標的核酸は、t535c置換を有する配列番号2であり得る。

【0050】

いくつかの実施形態において、標的核酸はカニクイザルApoE4タンパク質をコードする。好適には、カニクイザルApoE4タンパク質をコードする標的核酸は、配列番号3に示す配列を含む。

【0051】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号3の少なくとも残基450～490を含み、哺乳動物、例えば、カニクイザル、A p o E 4タンパク質をコードする。

【0052】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号3の少なくとも残基456～482を含み、哺乳動物、例えば、カニクイザル、A p o E 4タンパク質をコードする。

【0053】

いくつかの実施形態において、標的核酸は、配列番号3、または、カニクイザル等の哺乳動物のA p o E 4タンパク質をコードするその任意の天然に存在するバリエーションである。したがって、標的核酸は配列番号3であり得る。

【0054】

本発明のオリゴヌクレオチドを研究または診断に使用する場合、標的核酸は、c D N A、またはD N AもしくはR N Aに由来する合成核酸であり得る。

【0055】

インビボまたはインビトロ適用のために、本発明のオリゴヌクレオチドは、典型的には、A P O E ε 4標的核酸を発現している細胞におけるA p o E 4タンパク質の発現を低下させることができる。本発明のオリゴヌクレオチドの核酸塩基の連続配列は、典型的には、オリゴヌクレオチドの長さによって測定して、任意に1つまたは2つのミスマッチを除いて、また任意にオリゴヌクレオチドをコンジュゲート等の任意の官能基に結合し得るヌクレオチドベースのリンカー領域、または他の非相補的末端ヌクレオチド（例えば、領域D'またはD''）を除いて、A P O E ε 4標的核酸に相補的である。

【0056】

配列番号1～3をD N A配列として提示する。標的R N A配列は、チミン塩基（T）の代わりにウラシル（U）塩基を有することが理解される。

【0057】

標的核酸は、有利には、成熟m R N Aまたはプレm R N A等のメッセンジャーR N Aである。

【0058】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは配列番号1を標的とする。

【0059】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、t 5 3 5 c置換を有する配列番号2を標的とする。

【0060】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは配列番号3を標的とする。

【0061】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは配列番号1および配列番号3を標的とする。

【0062】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号1、t 5 3 5 c置換を有する配列番号2および配列番号3を標的とする。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 標的核酸の例

種	R N A 型	長さ (n t)	配列番号	追加情報：
ヒト (ホモサピエンス)	成熟m R N A		1	N C B I 参照配列に対応：t 5 3 5 c 置換を有するNM__0 0 1 3 0 2 6 9 0. 2 (G e n b a n k)
カニクイザル (マカカ・ファシクラリス (m a c a c a f a s c i c u l a r i s))	成熟m R N A		3	N C B I 参照配列に対応：X M ____ 0 0 5 5 8 9 5 5 4. 2 (G e n b a n k)

10

【0 0 6 3】

標的配列

本明細書で使用される場合、「標的配列」という用語は、本発明のオリゴヌクレオチドに相補的な核酸塩基配列を含む、標的核酸中に存在するヌクレオチドの配列を指す。標的核酸のこの領域は、互換的に標的ヌクレオチド配列、標的配列、または標的領域と称され得る。

【0 0 6 4】

いくつかの実施形態において、標的配列は、本発明のオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列に相補的な核酸塩基配列を有する標的核酸上の領域からなる。いくつかの実施形態において、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とされ得る標的核酸の好ましい領域を表し得る。

20

【0 0 6 5】

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

【0 0 6 6】

オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子に存在する標的配列に相補的な連続ヌクレオチド配列を含む。連続ヌクレオチド配列（およびそれ故、標的配列）は、少なくとも 8 個、例えば少なくとも 9 個、例えば少なくとも 1 0 個の連続ヌクレオチド、例えば、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9 または 3 0 個の連続ヌクレオチド、例えば、1 2 ～ 2 5 個、例えば、1 4 ～ 1 8 個の連続ヌクレオチドを含む。

30

【0 0 6 7】

好ましくは、標的配列は、R N A、例えばプレーm R N A、成熟m R N A またはその両方に位置する。

【0 0 6 8】

標的配列は、r s 4 2 9 3 5 8 S N P の部位に対応する、配列番号 1 の 5 3 5 位にシトシン (c) 残基を含む。

40

【0 0 6 9】

いくつかの実施形態において、標的配列は、配列番号 1 の残基 5 1 6 ～ 5 5 6 によって定義されるセグメント内の領域に位置する。

【0 0 7 0】

いくつかの実施形態において、標的配列は、配列番号 1 の残基 5 2 2 ～ 5 4 8 によって定義されるセグメント内の領域に位置する。

【0 0 7 1】

いくつかの実施形態において、標的配列は、配列番号 3 の 4 6 9 位にシトシン (c) を含む。

50

【0072】

いくつかの実施形態において、標的配列は、配列番号3の残基450～490によって定義されるセグメント内の領域に位置する。

【0073】

いくつかの実施形態において、標的配列は、配列番号3の残基456～482によって定義されるセグメント内の領域に位置する。

【0074】

いくつかの実施形態において、標的配列は、表2に記載されるものから選択される配列である。

【0075】

いくつかの実施形態において、標的配列は、R__25、R__40、R__46、R__66およびR__91から、例えば、R__25、R__40およびR__46から選択される。

【0076】

一実施形態において、標的配列は、配列番号1の残基522～535に対応するR__25である。

【0077】

一実施形態において、標的配列は、配列番号1の残基525～537に対応するR__40である。

【0078】

一実施形態において、標的配列は、配列番号1の残基526～538に対応するR__46である。

【0079】

一実施形態において、標的配列は、配列番号1の残基530～546に対応するR__66である。

【0080】

一実施形態において、標的配列は、配列番号1の残基535～548に対応するR__91である。

【0081】

標的RNA配列領域は、任意のチミン（T）塩基の代わりにウラシル（U）塩基を有すると理解されるべきである。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 配列番号 1 上の標的配列の例

参照	配列番号 1 における位置	
	開始	停止
R__4	5 1 6	5 3 5
R__5	5 1 7	5 3 6
R__6	5 1 7	5 3 5
R__7	5 1 8	5 3 8
R__8	5 1 8	5 3 7
R__9	5 1 8	5 3 6
R__1 0	5 1 8	5 3 5
R__1 1	5 1 9	5 3 8
R__1 2	5 1 9	5 3 7
R__1 3	5 1 9	5 3 6
R__1 4	5 1 9	5 3 5
R__1 5	5 2 0	5 3 9
R__1 6	5 2 0	5 3 8
R__1 7	5 2 0	5 3 7
R__1 8	5 2 0	5 3 6
R__1 9	5 2 0	5 3 5
R__2 0	5 2 1	5 4 0
R__2 1	5 2 1	5 3 9
R__2 2	5 2 1	5 3 8
R__2 3	5 2 1	5 3 7
R__2 4	5 2 1	5 3 6
R__2 5	5 2 2	5 3 5
R__2 6	5 2 2	5 4 1
R__2 7	5 2 2	5 4 0
R__2 8	5 2 2	5 3 9
R__2 9	5 2 2	5 3 7
R__3 0	5 2 3	5 4 2
R__3 1	5 2 3	5 4 1
R__3 2	5 2 3	5 4 0
R__3 3	5 2 3	5 3 9
R__3 4	5 2 3	5 3 8
R__3 5	5 2 4	5 4 3
R__3 6	5 2 4	5 4 2
R__3 7	5 2 4	5 4 1
R__3 8	5 2 4	5 4 0
R__3 9	5 2 4	5 3 9
R__4 0	5 2 5	5 3 7
R__4 1	5 2 5	5 4 4
R__4 2	5 2 5	5 4 3
R__4 3	5 2 5	5 4 2
R__4 4	5 2 5	5 4 1
R__4 5	5 2 5	5 4 0
R__4 6	5 2 6	5 3 8
R__4 7	5 2 6	5 4 5

10

20

30

40

50

R__4 8	5 2 6	5 4 4
R__4 9	5 2 6	5 4 3
R__5 0	5 2 6	5 4 1
R__5 1	5 2 7	5 4 6
R__5 2	5 2 7	5 4 5
R__5 3	5 2 7	5 4 4
R__5 4	5 2 7	5 4 3
R__5 5	5 2 7	5 4 2
R__5 6	5 2 8	5 4 7
R__5 7	5 2 8	5 4 6
R__5 8	5 2 8	5 4 5
R__5 9	5 2 8	5 4 4
R__6 0	5 2 8	5 4 3
R__6 1	5 2 9	5 4 8
R__6 2	5 2 9	5 4 7
R__6 3	5 2 9	5 4 6
R__6 4	5 2 9	5 4 5
R__6 5	5 2 9	5 4 4
R__6 6	5 3 0	5 4 6
R__6 7	5 3 0	5 4 9
R__6 8	5 3 0	5 4 8
R__6 9	5 3 0	5 4 7
R__7 0	5 3 0	5 4 5
R__7 1	5 3 1	5 5 0
R__7 2	5 3 1	5 4 9
R__7 3	5 3 1	5 4 8
R__7 4	5 3 1	5 4 7
R__7 5	5 3 1	5 4 6
R__7 6	5 3 2	5 5 1
R__7 7	5 3 2	5 5 0
R__7 8	5 3 2	5 4 9
R__7 9	5 3 2	5 4 8
R__8 0	5 3 2	5 4 7
R__8 1	5 3 3	5 5 2
R__8 2	5 3 3	5 5 1
R__8 3	5 3 3	5 5 0
R__8 4	5 3 3	5 4 9
R__8 5	5 3 3	5 4 8
R__8 6	5 3 4	5 5 3
R__8 7	5 3 4	5 5 2
R__8 8	5 3 4	5 5 1
R__8 9	5 3 4	5 5 0
R__9 0	5 3 4	5 4 9
R__9 1	5 3 5	5 4 8
R__9 2	5 3 5	5 5 4
R__9 3	5 3 5	5 5 3
R__9 4	5 3 5	5 5 2
R__9 5	5 3 5	5 5 1
R__9 6	5 3 5	5 5 0

10

20

30

40

【0082】

標的細胞

本明細書で使用される場合、「標的細胞」という用語は、標的核酸を発現している細胞を指す。いくつかの実施形態において、標的細胞は、インビボまたはインビトロであり得る。いくつかの実施形態において、標的細胞は、哺乳動物細胞、例えばげっ歯類細胞、例えばマウス細胞もしくはラット細胞、または霊長類細胞、例えばサル細胞（例えばカニクイザル細胞）もしくはヒト細胞である。

【0083】

好ましい実施形態において、標的細胞は、ヒト ApoE4 mRNA、例えば ApoE

50

4 プレ m R N A、例えば配列番号 1、または A p o E 4 成熟 m R N A を発現する。いくつかの実施形態において、標的細胞は、カニクイザル A p o E 4 m R N A、例えば、A p o E 4 成熟 m R N A、例えば、配列番号 3 を発現し、A p o E 4 m R N A のポリ A テールはどれも、典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドターゲティングのために無視される。

【0084】

天然に存在するバリエーション

「天然に存在するバリエーション」という用語は、標的核酸と同じ遺伝子座に由来する A P O E ε 4 遺伝子または転写物のバリエーションを指すが、例えば、同じアミノ酸をコードする多数のコドンを引き起こす遺伝暗号の縮重、またはプレ m R N A の選択的スプライシング、または r s 4 2 9 3 5 8 S N P (サイレント S N P を含む) 以外の一塩基多型 (S N P) 等の多型の存在、および対立遺伝子バリエーションによって異なり得る。オリゴヌクレオチドに対する十分な相補的な配列の存在に基づいて、本発明のオリゴヌクレオチドは、したがって、標的核酸およびその天然に存在するバリエーションを標的とし得る。

10

【0085】

いくつかの実施形態において、天然に存在するバリエーションは、哺乳動物 A p o E 4 標的核酸、例えば配列番号 1 および 3 からなる群から選択される標的核酸に対して少なくとも 95%、例えば少なくとも 98% または少なくとも 99% 相同性を有する。いくつかの実施形態において、天然に存在するバリエーションは、配列番号 1 のヒト A P O E ε 4 標的核酸に対して少なくとも 99% 相同性を有する。

20

【0086】

発現の調節

本明細書で使用される場合、「発現の調節」という用語は、オリゴヌクレオチドの投与前の A p o E 4 タンパク質または A p o E 4 m R N A の量と比較して、A p o E 4 タンパク質または A p o E 4 m R N A の量を変化させるオリゴヌクレオチドの能力の全体的な用語として理解されるべきである。あるいは、発現の調節は、対照実験を参照することによって決定され得る。対照は、生理食塩水組成物で処置された個体もしくは標的細胞、または非標的化オリゴヌクレオチド (モック) で処置された個体もしくは標的細胞であると一般的に理解されている。

【0087】

調節の 1 つのタイプは、例えば A p o E 4 m R N A の分解または転写の遮断により、A p o E 4 の発現を阻害、減少、低減、抑制、除去、停止、遮断、防止、減少、低下、回避、または終了するオリゴヌクレオチドの能力である。

30

【0088】

高親和性修飾ヌクレオシド

高親和性修飾ヌクレオシドは、修飾されたヌクレオチドであり、これは、オリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、例えば融解温度 (T^m) によって測定されるように、その相補的標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を高める。本発明の高親和性修飾ヌクレオシドは、好ましくは、修飾ヌクレオシドあたり +0.5 ~ +12 °C、より好ましくは +1.5 ~ +10 °C、最も好ましくは +3 ~ +8 °C の融解温度の上昇をもたらす。数多くの高親和性修飾ヌクレオシドが当該技術分野において知られており、例えば、多くの 2' 置換ヌクレオシドおよびロックド核酸 (LNA) が挙げられる (例えば、Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 および Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3 (2), 293-213 を参照されたい)。

40

【0089】

糖修飾

本発明のオリゴマーは、修飾された糖部分、すなわち、DNA および RNA に見られるリボース糖部分と比較して、糖部分が修飾された 1 つ以上のヌクレオシドを含み得る。

【0090】

50

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

【0091】

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

10

【0092】

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

【0093】

2'糖修飾ヌクレオシド

2'糖修飾ヌクレオシドは、2'位にHまたは-OH以外の置換基を有するか（2'置換ヌクレオシド）、または2'炭素とリボース環上の第2の炭素との間に架橋を形成することができる2'結合ビラジカルを含むヌクレオシド、例えばLNA（2'-4'ビラジカル架橋）ヌクレオシドである。

20

【0094】

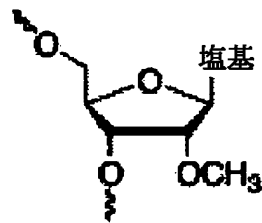
実際、2'糖置換ヌクレオシドの開発には多くの注目が集まっており、数多くの2'置換ヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドに組み込まれた際に有益な特性を有することが見出されている。例えば、2'修飾糖は、高められた結合親和性および／または増大されたヌクレアーゼ耐性をオリゴヌクレオチドにもたらすことができる。2'置換修飾ヌクレオシドの例は、2'-O-アルキル-RNAヌクレオシド、2'-O-メチル-RNAヌクレオシド、2'-アルコキシ-RNAヌクレオシド、2'-O-メトキシエチル-RNA（MOE）ヌクレオシド、2'-アミノ-DNAヌクレオシド、2'-フルオロ-RNAヌクレオシドおよび2'-F-ANAヌクレオ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

30

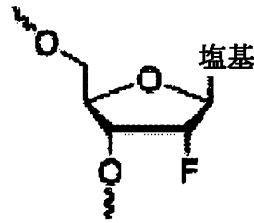
40

50

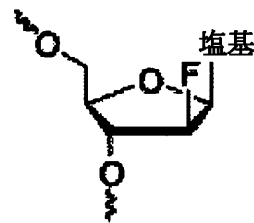
【化 1】



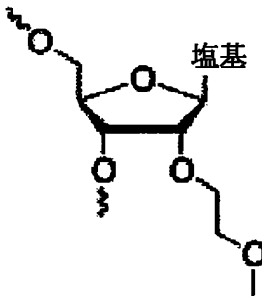
2'-O-Me



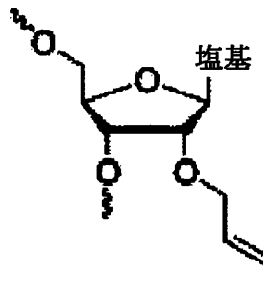
2'-F-RNA



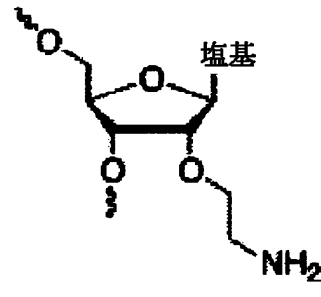
2'-F-ANA



2'-O-MOE



2'-O-アシル



2'-O-エチルアミン

【0095】

ロックド核酸ヌクレオシド (LNAヌクレオシド)

「LNAヌクレオシド」は、該ヌクレオシドのリボース糖環のC2'とC4'とを結合するバイラジカル(「2'-4'架橋」とも称される)を含む2'糖修飾ヌクレオシドであり、これはリボース環の立体配座を制限または固定する。これらのヌクレオシドはまた、文献において、架橋核酸または二環式核酸(BNA)とも称されている。リボースの立体配座の固定は、LNAが相補的RNAまたはDNA分子のオリゴヌクレオチドに組み込まれる場合、ハイブリダイゼーションの親和性の向上(二重鎖安定化)に関連している。これは、オリゴヌクレオチド/相補二重鎖の融解温度を測定することによって、日常的に決定され得る。

【0096】

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

【0097】

更なる非限定的な、例示的LNAヌクレオシドを、スキーム1に開示する。

スキーム1:

10

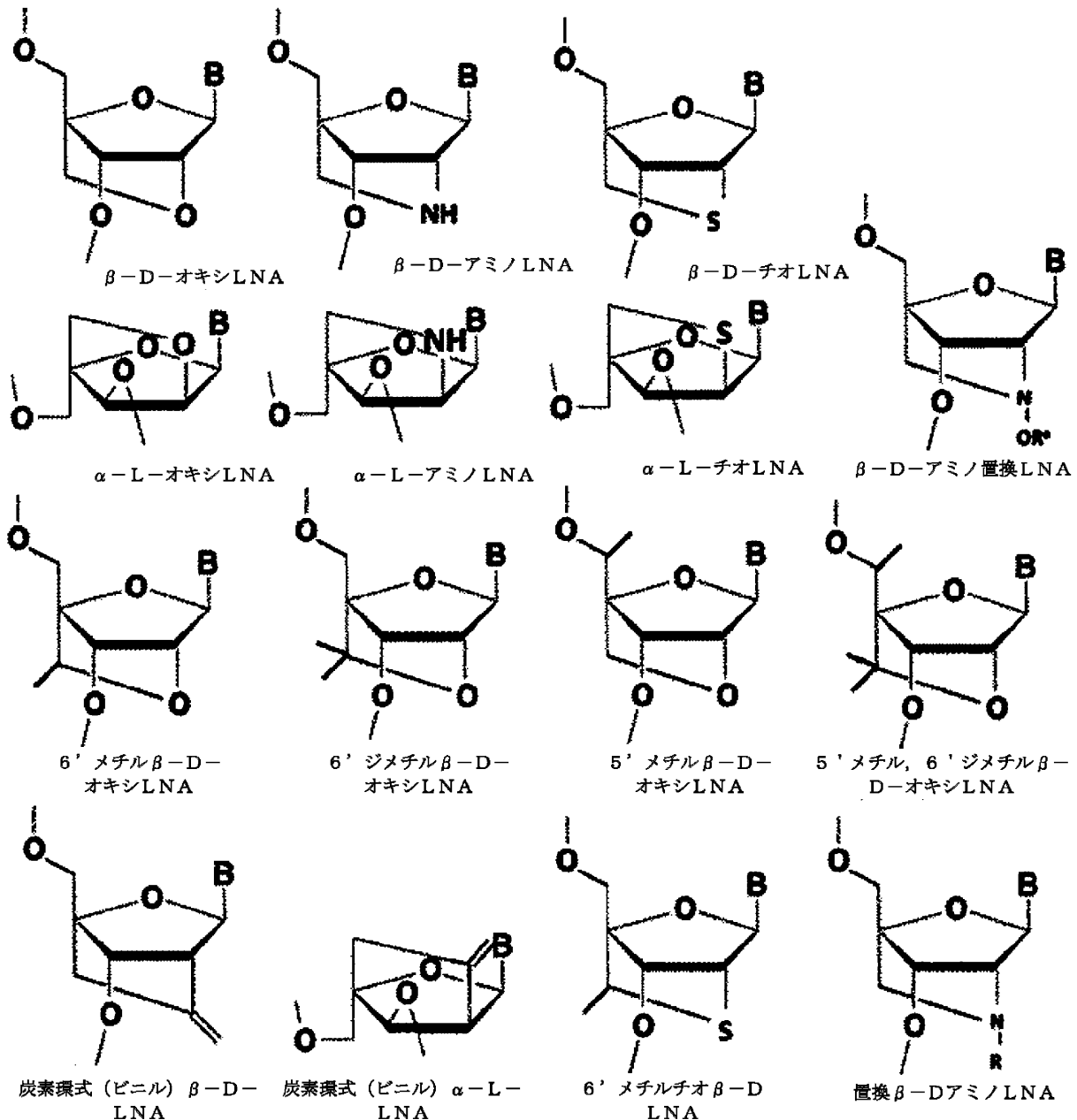
20

30

40

50

【化 2】



【0098】

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

【0099】

化学基の定義

本明細書において、「アルキル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、1～8個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖アルキル基、特に1～6個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖アルキル基、より具体的には1～4個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖アルキル基を意味する。直鎖および分岐鎖C₁～C₈アルキル基の例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、異性体ペンチル、異性体ヘキシル、異性体ヘプチル、および異性体オクチル、特に、メチル、エチル、プロピル、ブチル、およびペンチルである。アルキルの特定の例は、メチル、エチル、およびプロピルである。

【0100】

「シクロアルキル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、3～8個の炭素原子を有するシクロアルキル環、特に3～6個の炭素原子を有するシクロアルキル環を意味する。シクロアルキルの例は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチル、より詳細にはシクロプロピルおよびシクロブチルである。「シクロアルキル」の具体的な例は、シクロプロピルである。

【0101】

「アルコキシ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、式アルキル-O-の基を意味し、「アルキル」という用語、前に付与した意味、例えばメトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシおよび*tert*-ブトキシを意味する。具体的な「アルコキシ」は、メトキシおよびエトキシである。メトキシエトキシは、「アルコキシアルコキシ」の具体的な例である。

10

【0102】

「オキシ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、-O-基を意味する。

【0103】

「アルケニル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、オレフィン結合と、8個まで、好ましくは6個まで、特に好ましくは4個までの炭素原子とを含む直鎖または分岐炭化水素残基を意味する。アルケニル基の例は、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニルおよびイソブテニルである。

20

【0104】

「アルキニル」という用語は、単独または組合せで、三重結合と、最大8個まで、好ましくは最大6個まで、特に好ましくは最大4個までの炭素原子とを含む直鎖または分岐炭化水素残基を意味する。

【0105】

「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を意味し、特に、フッ素、塩素、または臭素、より具体的にはフッ素を意味する。「ハロ」という用語は、別の基と組み合わせて、少なくとも1つのハロゲン、特に、1～5個のハロゲン、特に、1～4個のハロゲン、すなわち、1個、2個、3個または4個のハロゲンで置換された、当該基の置換を意味する。

30

【0106】

「ハロアルキル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、少なくとも1個のハロゲンで置換された、特に1～5個のハロゲンで置換された、特に1～3個のハロゲンで置換されたアルキル基を表す。ハロアルキルの例としては、モノフルオロー、ジフルオローまたはトリフルオローメチル、-エチルまたは-プロピル、例えば3, 3, 3-トリフルオロプロピル、2-フルオロエチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、フルオロメチルまたはトリフルオロメチルが挙げられる。フルオロメチル、ジフルオロメチルおよびトリフルオロメチルは、具体的な「ハロアルキル」である。

【0107】

「ハロシクロアルキル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、少なくとも1個のハロゲンで置換された、特に1～5個のハロゲンで置換された、特に1～3個のハロゲンで置換された、上に規定したシクロアルキル基を表す。「ハロシクロアルキル」の具体的な例は、ハロシクロプロピル、特にフルオロシクロプロピル、ジフルオロシクロプロピルおよびトリフルオロシクロプロピルである。

40

【0108】

「ヒドロキシル」および「ヒドロキシ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、-OH基を意味する。

【0109】

「チオヒドロキシル」および「チオヒドロキシ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、-SH基を意味する。

50

【0110】

「カルボニル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-C(O)-$ 基を意味する。

【0111】

「カルボキシ」または「カルボキシル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-COOH$ 基を意味する。

【0112】

「アミノ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、第一級アミノ基 ($-NH_2$)、第二級アミノ基 ($-NH-$)、または第三級アミノ基 ($-N-$) を意味する。

【0113】

「アルキルアミノ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、1つまたは2つの上に規定したアルキル基で置換された、上に規定したアミノ基を意味する。

【0114】

「スルホニル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-SO_2$ 基を意味する。

【0115】

「スルフィニル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-SO-$ 基を意味する。

【0116】

「スルファニル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-S-$ 基を意味する。

【0117】

「シアノ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-CN$ 基を意味する。

【0118】

「アジド」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-N_3$ 基を意味する。

【0119】

「ニトロ」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 NO_2 基を意味する。

【0120】

「ホルミル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-C(O)H$ 基を意味する。

【0121】

「カルバモイル」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-C(O)NH_2$ 基を意味する。

【0122】

「カバミド」という用語は、単独でまたは組み合わせて、 $-NH-C(O)-NH_2$ 基を意味する。

【0123】

「アリール」という用語は、単独でまたは組み合わせて、任意に、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニル、およびホルミルから独立して選択される1から3個の置換基で置換された、6から10個の炭素環原子を含む、一価芳香族炭素環式単環または二環式環系を示す。アリールの例としては、フェニルおよびナフチル、特にフェニルが挙げられる。

【0124】

「ヘテロアリール」という用語は、単独でまたは組み合わせて、N、OおよびSから選択される1、2、3または4個のヘテロ原子を含み、残りの環原子は、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニルオキシ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、アルキルカルボニルおよびホルミルから独立して選択される1～3個の置換基で任意に置換された炭素である、5～12個の環原子の一価芳香族複素環式単環または二環式環系を示す。ヘテロアリールの例としては、ピロリル、フラニル、チエニル、イミダゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、トリアゾニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、トリアジニル、アゼピニル、ジアゼピニル、イソオキサゾリル、ベンゾフラニル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、インドリル、イソ

10

20

30

40

50

インドリル、イソベンゾフラニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾトリアゾリル、プリニル、キノリニル、イソキノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、カルバゾリルまたはアクリジニルが挙げられる。

【0125】

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

10

20

【0126】

薬学的に許容され得る塩

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

30

40

【0127】

保護基

「保護基」という用語は、単独でまたは組み合わせて、化学反応が別の保護されていない反応性部位で選択的に行われ得るように、多官能性化合物の反応性部位を選択的に遮断する基を意味する。保護基は、除去することができる。例示的な保護基は、アミノ保護基、カルボキシ保護基、またはヒドロキシ保護基である。

【0128】

ヌクレアーゼ媒介分解

ヌクレアーゼ媒介分解は、相補的なヌクレオチド配列と二重鎖を形成するときに、そのような配列の分解を媒介することができるオリゴヌクレオチドを指す。

50

【0129】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸のヌクレアーゼ媒介分解を介して機能し得て、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RNアーゼH等の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（RNアーゼ）を動員することができる。ヌクレアーゼ媒介機構を介して作用するオリゴヌクレオチド設計の例は、典型的には少なくとも5個または6個の連続する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、ヘッドマーおよびテールマーによって片側または両側に隣接するオリゴヌクレオチドである。

【0130】

RNase Hの活性および動員

アンチセンスオリゴヌクレオチドのRNase H活性とは、相補的RNA分子との二重鎖にあるときにRNase Hを動員する能力を指す。国際公開第01/23613号は、RNase H活性を決定するためのin vitro方法を提供し、これはRNase Hを動員する能力の決定に使用され得る。典型的には、オリゴヌクレオチドが、相補的標的核酸配列が提供された場合に、試験されている修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、オリゴヌクレオチド中の全てのモノマー間にホスホロチオアート結合を有するDNAモノマーのみを含有するオリゴヌクレオチドを使用し、国際公開第01/23613号（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例91～95により提供される方法論を使用したときに決定された初期速度の少なくとも5%、例えば、少なくとも10%または20%超のpmol/l/分で測定された初期速度を有する場合に、このオリゴヌクレオチドはRNase Hを動員し得ると見なされる。RNase H活性の決定に使用するために、組換えヒトRNase H1が、Lubio Science GmbH、Lucerne、Switzerlandから入手可能である。

【0131】

ギャップマー

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列はギャップマーであってもよく、また、ギャップマーオリゴヌクレオチドまたはギャップマー設計とも称され得る。アンチセンスギャップマーは、通常、RNase H媒介分解を介した標的核酸の阻害に用いられる。ギャップマー型オリゴヌクレオチドは、少なくとも3つの別個の構造領域、5'-フランク、ギャップおよび3'-フランク、F-G-F'を5'→3'方向で含む。「ギャップ」領域（G）は、オリゴヌクレオチドがRNase Hを動員することを可能にする一続きの連続するDNAヌクレオチドを含む。ギャップ領域には、1つ以上の糖修飾ヌクレオシド、有利には高親和性糖修飾ヌクレオシドを含む5'隣接領域（F）と、1つ以上の糖修飾ヌクレオシド、有利には高親和性糖修飾ヌクレオシドを含む3'隣接領域（F'）が隣接する。領域FおよびF'の1つ以上の糖修飾ヌクレオシドは、標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を向上させる（すなわち、これは親和性向上糖修飾ヌクレオシドである）。いくつかの実施形態において、領域FおよびF'の1つ以上の糖修飾ヌクレオシドは、例えばLNAおよび2'-MOEから独立して選択される、例えば高親和性の2'糖修飾等、2'糖修飾ヌクレオシドである。

【0132】

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

【0133】

領域F-G-F'は、連続ヌクレオチド配列を形成する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその連続ヌクレオチド配列は、式F-G-F'のギャップマー領域を含み得る。

【0134】

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

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

$F_{1-8}-G_{5-16}-F'_{1-8}$ 、例えば

$F_{1-8}-G_{7-16}-F'_{2-8}$ 、例えば

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

【0135】

ただし、ギャップマー領域 $F-G-F'$ の全長は、少なくとも 10、少なくとも 12、例えば少なくとも 14 ヌクレオチド長であることを条件とする。 10

【0136】

本発明の一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列は、式 $5'-F-G-F'-3'$ のギャップマーからなるかまたはそれを含み、式中、領域 F および F' が独立して 1 ～ 8 個のヌクレオシドを含むかまたはそれらからなり、そのうち 2 ～ 4 個が 2' 糖修飾され、 F および F' 領域の 5' および 3' 末端を規定し、 G が RNase H を動員することができる 6 ～ 16 個のヌクレオシドの領域である。

【0137】

領域 F 、 G 、および F' は、更に以下に定義され、 $F-G-F'$ 式に組み込むことができる。 20

【0138】

ギャップマー領域 G

ギャップマーの領域 G (ギャップ領域) は、オリゴヌクレオチドが RNase H、例えばヒト RNase H1 を動員することを可能にするヌクレオシド、典型的には DNA ヌクレオシドの領域である。RNase H は、DNA と RNA との間の二重鎖を認識し、RNA 分子を酵素的に切断する細胞性酵素である。好適には、ギャップマーは、少なくとも 5 または 6 連続 DNA ヌクレオシド、例えば 5 ～ 16 連続 DNA ヌクレオシド、例えば 6 ～ 15 連続 DNA ヌクレオシド、例えば 7 ～ 14 連続 DNA ヌクレオシド、例えば 8 ～ 12 連続 DNA ヌクレオチド、例えば 8 ～ 12 連続 DNA ヌクレオチド長のギャップ領域 (G) を有し得る。ギャップ領域 G は、いくつかの実施形態において、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 連続する DNA ヌクレオシドからなっている。 30

ギャップ領域中の 1 つ以上のシトシン (c) DNA は、場合によってはメチル化されていてもよく (例えば、DNA c の後に DNA g が続く場合)、そのような 5' -メチルシトシン残基は、 $m^e C$ として、または c の代わりに e でアノテーションすることができる。5' メチル DNA ヌクレオシド等の 5' 置換 DNA ヌクレオシドは、DNA ギャップ領域での使用が報告されている (欧州特許第 2742136 号)。

【0139】

いくつかの実施形態において、ギャップ領域 G は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 連続するホスホロチオエート結合 DNA ヌクレオシドからなっている。いくつかの実施形態において、ギャップ内の全てのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合である。 40

【0140】

従来のギャップマーは DNA ギャップ領域を有するが、ギャップ領域内で用いられる場合に RNase H の動員を可能にする修飾ヌクレオシドの例が数多く存在する。ギャップ領域内に含まれる場合に RNase H を補充することができる報告されている修飾ヌクレオシドには、例えば、アルファ-L-LNA、C4' アルキル化 DNA (PCT/EP 2009/050349 および Vester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300 (ともに参照により本明細書に組み込まれる) に記載される)、ANA および 2' F-ANA のようなアラビノース由来ヌクレオシド (Mangos et al., 2003 J. AM. CHEM. SOC. 1 50

25, 654-661)、UNA (ロックされていない核酸) (Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039 (参照により本明細書に組み込まれる)に記載される)が含まれる。UNAは、典型的には、リボースのC2とC3との間の結合が除去され、アンロックド「糖」残基を形成するアンロックド核酸である。このようなギャップマーに使用されている修飾ヌクレオシドは、ギャップ領域内に導入された場合に2'エンド(endo)(DNA様)構造を採用する(すなわち、RNase H動員を可能にする修飾)ヌクレオシドであってもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載のDNAギャップ領域(G)は、任意に、ギャップ領域内に導入された際に2'エンド(DNA様)構造を採用する1~3つの糖修飾ヌクレオシドを含んでもよい。

10

【0141】

領域G-「ギャップブレーカー」

一方、いくつかのRNase H活性を保持しながら、ギャップマーのギャップ領域に3'エンド立体配座を付与する修飾ヌクレオシドの挿入についての多くの報告が存在する。1つ以上の3'エンド修飾ヌクレオシドを含むギャップ領域を有するこのようなギャップマーは、「ギャップブレーカー」または「ギャップ破壊」ギャップマーと称され、例えば、WO2013/022984を参照されたい。ギャップブレーカーオリゴヌクレオチドは、RNase H動員を可能にするために、ギャップ領域内にDNAヌクレオシドの十分な領域を保持する。RNase Hを動員するためのギャップブレーカーオリゴヌクレオチド設計の能力は、典型的には、配列特異的、または化合物特異的でさえあり(Rukovet al., 2015 Nucl. Acids Res. Vol. 43 pp. 8476-8487を参照)、当該文献は、いくつかの場合、標的RNAのより特異的な切断を提供するRNase Hを動員する「ギャップブレーカー」オリゴヌクレオチドを開示している。ギャップブレーカーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内で使用される修飾ヌクレオシドは、例えば、3'エンド確認(confirmations)を付与する修飾ヌクレオシド、例えば2'-O-メチル(OMe)もしくは2'-O-MOE(MOE)ヌクレオシド、またはベータ-D LNAヌクレオシド(ヌクレオシドのリボース糖環のC2'とC4'との間の架橋が、ベータ立体配座である)、例えばベータ-D-オキシLNAもしくはScETヌクレオシドであってもよい。

20

【0142】

上述した領域Gを含むギャップマーと同様に、ギャップブレーカーまたはギャップ破壊ギャップマーのギャップ領域は、ギャップの5'末端に(領域Fの3'ヌクレオシドに隣接して)DNAヌクレオシドを有し、ギャップの3'末端に(領域Fの5'ヌクレオシドに隣接して)DNAヌクレオシドを有する。破壊ギャップを含むギャップマーは、典型的には、ギャップ領域の5'末端または3'末端のいずれかに少なくとも3または4連続するDNAヌクレオシドの領域を保持する。

30

ギャップブレーカーオリゴヌクレオチドの例示的な設計は、

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

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

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

40

を含み、領域Gは角括弧 $[D_n - E_r - D_m]$ 内であり、DはDNAヌクレオシドの連続する配列であり、Eは修飾ヌクレオシド(ギャップブレーカーまたはギャップ破壊ヌクレオシド)であり、FおよびF'は本明細書に定義したフランキング領域であるが、ただし、ギャップマー領域F-G-F'の全長は、少なくとも12、例えば14ヌクレオチド長であることを条件とする。

【0143】

いくつかの実施形態において、ギャップ破壊ギャップマーの領域Gは、少なくとも6つのDNAヌクレオシド、例えば6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のDNAヌクレオシドを含む。上記のように、DNAヌクレオシドは連続であってもよく、任意に、1つ以上の修飾ヌクレオシドが散在してもよいが、ただし、ギャッ

50

ブ領域Gが、RNAseH動員を媒介できることを条件とする。

【0144】

ギャップマー隣接領域、FおよびF'

領域Fは、領域Gの5' DNAヌクレオシドのすぐ隣に配置されている。領域Fの最も3'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシド、例えば高親和性糖修飾ヌクレオシド、例えば2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシド、またはLNAヌクレオシドである。

【0145】

領域F'は、領域Gの3' DNAヌクレオシドのすぐ隣に配置されている。領域Fの最も5'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシド、例えば高親和性糖修飾ヌクレオシド、例えば2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシド、またはLNAヌクレオシドである。 10

【0146】

領域Fは、1~8連続ヌクレオチド長、例えば2~6、例えば3~4連続ヌクレオチド長である。有利には、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの2つの最も5'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシドヌクレオシド、例えば2つの3' MOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fの最も5'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドである。 20

【0147】

領域F'は、1~8個の連続したヌクレオチド長、例えば2~8個、例えば3~6個、例えば4~5個の連続したヌクレオチド長である。有利には、実施形態では、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、糖修飾ヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の2つの最も3'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシドヌクレオシド、例えば2つの3' MOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域F'の最も3'のヌクレオシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドである。 30

【0148】

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

【0149】

いくつかの実施形態において、領域FおよびF'は、独立して、糖修飾ヌクレオシドの連続する配列からなるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、領域Fの糖修飾ヌクレオシドは、独立して、2'-O-アルキル-RNA単位、2'-O-メチル-RNA、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-アルコキシ-RNA、MOE単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位および2'-フルオロ-ANA単位から選択されてもよい。 40

【0150】

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

【0151】

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

【0152】

いくつかの実施形態において、領域FもしくはF'、またはFおよびF'の全ヌクレオシ 50

ドは、例えばベーターD-オキシLNA、ENAまたはScETヌクレオシドから独立して選択されるような、LNAヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fは、1～5つ、例えば2～4つ、例えば3～4つ、例えば1、2、3、4または5つの連続するLNAヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態において、領域FおよびF'の全ヌクレオシドは、ベーターD-オキシLNAヌクレオシドである。

【0153】

いくつかの実施形態において、領域FもしくはF'、またはFおよびF'の全ヌクレシドは、2'置換ヌクレオシド、例えばOMeまたはMOEヌクレオシドである。いくつかの実施形態において、領域Fは、1、2、3、4、5、6、7または8つの連続するOMeまたはMOEヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態において、フランキング領域の一方のみが、2'置換ヌクレオシド、例えばOMeまたはMOEヌクレオシドからなり得る。いくつかの実施形態において、2'置換ヌクレオシド、例えばOMeまたはMOEヌクレオシドからなるのは5'（F）隣接領域であり、一方、3'（F'）隣接領域は、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えばベーターD-オキシLNAヌクレオシドまたはcETヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、2'置換ヌクレオシド、例えばOMeまたはMOEヌクレオシドからなるのは3'（F'）隣接領域であり、一方、5'（F）隣接領域は、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えばベーターD-オキシLNAヌクレオシドまたはcETヌクレオシドを含む。

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

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

【0157】

LNAギャップマー

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

【0158】

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

【0159】

一実施形態において、LNAギャップマーは、式[LNA]₄-[領域G]₁₀₋₁₂-[LNA]₄のものである。

【0160】

MOEギャップマー

MOEギャップマーは、領域FおよびF'がMOEヌクレオシドからなるギャップマーである。いくつかの実施形態において、MOEギャップマーは、設計[MOE]₁₋₈ - [領域G]₅₋₁₆ - [MOE]₁₋₈、例えば[MOE]₂₋₇ - [了解G]₆₋₁₄ - [MOE]₂₋₇、例えば[MOE]₃₋₆ - [領域G]₈₋₁₂ - [MOE]₃₋₆のものであり、領域Gはギャップマーの定義に規定したとおりである。5-10-5設計(MOE-DNA-MOE)を有するMOEギャップマーは、当技術分野で広く使用されている。

【0161】

混合ウイングギャップマー

混合ウイングギャップマーは、領域FおよびF'の一方または両方が、2'置換ヌクレオシド、例えば2'-O-アルキル-RNA単位、2'-O-メチル-RNA、2'-アミノ-DNA単位、2'-フルオロ-DNA単位、2'-アルコキシ-RNA、MOE単位、アラビノ核酸(ANA)単位、および2'-フルオロ-ANA単位からなる群から独立して選択される2'置換ヌクレオシド、例えばMOEヌクレオシドを含むLNAギャップマーである。領域FおよびF'の少なくとも一方、または領域FおよびF'の両方が少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含むいくつかの実施形態において、領域FおよびF'の残りのヌクレオシドは、MOEおよびLNAからなる群から独立して選択される。領域FおよびF'の少なくとも一方、または領域FおよびF'の両方が少なくとも2つのLNAヌクレオシドを含むいくつかの実施形態において、領域FおよびF'の残りのヌクレオシドは、MOEおよびLNAからなる群から独立して選択される。いくつかの混合ウイング実施形態において、領域FおよびF'の一方または両方が、1つ以上のDNAヌクレオシドを更に含んでもよい。

【0162】

混合ウイングギャップマー設計は、国際公開第2008/049085号および国際公開第2012/109395号(これらの両方は参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。

【0163】

交互フランクギャップマー

フランク領域は、LNAとDNAヌクレオシドの両方を含んでよく、それらはLNA-DNA-LNAヌクレオシドの交互のモチーフを含むことから、「交互フランク」と呼ばれる。このような交互フランクを含むギャップマーは、「交互フランクギャップマー」と呼ばれる。「交互フランクギャップマー」はLNAギャップマーオリゴヌクレオチドであり、フランクの少なくとも一方(FまたはF')が、LNAヌクレオシド(複数可)に加えてDNAを含む。いくつかの実施形態において、領域FもしくはF'の少なくとも一方、または領域FおよびF'の両方は、LNAヌクレオシドおよびDNAヌクレオシドの両方を含む。このような実施形態において、隣接領域FまたはF'、もしくはFおよびF'の両方が少なくとも3つのヌクレオシドを含み、Fおよび/またはF'領域の最も5'および3'のヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。

【0164】

交互フランクLNAギャップマーは、国際公開第2016/127002号に開示されている。

【0165】

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

交互フランクは、例えば、LNAヌクレオシド(L)の数に続いてDNAヌクレオシド(D)の数を表す、一連の整数としてアノテーションすることができ、例えば、

[L]₁₋₃ - [D]₁₋₄ - [L]₁₋₃

[L]₁₋₂ - [D]₁₋₂ - [L]₁₋₂ - [D]₁₋₂ - [L]₁₋₂である。

10

20

30

40

50

【0166】

オリゴヌクレオチド設計では、これらは、 $2-2-1$ が $5'$ $[L]_2 - [D]_2 - [L]_3$ を表し、 $1-1-1-1-1$ が $5'$ $[L] - [D] - [L] - [D] - [L]_3$ を表すような数字として表されることが多い。交互フランクを有するオリゴヌクレオチドのフランク（領域FおよびF'）の長さは、独立して、3から10ヌクレオシド、例えば4から8、例えば5から6ヌクレオシド、例えば4、5、6または7修飾ヌクレオシドであり得る。いくつかの実施形態において、ギャップマーオリゴヌクレオチドの一方のフランクのみが交互になっており、他方はLNAヌクレオチドで構成されている。追加のエキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、 $3'$ フランク（F'）の $3'$ 末端に少なくとも2つのLNAヌクレオシドを有することが有利であり得る。一実施形態において、交互フランクギャップマー内のフランクは、全長5〜8個のヌクレオシドを有し、そのうちの3〜5個はLNAヌクレオシドである。交互フランクを有するオリゴヌクレオチドのいくつかの例は次のとおりである。

10

$[L]_1 - 5 - [D]_1 - 4 - [L]_1 - 3 - [G]_5 - 16 - [L]_2 - 6$
 $[L]_1 - 2 - [D]_2 - 3 - [L]_3 - 4 - [G]_5 - 7 - [L]_1 - 2 - [D]_2 - 3 - [L]_2 - 3$
 $[L]_1 - 2 - [D]_1 - 2 - [L]_1 - 2 - [D]_1 - 2 - [L]_1 - 2 - [G]_5 - 16 - [L]_1 - 2 - [D]_1 - 3 - [L]_2 - 4$
 $[L]_1 - 5 - [G]_5 - 16 - [L] - [D] - [L] - [D] - [L]_2$
 $[L]_4 - [G]_6 - 10 - [L] - [D]_3 - [L]_2$

20

【0167】

ただし、ギャップマーの全長は、少なくとも12、例えば少なくとも14ヌクレオチド長であることを条件とする。

【0168】

オリゴヌクレオチドにおける領域D'またはD''

本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態において、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列、例えばギャップマーF-G-F'、ならびに更に $5'$ および/または $3'$ ヌクレオシドを含むか、またはそれからなり得る。更なる $5'$ および/または $3'$ ヌクレオシドは、標的核酸に対して完全に相補的であっても、完全に相補的でなくてもよい。このような更なる $5'$ および/または $3'$ ヌクレオシドは、本明細書では領域D'およびD''と称され得る。

30

【0169】

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

領域D'およびD''は、各々、領域Fの $5'$ 末端または領域F'の $3'$ 末端に結合されて、以下の式D'-F-G-F'、F-G-F'-D''または

D'-F-G-F'-D''の設計を生成することができる。この場合、F-G-F'はオリゴヌクレオチドのギャップマー部分であり、領域D'またはD''は、オリゴヌクレオチドの別個の部分構成する。

40

【0170】

領域D'またはD''は、独立して、1、2、3、4、または5の追加のヌクレオチドを含むか、またはそれからなり、これは、標的核酸に相補的であっても、相補的でなくてもよい。FまたはF'領域に隣接するヌクレオチドは、DNAまたはRNA等の糖修飾ヌクレオチドではなく、もしくはこれらの塩基修飾バージョンでもない。D'またはD''領域は、ヌクレアーゼ感受性の生体切断可能なリンカーとしての役割を果たし得る（リンカーの定義を参照）。いくつかの実施形態において、追加の $5'$ および/または $3'$ 末端ヌクレオチドは、ホスホジエステル結合で結合されており、DNAまたはRNAである。領域D'ま

50

たはD”としての使用に好適なヌクレオチドベースの生体切断可能なリンカーは、国際公開第2014/076195号に開示されており、これには例としてホスホジエステル結合DNAジヌクレオチドが含まれる。ポリオリゴヌクレオチド構築物における生体切断可能なリンカーの使用は国際公開第WO2015/113922号に開示されており、それらは複数のアンチセンス構築物（例えば、ギャップマー領域）を単一のオリゴヌクレオチド内で結合するのに使用されている。

【0171】

一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、ギャップマーを構成する連続ヌクレオチド配列に加えて、領域D’および／またはD”を含む。

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

$F-G-F'$ ；特に、 $F_2-8-G_6-16-F'_2-8$

$D'-F-G-F'$ 、特に $D'_3-F_1-8-G_6-16-F'_2-8$

$F-G-F'-D''$ 、特に $F_2-8-G_6-16-F'_2-8-D''_1-3$

$D'-F-G-F'-D''$ 、特に $D'_3-F_2-8-G_6-16-F'_2-8-D''_1-3$

【0172】

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

【0173】

コンジュゲート

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

【0174】

1つ以上の非ヌクレオチド部分に対する本発明のオリゴヌクレオチドのコンジュゲーションは、例えば、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞取込み、または安定性に影響を及ぼすことにより、オリゴヌクレオチドの薬効薬理を改善し得る。いくつかの実施形態において、コンジュゲート部分は、オリゴヌクレオチドの細胞分布、バイオアベイラビリティ、代謝、排泄、浸透性、および／または細胞取込みを改善することにより、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を調節または向上させる。特に、コンジュゲートは、オリゴヌクレオチドを特定の器官、組織、または細胞型に標的化し、それによって、その器官、組織、または細胞型におけるオリゴヌクレオチドの有効性を高めることができる。同時に、コンジュゲートは、非標的細胞型、組織または器官内のオリゴヌクレオチドの活性を低下させるのに役立ち得る（例えば、非標的細胞型、組織または器官におけるオフターゲット活性または活性）。

【0175】

オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよびそれらの合成については、その各々全体が参照することによって本明細書に組み込まれる、Manoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S. T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001およびManoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103による包括的な概説でも報告されている。

【0176】

一実施形態において、非ヌクレオチド部分（コンジュゲート部分）は、炭水化物（例えば、GalNAc）、細胞表面受容体リガンド、原薬、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素（例えば、細菌毒素）、ビタミン、ウイルスタンパク質（例えば、カプシド）、またはそれらの組合せからなる群から選択される。

【0177】

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

【0178】

リンカー

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

【0179】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明のコンジュゲートまたはオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、任意に、標的核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列（領域Aまたは第1の領域）と、コンジュゲート部分（領域Cまたは第3の領域）との間に位置するリンカー領域（第2の領域または領域Bおよび／または領域Y）を含み得る。

【0180】

領域Bは、哺乳動物の体内で通常遭遇するまたは遭遇するものに類似した条件下で切断可能である生理学的に不安定な結合を含むか、またはそれからなる生体切断可能なリンカーを指す。生理学的に不安定なリンカーが化学的変換（例えば、切断）を受ける条件には、pH、温度、酸化または還元条件、もしくは薬剤等の化学条件、ならびに哺乳動物の細胞で見られるまたは遭遇するものに類似した塩濃度が含まれる。哺乳動物の細胞内条件には、タンパク質分解酵素または加水分解酵素またはヌクレアーゼ等の哺乳動物細胞に通常存在する酵素活性の存在も含まれる。一実施形態において、生体切断可能なリンカーは、S1ヌクレアーゼ切断の影響を受けやすい。好ましい実施形態において、ヌクレアーゼ感受性リンカーは、少なくとも2つの連続したホスホジエステル結合、例えば、少なくとも3つまたは4つまたは5つの連続したホスホジエステル結合を含む、1から10の間のヌクレオシド、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のヌクレオシド、より好ましくは2から6の間のヌクレオシド、最も好ましくは2から4の間の結合したヌクレオシドを含む。好ましくは、ヌクレオシドは、DNAまたはRNAである。ホスホジエステルを含む生体切断可能なリンカーは、国際公開第2014/076195号（参照することによって本明細書に組み込まれる）により詳細に記載されている。

【0181】

領域Yは、必ずしも生体切断可能ではないが、主にコンジュゲート部分（領域Cまたは第3の領域）をオリゴヌクレオチド（領域Aまたは第1の領域）に共有結合させるのに役立つリンカーを指す。領域Yリンカーは、エチレングリコール、アミノ酸単位またはアミノアルキル基等の反復単位の鎖構造またはオリゴマーを含み得る本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、以下の領域要素A-C、A-B-C、A-B-Y-C、A-Y-B-CまたはA-Y-Cから構築され得る。いくつかの実施形態において、リンカー（領域Y）は、アミノアルキル、例えばC6～C12アミノアルキル基を含むC2～C36アミノアルキル基である。好ましい実施形態において、リンカー（領域Y）は、C6アミノアルキル基である。

【0182】

処置

本明細書で使用される場合、「処置（treatment）」という用語は、既存の疾患（例えば、本明細書で言及される疾患または障害）の処置、または疾患の予防（pre

10

20

30

40

50

vention)、すなわち予防法 (prophylaxis) の両方を指す。したがって、本明細書で言及される処置は、いくつかの実施形態において、予防的であり得ることが認識されよう。

【発明を実施するための形態】

【0183】

本発明のオリゴヌクレオチド

本発明は、ApoE4の発現を調節することができる（例えば、ApoE4の発現を低下させる（ダウンレギュレーションする）等）オリゴヌクレオチドに関する。調節は、ApoE4をコードする標的核酸にハイブリダイズすることで達成される。標的核酸は、配列番号1および3からなる群から選択される配列等の哺乳動物APOE ε4 mRNA配列であり得る。

10

【0184】

オリゴヌクレオチドは、APOE ε4核酸を標的とし、ApoE4発現の低下をもたらすアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0185】

有利には、オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1の残基535を含む配列番号1の標的配列に相補的である。好ましくは、配列番号1の535位のヌクレオチドに相補的な連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドは、配列番号1の535位のシトシン (c) とのワトソン・クリック塩基対合を可能にするグアニン (g) 核酸塩基またはその修飾核酸塩基を含む。

20

【0186】

有利には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的の発現を、それを低減またはダウンレギュレーションすることによって調節することができる。好ましくは、そのような調節は、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも20%、より好ましくは、標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の阻害をもたらす。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的の発現レベルを、標的の正常発現レベルと比較して少なくとも20%、より好ましくは、標的の正常発現レベルと比較して少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または100%阻害低下させることができることも好ましい。

30

【0187】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ApoE4 mRNAの発現レベルを、ApoE4 mRNAの正常な発現レベルと比較して、ゲノムにAPOE ε4の少なくとも1つのコピーを含む神経芽腫細胞に25 μMオリゴヌクレオチドを適用した後で、インビトロにおいて少なくとも60%または70%低下させることができる。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ApoE4 mRNAの発現レベルを、ApoE4 mRNAの正常な発現レベルと比較して、ゲノムにAPOE ε4の少なくとも1つのコピーを含む神経芽腫細胞に5 μMオリゴヌクレオチドを適用した後で、インビトロにおいて少なくとも50%または60%低下させることができる。適切には、実施例は、ApoE4 RNA阻害を測定するために使用され得るアッセイを提供する（実施例1）。

40

【0188】

標的調節は、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列と標的核酸との間のハイブリダイゼーションによって引き起こされる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間のミスマッチを含む。ミスマッチにもかかわらず、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、ApoE4発現の所望の調節を示すのになお十分であり得る。ミスマッチから生じる結合親和性の低下は、オリゴヌクレオチド内のヌクレオチド数の増加、および／または、標的への結合親和性を増加させることができる修飾ヌクレオチド、例えばオリゴヌクレオチド配列内に存在する、LNAを含む2'

50

糖修飾ヌクレオシドの数の増加により有利に補償され得る。

【0189】

有利には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ApoE3の発現を低下させるよりもApoE4の発現を低下させることができる。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ApoE4核酸およびApoE3核酸の両方を含む標的細胞において、残存ApoE3核酸のパーセンテージ（対照と比較した場合）と残存ApoE4核酸のパーセンテージ（対照と比較した場合）との比が1よりも高く、好ましくは少なくとも1.5であり、より好ましくは少なくとも2であり、少なくとも2.5であり、少なくとも3であり、少なくとも3.5であり、または少なくとも4であるように、ApoE4の発現を低下させることができる（ApoE3核酸の正常な発現レベル）。

10

【0190】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ApoE4 mRNAおよびApoE3 mRNAの両方を含む標的細胞において、APOE ε3およびAPOE ε4のヘテロ接合遺伝子型を有する神経芽細胞腫細胞に25 μMオリゴヌクレオチドを適用した後での（対照と比較した場合の）残存ApoE3 mRNAのパーセンテージと（対照と比較した場合の）残存ApoE4 mRNAのパーセンテージとの比が1超、好ましくは少なくとも1.5、より好ましくは少なくとも2、少なくとも2.5、少なくとも3、少なくとも3.5または少なくとも4であるように、ApoE4 mRNAの発現レベルを低下させることができる。

【0191】

特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的細胞において、下記を含むようにApoE4の発現を低下させることができる場合がある。

20

（a）配列番号1によってコードされるヒトApoE4タンパク質をコードするmRNAであって、配列番号1の516～556の位置に対応するセグメントを含むmRNA、および

（b）配列番号2によってコードされるヒトApoE3タンパク質をコードするmRNAであって、配列番号2の516～556の位置に対応するセグメントを含むmRNA、

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトApoE4をコードするmRNAのレベルを低下させ、その結果、

（i）対照と比較した場合の残存ApoE3 mRNAレベルのパーセンテージと、

30

（ii）対照と比較した場合の残存ApoE4 mRNAレベルのパーセンテージとの間の比

が、1よりも大きく、例えば少なくとも1.5、例えば少なくとも2、例えば少なくとも2.5、例えば少なくとも3、例えば少なくとも3.5、例えば少なくとも4となる。

【0192】

ApoE4核酸および／またはApoE3核酸の正常な発現レベルを反映する好適な対照には、アンチセンスオリゴヌクレオチドの非存在下におけるApoE3 mRNAおよびApoE4 mRNAの発現レベル、例えば、ビヒクル（例えば、PBSまたは培養培地）のみと接触させられる標的細胞、または、本明細書において定義されるような標的配列を標的としないことが知られており、好ましくは、オフターゲット活性を何ら有しないことが知られている対照オリゴヌクレオチド（すなわち、細胞／生物ゲノムの発現に対していかなる関連する効果も有さない）と接触させられる標的細胞が含まれる。参照（対照）値も文献から公知であり得る。適切な標的細胞には、ヘテロ接合APOE ε3／ε4遺伝子型（Schaffner et al., Genes Nutr. 2014 Jan; 9(1)）のヒトKELLY神経芽細胞腫細胞が含まれる。実施例1は、ヒトKELLY神経芽細胞腫細胞を使用して、ApoE3およびApoE4のmRNA阻害の相対的阻害を測定するために使用され得るアッセイを提供する。

40

【0193】

本発明の一態様は、配列番号1に対して少なくとも80%の相補性を有する10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。アン

50

チセンスオリゴヌクレオチドはまた、または代替的に、配列番号3に対して少なくとも80%の相補性を有し得る。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1に対して少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、例えば100%の相補性を有する、少なくとも10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、または代替的に、配列番号3に対して少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、例えば100%の相補性を有する、少なくとも10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。

10

【0194】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも80%、例えば少なくとも81%、例えば少なくとも82%、例えば少なくとも83%、例えば少なくとも84%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも86%、例えば少なくとも87%、例えば少なくとも88%、例えば少なくとも89%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも91%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも93%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、例えば少なくとも99%、例えば100%標的核酸の領域または標的配列に相補的である10~30ヌクレオチド長の連続配列を含む。

20

【0195】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列が、標的核酸の領域または標的配列と完全に相補的（100%相補的）である場合が有利である。

30

【0196】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列は、1つのミスマッチ、2つのミスマッチ、および3つのミスマッチから任意に選択される、それが相補的である標的配列と比較して、0~3個のミスマッチを含み得る。例えば、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列は、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列と標的核酸中の標的配列との間に1つまたは2つのミスマッチを含み得る。ミスマッチは、配列番号1の535位のヌクレオチドにはない。したがって、配列番号1の535位のヌクレオチドに相補的な連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドは、グアニン（g）核酸塩基を含む。

【0197】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1の516位~556位内、例えば配列番号1の522位~548位内の標的配列に対して少なくとも80%相補的、例えば少なくとも90%相補的、例えば完全に（または100%）相補的である8~50ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。

40

【0198】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1の516位~556位内、例えば配列番号1の522位~548位内の標的配列に対して少なくとも80%相補的、例えば少なくとも90%相補的、例えば完全に（または100%）相補的である10~30ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。

【0199】

50

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド配列は、配列番号 1 に存在する対応する標的配列に 100% 相補的である。

【0200】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、表 2 に列挙された領域の 1 つから選択される標的配列に相補的である場合に有利である。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列は、R__4 ~ R__96 から選択される標的配列に対して少なくとも 80% 相補的であるか、または少なくとも 90% 相補的である、例えば、完全に相補的である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド配列は、R__25、R__40、R__46、R__66 および R__91 から選択される標的配列に対して 100% 相補的である（表 2）。

10

【0201】

オリゴヌクレオチドは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 または 50 ヌクレオチド長を含むかまたはそれらからなり得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48 または 50 ヌクレオチド長からなり得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、8 ~ 50 個、例えば 8 ~ 40 個、例えば 10 ~ 40 個、例えば 10 ~ 35 ヌクレオチド長、例えば 10 ~ 30 個、例えば 11 ~ 25 個、例えば 12 ~ 22 個、例えば 14 ~ 20 個または 14 ~ 18 個の連続するヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16 ~ 22 ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16 ~ 20 ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

20

【0202】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列は、22 以下のヌクレオチド、例えば 20 以下のヌクレオチド、例えば 16、17、18、19、または 20 のヌクレオチドを含むかまたはそれからなる。本明細書で提供されるいずれの範囲も、範囲の終点を含むことを理解するべきである。したがって、オリゴヌクレオチドが 10 ~ 30 ヌクレオチドを含むと記される場合、10 ヌクレオチドおよび 30 ヌクレオチドの両方が含まれる。

30

【0203】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列が、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 連続ヌクレオチド長を含むか、またはそれからなる。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16、17、18、19、または 20 ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0204】

好ましくは、連続ヌクレオチド配列は、標的核酸に 100% 相補的である。

40

【表 3】

表 3. オリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列のモチーフ配列の例

配列番号	モチーフ配列 (5' - 3')	配列番号 1 における標的配列の位置	
		開始	停止
4	GCACGTCCTCCATGTCCGCG	5 1 6	5 3 5
5	CGCACGTCCTCCATGTCCGC	5 1 7	5 3 6
6	GCACGTCCTCCATGTCCGC	5 1 7	5 3 5
7	CGCGCACGTCCTCCATGTCC	5 1 8	5 3 8
8	GCGCACGTCCTCCATGTCCG	5 1 8	5 3 7
9	CGCACGTCCTCCATGTCCG	5 1 8	5 3 6
10	GCACGTCCTCCATGTCCG	5 1 8	5 3 5
11	CGCGCACGTCCTCCATGTC	5 1 9	5 3 8
12	GCGCACGTCCTCCATGTCC	5 1 9	5 3 7
13	CGCACGTCCTCCATGTCC	5 1 9	5 3 6
14	GCACGTCCTCCATGTCC	5 1 9	5 3 5
15	CCGCGCACGTCCTCCATGTC	5 2 0	5 3 9
16	CGCGCACGTCCTCCATGT	5 2 0	5 3 8
17	GCGCACGTCCTCCATGTC	5 2 0	5 3 7
18	CGCACGTCCTCCATGTC	5 2 0	5 3 6
19	GCACGTCCTCCATGTC	5 2 0	5 3 5
20	GCCGCGCACGTCCTCCATGT	5 2 1	5 4 0
21	CCGCGCACGTCCTCCATGT	5 2 1	5 3 9
22	CGCGCACGTCCTCCATG	5 2 1	5 3 8
23	GCGCACGTCCTCCATGT	5 2 1	5 3 7
24	CGCACGTCCTCCATGT	5 2 1	5 3 6
25	GCACGTCCTCCATG	5 2 2	5 3 5
26	GGCCGCGCACGTCCTCCATG	5 2 2	5 4 1
27	GCCGCGCACGTCCTCCATG	5 2 2	5 4 0
28	CCGCGCACGTCCTCCATG	5 2 2	5 3 9
29	GCGCACGTCCTCCATG	5 2 2	5 3 7
30	CGGCCGCGCACGTCCTCCAT	5 2 3	5 4 2
31	GGCCGCGCACGTCCTCCAT	5 2 3	5 4 1
32	GCCGCGCACGTCCTCCAT	5 2 3	5 4 0
33	CCGCGCACGTCCTCCAT	5 2 3	5 3 9
34	CGCGCACGTCCTCCAT	5 2 3	5 3 8
35	GCGGCCGCGCACGTCCTCCA	5 2 4	5 4 3
36	CGGCCGCGCACGTCCTC	5 2 4	5 4 2
37	GGCCGCGCACGTCCTCCA	5 2 4	5 4 1
38	GCCGCGCACGTCCTCCA	5 2 4	5 4 0

10

20

30

40

50

3 9	CCGCGCACGTCTCCA	5 2 4	5 3 9
4 0	GCGCACGTCTCC	5 2 5	5 3 7
4 1	GGCGGCCGCGCACGTCTCC	5 2 5	5 4 4
4 2	GCGGCCGCGCACGTCTCC	5 2 5	5 4 3
4 3	CGGCCGCGCACGTCTCC	5 2 5	5 4 2
4 4	GGCCGCGCACGTCTCC	5 2 5	5 4 1
4 5	GCCGCGCACGTCTCC	5 2 5	5 4 0
4 6	CGCGCACGTCTC	5 2 6	5 3 8
4 7	AGGCGGCCGCGCACGTCTC	5 2 6	5 4 5
4 8	GGCGGCCGCGCACGTCTC	5 2 6	5 4 4
4 9	GCGGCCGCGCACGTCTC	5 2 6	5 4 3
5 0	GGCCGCGCACGTCTC	5 2 6	5 4 1
5 1	CAGGCGGCCGCGCACGTCT	5 2 7	5 4 6
5 2	AGGCGGCCGCGCACGTCT	5 2 7	5 4 5
5 3	GGCGGCCGCGCACGTCT	5 2 7	5 4 4
5 4	GCGGCCGCGCACGTCT	5 2 7	5 4 3
5 5	CGGCCGCGCACGTCT	5 2 7	5 4 2
5 6	CCAGGCGGCCGCGCACGTCC	5 2 8	5 4 7
5 7	CAGGCGGCCGCGCACGTCC	5 2 8	5 4 6
5 8	AGGCGGCCGCGCACGTCC	5 2 8	5 4 5
5 9	GGCGGCCGCGCACGTCC	5 2 8	5 4 4
6 0	GCGGCCGCGCACGTCC	5 2 8	5 4 3
6 1	ACCAGGCGGCCGCGCACGTC	5 2 9	5 4 8
6 2	CCAGGCGGCCGCGCACGTC	5 2 9	5 4 7
6 3	CAGGCGGCCGCGCACGTC	5 2 9	5 4 6
6 4	AGGCGGCCGCGCACGTC	5 2 9	5 4 5
6 5	GGCGGCCGCGCACGTC	5 2 9	5 4 4
6 6	CAGGCGGCCGCGCACGT	5 3 0	5 4 6
6 7	CACCAGGCGGCCGCGCACGT	5 3 0	5 4 9
6 8	ACCAGGCGGCCGCGCACGT	5 3 0	5 4 8
6 9	CCAGGCGGCCGCGCACGT	5 3 0	5 4 7
7 0	AGGCGGCCGCGCACGT	5 3 0	5 4 5
7 1	GCACCAGGCGGCCGCGCACG	5 3 1	5 5 0
7 2	CACCAGGCGGCCGCGCACG	5 3 1	5 4 9
7 3	ACCAGGCGGCCGCGCACG	5 3 1	5 4 8
7 4	CCAGGCGGCCGCGCACG	5 3 1	5 4 7
7 5	CAGGCGGCCGCGCACG	5 3 1	5 4 6
7 6	TGCACCAGGCGGCCGCGCAC	5 3 2	5 5 1
7 7	GCACCAGGCGGCCGCGCAC	5 3 2	5 5 0
7 8	CACCAGGCGGCCGCGCAC	5 3 2	5 4 9

10

20

30

40

50

7 9	ACCAGGCGGCCGCGCAC	5 3 2	5 4 8
8 0	CCAGGCGGCCGCGCAC	5 3 2	5 4 7
8 1	CTGCACCAGGCGGCCGCGCA	5 3 3	5 5 2
8 2	TGCACCAGGCGGCCGCGCA	5 3 3	5 5 1
8 3	GCACCAGGCGGCCGCGCA	5 3 3	5 5 0
8 4	CACCAGGCGGCCGCGCA	5 3 3	5 4 9
8 5	ACCAGGCGGCCGCGCA	5 3 3	5 4 8
8 6	ACTGCACCAGGCGGCCGCGC	5 3 4	5 5 3
8 7	CTGCACCAGGCGGCCGCGC	5 3 4	5 5 2
8 8	TGCACCAGGCGGCCGCGC	5 3 4	5 5 1
8 9	GCACCAGGCGGCCGCGC	5 3 4	5 5 0
9 0	CACCAGGCGGCCGCGC	5 3 4	5 4 9
9 1	ACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 4 8
9 2	TACTGCACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 5 4
9 3	ACTGCACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 5 3
9 4	CTGCACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 5 2
9 5	TGCACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 5 1
9 6	GCACCAGGCGGCCGCG	5 3 5	5 5 0

10

20

30

40

50

【0205】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、表3に列挙されるものから選択される配列を含む、またはこれからなる。

【0206】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号4～96（表3に列挙したモチーフ配列を参照）からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10～30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0207】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号25、40、46、66および91からなる群から選択される配列に対して少なくとも90%の同一性、好ましくは100%の同一性を有する10～30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0208】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号25、40、および46からなる群から選択される配列に対して少なくとも90%の同一性、好ましくは100%の同一性を有する10～30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0209】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号25の配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10～30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0210】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号40の配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10～30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0211】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号46の配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10~30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0212】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号66の配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10~30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

【0213】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列は、配列番号91の配列と少なくとも90%同一性、好ましくは100%同一性である10~30ヌクレオチド長を含むかまたはそれからなる。

10

【0214】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号4~96から選択される配列を含む。

【0215】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号4~96から選択される配列からなる。

【0216】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号4~96から選択される配列を含む。

20

【0217】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号4~96から選択される配列からなる。

【0218】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号25に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0219】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号40に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

30

【0220】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号46に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0221】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号66に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0222】

いくつかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列は、配列番号91に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0223】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号25に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

40

【0224】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号40に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0225】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号46に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0226】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号66

50

に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0227】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、配列番号91に示されるヌクレオチド配列を含むかまたはこれからなる。

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

有利には、オリゴヌクレオチド配列は、ヌクレアーゼ耐性を低下させることから、RNAヌクレオシドを含有しない。さらに、本明細書の他の箇所に記載されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、有利には、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドを含み得る。さらに、修飾されていないヌクレオシドがDNAヌクレオシドであることは有利である。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシドおよびDNAヌクレオシドを用いて設計することができる。好ましくは、高親和性修飾ヌクレオシドが使用される。

【0231】

一実施形態において、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、または少なくとも16個の修飾ヌクレオシドを含む。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1～10個の修飾ヌクレオシド、例えば2～9個の修飾ヌクレオシド、例えば3～8個の修飾ヌクレオシド、例えば4～7個の修飾ヌクレオシド、例えば6または7個の修飾ヌクレオシドを含む。好適な修飾は、「修飾ヌクレオシド」、「高親和性修飾ヌクレオシド」、「糖修飾」、「2'糖修飾」、およびロックド核酸（LNA）の「定義」セクションに記載されている。

【0232】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の糖修飾ヌクレオシド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドを含む。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸（ANA）、2'-フルオロ-ANA、およびLNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される1つ以上の2'糖修飾ヌクレオシドを含む。修飾ヌクレオシド（複数可）の1つ以上がロックド核酸（LNA）である場合、有利である。

【0233】

更なる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合を含む。好適なヌクレオシド間修飾は、「修飾ヌクレオシド間結合」の「定義」セクションに記載されている。連続ヌクレオチド配列内の少なくとも75%、例えば80%、例えば全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートまたはボラノホスフェートヌクレオシド間結合である場合、有利である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの連続する配列中の全てのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0234】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、例えば1、2、3、4、5、6、7、または8個のLNAヌクレオシド、例えば2～6個のLNAヌクレオシド、例えば3～7個のLNAヌクレオシド、4～8個のLNAヌクレオシド、または3、4、5、6、7、もしくは8個のLNAヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドにおける修飾ヌクレオシドの少なくとも75%はLNAヌクレオシドであり、修飾ヌクレオシドの例えば80%、例

10

20

30

40

50

例えば85%、例えば90%は、LNAヌクレオシド、特にベータ-D-オキシLNAまたはScETである。なお更なる実施形態において、オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオシドの全ては、LNAヌクレオシドである。更なる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ベータ-D-オキシ-LNAと、以下のLNAヌクレオシド：ベータ-Dまたは α -L立体配置のいずれかのチオールLNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、ScET、および／またはENAの1つ以上との両方、またはそれらの組合せを含んでもよい。更なる実施形態において、全LNAシトシン単位は、5-メチルシトシンである。オリゴヌクレオチドまたは連続ヌクレオチド配列のヌクレアーゼ安定性にとって、ヌクレオチド配列の5'末端に少なくとも1つのLNAヌクレオシドと3'末端に少なくとも2つのLNAヌクレオシドとを有することが有利である。

10

【0235】

本発明の一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、RNAse Hを動員することが可能である。

【0236】

本発明において、有利な構造設計は、例えば、「ギャップマー」、「LNAギャップマー」、「MOEギャップマー」、および「混合ウイングギャップマー」、「交互フランクギャップマー」の「定義」セクションに記載されているギャップマー設計である。ギャップマー設計には、均一フランク、混合ウイングフランク、交互フランク、およびギャップブレイカー設計のギャップマーが含まれる。

【0237】

オリゴヌクレオチドは、F-G-F'設計のギャップマー、特に式5'-F-G-F'-3'のギャップマーである場合に有利であり、領域FおよびF'は独立して1~8個のヌクレオシドを含み、そのうちの2~5個は2'糖修飾され、FおよびF'領域の5'および3'末端を規定し、GはRNAse Hを動員することができる6~16個のヌクレオシドの領域、例えば6~16個のDNAヌクレオシドを含む領域である。

20

【0238】

いくつかの実施形態において、両方のフランクは、5'および3'末端に2'糖修飾ヌクレオシドを有する。

【0239】

いくつかの実施形態において、ギャップマーは、LNAギャップマーである。

30

【0240】

本発明のいくつかの実施形態において、LNAギャップマーは、以下の均一フランク設計から選択される。2-13-2、2-8-3、3-8-2、2-9-3、3-9-2、2-8-4、2-9-2。

【0241】

いくつかの実施形態において、LNAギャップマーは交互フランク設計を有する。交互フランク設計では、フランク(FまたはF')の少なくとも1つは、LNAヌクレオシドに加えて1つ以上のDNAヌクレオシドを含む。次いで、フランキング領域FもしくはF'、またはFとF'の両方は、少なくとも3つのヌクレオシドを含み、Fおよび／またはF'領域の最も5'および3'のヌクレオシドはLNAヌクレオシドである。各「-」(ダッシュ)がLNA/DNAヌクレオシド間のシフト、ヌクレオシドの数、およびギャップ領域G内のDNAヌクレオシドを最も多い数を表すため、LNA-LNA-DNA-DNA-LNAである5つのヌクレオシドを有するF、6つのDNAヌクレオシドを有するギャップ領域、および2つのLNAヌクレオシドを有するF'を有する交互フランク設計を有するギャップマーは、したがって、2-2-1-6-2として表すことができる。

40

【0242】

同じ表現を使用して、本発明のいくつかの実施形態において、LNAギャップマーは、以下の交互フランク設計から選択される。2-1-1-1-1-6-2、2-7-1-1-2、2-1-1-6-3、2-1-2-6-2、2-8-1-1-2、2-7-1-1-3、2-7-1-2-2、2-2-1-6-2および2-1-1-7-2。

50

【0243】

表4および5は、各モチーフ配列の好ましい設計を列挙している。

【0244】

全ての場合において、F-G-F'設計は、「オリゴヌクレオチド中の領域D'またはD''」の「定義」セクションに記載されるように、領域D'および／またはD''を更に含む得る。いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、ギャップマー領域の5'末端または3'末端に、1、2、または3個のホスホジエステル結合ヌクレオシド単位、例えばDNA単位を有する。

【0245】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合（複数可）に加えて、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合と、2、3、または4ホスホジエステル結合等の少なくとも1つのホスホジエステル結合との両方を含む。ギャップマー型オリゴヌクレオチドでは、ホスホジエステル結合は、存在する場合、ギャップ領域G内の連続するDNAヌクレオシド間には当然配置されない。

【0246】

有利には、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列の全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエートであるか、またはオリゴヌクレオチドの全てのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である。ホスホロチオエート結合等のヌクレアーゼ耐性結合は、標的核酸と二重鎖を形成するときにヌクレアーゼを動員することができるオリゴヌクレオチド領域、例えばギャップマーの領域Gにおいて特に有用である。しかしながら、ホスホロチオエート結合は、非ヌクレアーゼ動員領域および／または親和性増強領域、例えばギャップマーの領域FおよびF'においても有用であり得る。ギャップマーオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態において、領域FもしくはF'、または領域FおよびF'の両方に1つ以上のホスホジエステル結合を含んでもよく、領域Gのヌクレオシド間結合の全てはホスホロチオエートであり得る。

【0247】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、化合物番号91__1を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号66__1を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号46__1を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号46__2を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号46__3を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号46__4を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号46__5を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__1を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__2を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__3を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__4を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__5を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号25__6を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号40__1を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号40__2を有するオリゴヌクレオチド化合物である。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、化合物番号40__3を有するオリゴヌクレオチド化合物である。

【0248】

本発明の文脈における特定の有利なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

A C c A g G c g g c c g C G (配列番号91；化合物番号91__1)

C A g g c g g c c g c g c a c G T	(配列番号 6 6 ; 化合物番号 6 6 __ 1)
C G c g c a c g t C c T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 1)
C G c g c a c g t c C T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 2)
C G c G c a c g t c C T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 3)
C G C g c a c g t c c T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 4)
C G c G C a c g t c c T C	(配列番号 4 6 ; 化合物番号 4 6 __ 5)
G C a c g t c c t c c A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 1)
G C A c g t c c t c c a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 2)
G C a c g t c c t c C a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 3)
G C a c g t c c t C c A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 4)
G C a c g t c c t C c a T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 5)
G C a c g t c c t c C A T G	(配列番号 2 5 ; 化合物番号 2 5 __ 6)
G C g c a c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 1)
G C g c A c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 2)
G C g C a c g t c c t C C	(配列番号 4 0 ; 化合物番号 4 0 __ 3)

10

からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド化合物であり、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドであり、小文字はDNAヌクレオシドであり、全てのLNA Cは5-メチルシトシンであり、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

20

【0249】

本発明の文脈における更なる特定の有利なオリゴヌクレオチドは、HELMアノテーションによって表4に定義される化合物からなる群から選択されるオリゴヌクレオチド化合物である。すなわち、各化合物の構造は、以下のHELMアノテーションキーを使用して、高分子用階層編集言語(HELM)(詳細については、Zhang et al., Chem. Inf. Model. 2012, 52, 10, 2796-2806またはJ. Chem. Inf. Model. 2017, 57, 6, 1233-1239)によって記述される。

30

[LR] (G) はベータ-D-オキシ-LNAグアニンヌクレオシドであり、
 [LR] (T) は、ベータ-D-オキシ-LNAチミンヌクレオシドであり、
 [LR] (A) はベータ-D-オキシ-LNAアデニンヌクレオシドであり、
 [LR] ([5meC]) は、ベータ-D-オキシ-LNA5-メチルシトシンヌクレオシドであり、

[dR] (G) はDNAグアニンヌクレオシドであり、
 [dR] (T) は、DNAチミンヌクレオシドであり、
 [dR] (A) はDNAアデニンヌクレオシドであり、
 [dR] ([C]) はDNAシトシンヌクレオシドであり、

[sP] はホスホロチオエートヌクレオシド間結合(立体的に定義されていない)。

【0250】

HELMのための更なる情報およびオープンソースのツールは、インターネットアドレス www.pistoiaalliance.org/helm-tools/ および www.pistoiaalliance.org/membership/about/ で見つけることができる。特に、表4において、「RNA1」および「\$\$\$\$V2.0」という呼称は、HELM配列のコンピュータ解析に有用な情報を表し、括弧の間(すなわち、「{」と「}」との間)に定義されるオリゴヌクレオチド配列を限定すると見なされるべきではない。

40

50

【表 4】

表 4. HELM アノテーションによって定義された化合物。

CMP ID NO	HELM
91_1	RNA1{[LR](A)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[dR](G)[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](G)}\$\$\$\$V2.0
66_1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[LR](G)[sP].[LR](T)}\$\$\$\$V2.0
46_1	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}\$\$\$\$V2.0
46_2	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC])}\$\$\$\$V2.0

10

20

30

40

50

46_3	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
46_4	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
46_5	RNA1{[LR]([5meC])[sP].[LR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[LR](T)[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
25_1	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
25_2	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
25_3	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
25_4	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
25_5	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
25_6	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR](A)[sP].[LR](T)[sP].[LR](G)]\$\$\$\$V2.0
40_1	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
40_2	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[dR](C)[sP].[LR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0
40_3	RNA1{[LR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](G)[sP].[LR]([5meC])[sP].[dR](A)[sP].[dR](C)[sP].[dR](G)[sP].[dR](T)[sP].[dR](C)[sP].[dR](C)[sP].[dR](T)[sP].[LR]([5meC])[sP].[LR]([5meC]))\$\$\$\$V2.0

10

20

30

40

【 0 2 5 1 】

製造方法

更なる態様において、本発明は、ヌクレオチド単位を反応させ、それによってオリゴヌクレオチドからなる共有結合された連続ヌクレオチド単位を形成することを含む、本発明のオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供する。好ましくは、この方法は、ホスホロアミダイト化学を使用する（例えば、Caruthers et al, 1987, Methods in Enzymology vol. 154, pages 287-313を参照）。更なる実施形態において、この方法は、連続ヌクレオチド配列をコンジュゲート部分（リガンド）と反応させて、コンジュゲート部分をオリゴヌクレオチドに共

50

有結合させることを更に含む。更なる態様において、本発明のオリゴヌクレオチドまたはコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを、薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩、および／また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が提供される。

【0252】

薬学的な塩

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

10

20

【0253】

更なる態様において、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそのコンジュゲートの薬学的に許容され得る塩を提供する。好ましい実施形態において、薬学的に許容され得る塩は、ナトリウムまたはカリウム塩である。

【0254】

医薬組成物

更なる態様において、本発明は、前述のオリゴヌクレオチドおよび／またはオリゴヌクレオチドコンジュゲートまたはその塩のいずれかと、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、塩および／またはアジュバントとを含む、医薬組成物を提供する。薬学的に許容され得る希釈剤には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が含まれ、薬学的に許容され得る塩には、限定するものではないが、ナトリウム塩およびカリウム塩が含まれる。いくつかの実施形態において、薬学的に許容され得る希釈剤は、無菌リン酸緩衝生理食塩水である。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、50~300 μ M 溶液の濃度で薬学的に許容され得る希釈剤中で使用される。

30

【0255】

本発明での使用に適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見られる。薬物送達の方法の簡単な概説については、例えば、Langer (Science 249:1527-1533, 1990)を参照されたい。国際公開第2007/031091号は、薬学的に許容され得る希釈剤、担体およびアジュバントの適切で好ましい更なる例を提供する(参照により本明細書に組み込まれる)。適切な用量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との組合せ、プロドラッグ製剤もまた、国際公開第2007/031091号に提供されている。

40

【0256】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、医薬組成物または製剤の調製のために、薬学的に許容され得る活性または不活性物質と混合すること

50

ができる。医薬組成物の調製のための組成物および方法は、限定されるものではないが、投与経路、疾患の程度、または投与される用量を含む多くの基準に依存する。

【0257】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌されても、または滅菌フィルタにかけられてもよい。得られた水溶液は、そのまま使用するために包装するか、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌水性担体と組み合わせられる。調製物のpHは、典型的には3〜11、より好ましくは5〜9または6〜8、最も好ましくは7〜8、例えば7〜7.5であろう。得られた固体形態の組成物は、錠剤またはカプセルの密封パッケージ等のように、各々が上記の薬剤または薬剤群の固定量を含む複数の単回用量単位で包装することができる。固体形態の組成物はまた、局所適用可能なクリームまたは軟膏用に設計された絞り出し可能なチューブ等の柔軟な量の容器に包装することもできる。

10

【0258】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドコンジュゲートはプロドラッグである。特にオリゴヌクレオチドコンジュゲートに関して、プロドラッグが作用部位、例えば標的細胞に送達されると、コンジュゲート部分はオリゴヌクレオチドから切断される。

【0259】

用途

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

20

【0260】

研究では、このようなオリゴヌクレオチドを使用して、細胞（例えば、*in vitro*細胞培養物）および実験動物におけるApoE4タンパク質の合成を特異的に調節し、それによって標的の機能分析または治療的介入の標的としてのその有用性の評価を促進し得る。典型的には、標的調節は、タンパク質を生成するmRNAを分解または阻害し、それによってタンパク質形成を防止することによって、またはタンパク質を生成する遺伝子もしくはmRNAのモジュレータを分解もしくは阻害することによって達成される。

【0261】

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

30

【0262】

本発明は、ApoE4を発現している標的細胞におけるApoE4発現を調節するためのインビボまたはインビトロ方法を提供し、この方法は、本発明のオリゴヌクレオチドを前記細胞に有効量で投与することを含む。

【0263】

いくつかの実施形態において、標的細胞は、哺乳動物細胞、特にヒト細胞である。標的細胞は、哺乳動物の組織の一部を形成するインビトロ細胞培養物またはインビボ細胞であってよい。好ましい実施形態において、標的細胞は、脳または中枢神経系に存在する。特に、大脳皮質、延髄／橋、中脳、前頭皮質、脳幹、小脳、および脊髄の細胞は、関連する標的領域であり得る。ADの処置には、能領域の大脳皮質、髄質／能橋、中脳領域の標的縮小が有利である。AD様病変を有するPSP等のPSPの処置には、脳領域の延髄／橋および中脳における標的縮小が有利である。特に、ミクログリア、ニューロン、神経細胞、星状膠細胞、軸索および基底核は、関連する細胞型であるか、または関連する細胞型を含有する。

40

【0264】

診断では、オリゴヌクレオチドを使用して、ノーザンブロッティング、*in situ*ハイブリダイゼーションまたは同様の技術により、細胞および組織におけるApoE4発現を検出および定量することができる。

【0265】

50

治療のために、オリゴヌクレオチドは、A p o E 4 の発現を調節することによって処置し得る疾患または障害を有することが疑われる動物またはヒトに投与し得る。

【0266】

治療のために、オリゴヌクレオチドはまた、A p o E 4 の発現を調節することによって処置され得る疾患または障害を発症するリスクがある動物またはヒトに投与される場合がある。

【0267】

治療のために、オリゴヌクレオチドはまた、A p o E 4 の発現を調節することによって処置され得る疾患または障害を有すると診断される動物またはヒトに投与される場合がある。

【0268】

特に、本発明は、疾患または障害を処置または予防する方法であって、治療有効量または予防有効量の本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲートまたは医薬組成物を、疾患または障害に罹患しているか、疾患または障害のリスクがあるか、または疾患または障害に罹患しやすい対象に投与することを含む方法を提供する。

【0269】

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

【0270】

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または医薬組成物は、典型的には有効量で投与される。

【0271】

本発明はまた、本明細書で言及される疾患または障害を処置または予防するための医薬品を製造するための、または本明細書で言及される障害を処置または予防する方法のための、記載される本発明のオリゴヌクレオチドまた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。

【0272】

本明細書で言及されるような疾患または障害は、A p o E 4 の発現に関連する。本発明の治療的適用は好ましくは、A p o E 4 の異常なレベルおよび／または活性によって引き起こされる疾患または障害に対する処置または予防のために使用される。

【0273】

有利には、本発明の治療的適用は、ゲノム中に A P O E ϵ 4 遺伝子の少なくとも1つのコピーを有するそのような疾患または障害に罹患しているか、またはそのような疾患または障害のリスクがある対象の処置に使用される。

【0274】

いくつかの実施形態において、疾患または障害に罹患しているかまたはそのリスクがある対象は、ゲノム中に A P O E ϵ 4 遺伝子のコピーを保有する。

【0275】

いくつかの実施形態において、疾患または障害に罹患しているかまたはそのリスクがある対象は、ゲノム中に A P O E ϵ 3 遺伝子のコピーを保有する。

【0276】

いくつかの実施形態において、疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある対象は、ヘテロ接合遺伝子型 A P O ϵ 3 / ϵ 4 を有する。

【0277】

いくつかの実施形態において、疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある対象は、ヘテロ接合遺伝子型 A P O ϵ 2 / ϵ 4 を有する。

【0278】

いくつかの実施形態において、疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある対象は、ホモ接合遺伝子型 A P O ϵ 4 / ϵ 4 を有する。

【0279】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、疾患に罹患しているかまたは疾患のリスクがある対象は、APO ε 4 遺伝子についてホモ接合性である。

【0280】

いくつかの実施形態において、神経障害、例えばアルツハイマー病（AD）、前頭側頭型認知症（FTD）、ピック病（PiD）、進行性核上性麻痺（PSP）、パーキンソン病（PD）等の運動障害、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病C1型等）を含む神経変性疾患からなる群から選択される神経障害のリスクがある、神経障害を有すると疑われる、または神経障害と診断された対象に対して処置が行われる。

【0281】

一実施形態において、本発明は、AD、FTD、PiD、PSP、運動障害、例えばPD、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病C1型から選択される疾患または障害の処置に使用するためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲートまたは医薬組成物に関する。

【0282】

特定の実施形態において、疾患または障害は、ADである。ADは、例えば、遅発性AD（65歳超）であり得る。ADは、いくつかの実施形態において、優性AD変異のないADであり得る。ADは、早発性ADであり得る。ADはまた、進行性核上性麻痺（PSP）患者におけるADまたはAD型病態であり得る。

【0283】

特定の実施形態において、疾患または障害は、前頭側頭型認知症（FTD）である。

【0284】

特定の実施形態において、疾患または障害は、ピック病（PiD）である。

【0285】

特定の実施形態において、疾患または障害は進行性核上性麻痺（PSP）である。

【0286】

特定の実施形態において、疾患または障害は、運動障害である。例えば、運動障害は、パーキンソン病（PD）であり得る。

【0287】

特定の実施形態において、疾患または障害は、レビー小体型認知症である。

【0288】

特定の実施形態において、疾患または障害は、ダウン症候群を有する対象における認知症である。

【0289】

特定の実施形態において、疾患または障害は、ニーマン・ピック病C1型である。

【0290】

特定の実施形態において、疾患または障害は、認知症である。任意に、認知症は、AD、FTD、PiD、PSP、PD、レビー小体型認知症、ダウン症候群を有する対象における認知症、またはニーマン・ピック病C1型のうちのいずれか1つ以上における認知症、またはこれらに関連する認知症である。

【0291】

投与

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

【0292】

いくつかの実施形態において、投与は、髄腔内投与を介する。

【0293】

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

【0294】

10

20

30

40

50

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

【0295】

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

【0296】

本発明はまた、髄腔内投与用の剤形である医薬の製造のために記載されるような本発明のオリゴヌクレオチドまた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。

【0297】

併用療法

いくつかの実施形態において、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または医薬組成物は、別の治療剤との併用処置で使用される。治療剤は、例えば、上記の疾患または障害の標準ケアであり得る。

【0298】

配列

配列番号1-rs429358を有するNM_001302690.2 (APOE4、mRNA)

```
1 ggatggggag ataagagaag accaggaggg agttaaata ggaatgggtt gggg
g cggct
61 tggtaaattgt gctgggatta ggctgttgca gataatgcaa caaggcttgg aaggct
a acc
121 tgggactggc caatcacagg caggaagatg aaggttctgt gggctgctgt gctggt
caca
181 ttcctggcag gatgccaggc caagggtggag caagcgggtg agacagagcc ggag
cccgag
241 ctgcgccagc agaccgagtg gcagagcggc cagcgtggg aactggcact gggt
cgcttt
301 tgggattacc tgcgctgggt gcagacactg tctgagcagg tgcaggagga gctgc
tcagc
361 tcccagggtca cccagggaact gagggcgctg atggacgaga ccatgaagga gttga
aggcc
421 tacaaatcgg aactggagga acaactgacc ccggtggcgg aggagacgcg ggca
cggctg
481 tccaaggagc tgcaggcggc gcaggcccg ctgggcgcgg acatggagga cgtg
cgcggc
541 cgcctggtgc agtaccgcgg cgagggtgcag gccatgctcg gccagagcac cgag
gagctg
601 cgggtgcgcc tcgcctcca cctgcgcaag ctgcgtaagc ggctcctccg cgatg
ccgat
661 gacctgcaga agcgcctggc agtgtaccag gccggggccc gcgagggcgc cgag
cgcggc
721 ctcagcgcca tccgcgagcg cctggggccc ctggtggaac agggccgcgt gcgg
gccgcc
781 actgtgggct ccctggccgg ccagccgcta caggagcggg cccaggcctg gggc
gagcgg
841 ctgcgcgcgc ggatggagga gatgggcagc cggacccgcg accgcctgga cgag
gtgaag
901 gagcaggtgg cggaggtgcg cgccaagctg gaggagcagg cccagcagat acgc
ctgcag
```

10

20

30

40

50

961 gccgaggcct tccaggcccc cctcaagagc tggttcgagc ccctggtgga agaca
tgcag
1021 cgccagtggg ccgggctggt ggagaagggt caggctgccg tgggcaccag cgcc
gccccct
1081 gtgcccagcg acaatcactg aacgccgaag cctgcagcca tgcgacccca cgcc
accccg
1141 tgcctcctgc ctccgcgcag cctgcagcgg gagaccctgt ccccgcccca gccgt
cctcc
1201 tgggggtggac cctagtttaa taaagattca ccaagtttca cgca
配列番号 2 - NM_001302690.2 (APOE3、mRNA)
1 ggatggggag ataagagaag accaggaggg agttaaata ggaatgggtt gggg
gcggct
61 tggtaaagt gctgggatta ggctgttgca gataatgcaa caaggcttgg aaggct
aacc
121 tgggactggc caatcacagg caggaagatg aaggttctgt gggctgcgtt gctggt
caca
181 ttcctggcag gatgccaggc caagggtggag caagcgggtg agacagagcc ggag
cccgag
241 ctgcgccagc agaccgagtg gcagagcggc cagcgtggg aactggcact gggt
cgcttt
301 tgggattacc tgcgctgggt gcagacactg tctgagcagg tgcaggagga gctgc
tcagc
361 tcccagggtca cccaggaact gagggcgctg atggacgaga ccatgaagga gttga
aggcc
421 tacaaatcgg aactggagga acaactgacc ccggtggcgg aggagacgcg ggca
cggctg
481 tccaaggagc tgcaggcggc gcaggccccg ctgggcgcgg acatggagga cgtg
tgcggc
541 cgcctggtgc agtaccgcgg cgagggtgcag gccatgctcg gccagagcac cgag
gagctg
601 cgggtgcgcc tcgcctcca cctgcgcaag ctgcgtaagc ggctcctccg cgatg
ccgat
661 gacctgcaga agcgcctggc agtgtaccag gccggggccc gcgagggcgc cgag
cgcggc
721 ctgagcgcca tccgcgagcg cctggggccc ctggtggaac agggccgcgt gcgg
gccgcc
781 actgtgggct ccctggccgg ccagccgcta caggagcggg cccaggcctg gggc
gagcgg
841 ctgcgcgcgc ggatggagga gatgggcagc cggaccgcg accgcctgga cgag
gtgaag
901 gagcagggtg cgagaggtgc cgccaagctg gaggagcagg cccagcagat acgc
ctgcag
961 gccgaggcct tccaggcccc cctcaagagc tggttcgagc ccctggtgga agaca
tgcag
1021 cgccagtggg ccgggctggt ggagaagggt caggctgccg tgggcaccag cgcc
gccccct
1081 gtgcccagcg acaatcactg aacgccgaag cctgcagcca tgcgacccca cgcc
accccg
1141 tgcctcctgc ctccgcgcag cctgcagcgg gagaccctgt ccccgcccca gccgt
cctcc

10

20

30

40

50

1201 tggggtggac cctagttaa taaagattca ccaagtttca cgca

配列番号 3-XM__005589554.2 (マカカ・ファシクラリス (macaca fascicularis) アポリポタンパク質 E (APOE)、mRNA)

1 atgagctcag gcgcctctag aaagtgtagc tgggacctcg ggaagccctg gcctccagac

61 tggccaatca caggcaggaa gatgaagggt ctgtgggctg cgttgctggt cacattcctg

121 gcaggatgcc aggccaagggt ggagcaaccg gtggagccag agacggaacc cga gcttcgc

181 cagcaggctg aggggcagag cggccagccc tgggagctgg cactgggtcg cttttgggat 10

241 tacctgcgct ggggtgcagac actgtctgag cagggtgcagg aggagctgct cagcccag

301 gtcacccagg aactgacgac gctgatggat gagacatga aggagttaa ggcctacaaa

361 tcggaactgg aggaacagct gagcccgggt gcggaggaga cgcgggcacg gctgtccaag

421 gagctgcagg cggcgcaggc ccggctgggt gccgacatgg aggacgtgcg cagccgcctg

481 gtgcagtacc gcagcgagggt gcaggccatg ctggggcaga gtaccgagga gctgcggggc 20

541 cgcctcgcct cccacctgcg caagctgcgc aagcggctcc tccgcgatgc tgatgacctg

601 cagaagcgcc tggcagtgtg tcaggccggg gcccgcgagg gcgccgagcg cgggggtcagc

661 gccatccgcg agcgcctggg acccctgggt gagcagggcc gcgtgcgggc cgccactgtg

721 ggctccctgg ccagccagcc gcttcaggag cgggcccagg ccttgggtga gcggcttcgc

781 gcacggatgg aggagatggg cagccggacc cgcgaccgcc tggacgaggt gaaggagcag 30

841 gtggcggagg tgcgcgcaa gctggaggaa caggcccagc agataagcct gcaggccgag

901 gccttccagg cccgcctcaa gagctggttc gagcccctcg tggaagatat gcaggccag

961 tgggctgggc tgggtggagaa ggtgcaggct gccgtgggcg ccagcaccgc ccctgtgccc

1021 agcgacaatc actgaacgcc caggcctaca gccatgcgac ccgactccac cccatgcctc

1081 ctctctccgc tcagcctgca gcgggagacc ctgtccccgc cccagccgtc ctccagggggt 40

1141 gggccctagt ttaataaaga ttcgccaagt ttcaccgca

【0299】

本発明の実施形態

1. 8～50ヌクレオチド長、例えば10～30ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号1として示されるアポリポタンパク質 (Apo) E4コード核酸の516位～556位内の標的配列に少なくとも80%相補的である少なくとも10ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、前記標的配列が、配列番号1の535位を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0300】

2. 配列番号1の535位のヌクレオチドに相補的である前記連続ヌクレオチド配列のヌクレオチドが、グアニン（g）核酸塩基を含むことを条件として、前記連続ヌクレオチド配列が、任意に1個のミスマッチ、2個のミスマッチ、および3個のミスマッチから選択される、前記標的配列と比較して0～3個のミスマッチを有する、項1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0301】

3. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の516位～556位内の標的配列に少なくとも90%相補的である、先行する項目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。

【0302】

4. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の516位～556位内の標的配列に100%相補的である、先行する項目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。

【0303】

5. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の522位～548位内の標的配列に相補的である、先行する項目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。

【0304】

6. 前記連続ヌクレオチド配列が、表2のR__4～R__96から選択される標的配列に相補的である、先行する項目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。

【0305】

7. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の残基522～535（R__25）、残基525～537（R__40）、残基526～538（R__46）、残基530～546（R__66）および残基535～548（R__91）から選択される標的配列に相補的である、先行する項目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。

【0306】

8. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号4～96からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる、先行する項目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。

【0307】

9. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号25、40、46、66および91からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる、先行する項目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。

【0308】

10. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号25を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0309】

11. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号40を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0310】

12. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号46を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0311】

13. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号66を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0312】

14. 前記連続ヌクレオチド配列が、配列番号91を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0313】

15. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヒト等の哺乳動物のアポリポタンパク質（Apo）E4の発現を低下させることができる、先行する項目のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0314】

16. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、標的細胞における、ヒト等の哺乳動物のアポリポタンパク質 (Apo) E4 をコードする mRNA の発現レベルを、前記標的の正常発現レベルと比較して、少なくとも 20 %、例えば少なくとも 30 %、例えば少なくとも 40 %、例えば少なくとも 50 %、例えば少なくとも 60 %、例えば少なくとも 70 %、例えば少なくとも 80 %、例えば少なくとも 90 % 低下させることができる、先行する項目のいずれか 1 項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0315】

17. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、Apo E4 の発現を低下させることができ、その結果、

(a) 配列番号 1 によってコードされるヒト Apo E4 タンパク質をコードする mRNA であって、配列番号 1 の 516 ~ 556 の位置に対応するセグメントを含む mRNA、および

(b) 配列番号 2 によってコードされるヒト Apo E3 タンパク質をコードする mRNA であって、配列番号 2 の 516 ~ 556 の位置に対応するセグメントを含む mRNA、を含む標的細胞において、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヒト Apo E4 をコードする mRNA の前記レベルを低下させ、その結果、

(i) 対照と比較した場合の残存 Apo E3 mRNA レベルのパーセンテージと、

(ii) 対照と比較した場合の残存 Apo E4 mRNA レベルのパーセンテージとの間の比

が、1 よりも大きく、例えば、少なくとも 1.5、例えば、少なくとも 2、例えば、少なくとも 2.5、例えば、少なくとも 3、例えば、少なくとも 3.5、例えば、少なくとも 4 であり、任意に、前記対照が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの非存在下での対照標的細胞における mRNA のレベルである、先行する項目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。

【0316】

18. 前記標的配列が、RNA 内に位置する、先行する項目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。

【0317】

19. 前記 RNA が mRNA である、項 18 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0318】

20. 前記 mRNA が、成熟 mRNA である、項 19 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0319】

21. 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 ヌクレオチド長を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0320】

22. 14 ~ 30 ヌクレオチド長を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0321】

23. 16 ~ 24 ヌクレオチド長を含むかまたはこれからなる、先行する項目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。

【0322】

24. 前記連続ヌクレオチド配列が、14 ~ 22 ヌクレオチドの長さを有する、先行する項目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。

10

20

30

40

50

【0323】

25. 前記連続ヌクレオチド配列が、少なくとも16ヌクレオチド、例えば16、17、18、19、20、21または22ヌクレオチドの長さを有する、先行する項目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。

【0324】

26. 一本鎖である、先行する項目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。

【0325】

27. 前記連続ヌクレオチド配列が、1つ以上の修飾ヌクレオシド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドまたはアンロックド核酸(UNA)ヌクレオシドを含む、先行する項目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。

10

【0326】

28. 前記連続ヌクレオチド配列が、1つ以上の2'糖修飾ヌクレオシドを含む、先行する項目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。

【0327】

29. 前記1つ以上の2'糖修飾ヌクレオシドが、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、およびロックド核酸(LNA)ヌクレオシドからなる群から独立して選択される、項28に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【0328】

30. 前記1つ以上の2'糖修飾ヌクレオシドが、少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含む、項29に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0329】

31. 前記少なくとも1つのLNAヌクレオシドが、オキシ-LNA、アミノ-LNA、チオ-LNA、cETおよびENA LNAヌクレオシドからなる群から独立して選択される、項30に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0330】

32. 前記修飾LNAヌクレオシドが、2'-4'架橋-O-CH₂-を有するオキシ-LNAである、項31に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

30

【0331】

33. 前記オキシ-LNAが、ベータ-D-オキシ-LNAである、項32に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0332】

34. 前記連続ヌクレオチド配列が、4~8個のLNAヌクレオシドを含む、項29~33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。

【0333】

35. 少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含む、先行する項目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。

【0334】

36. ヌクレアーゼ耐性修飾ヌクレオシド間結合を含む、先行する項目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。

40

【0335】

37. 前記連続ヌクレオチド配列内の前記ヌクレオシド間結合の少なくとも50%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、先行する項目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。

【0336】

38. 前記連続ヌクレオチド配列内の前記ヌクレオシド間結合の少なくとも80%が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、先行する項目のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

50

【0337】

39. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、RNAse Hを動員することが可能である、先行する項目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。

【0338】

40. 前記オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列が、ギャップマーである、先行する項目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。

【0339】

41. 前記オリゴヌクレオチドまたはその連続ヌクレオチド配列が、式5'-F-G-F'-3'のギャップマーであり、領域FおよびF'のそれぞれが、独立して、1～8個のヌクレオシドを含むかまたはそれからなり、そのうち2～5個が2'糖修飾ヌクレオシドであり、領域Gが、RNAse Hを動員することができる6～16個のヌクレオシドの間の領域である、先行する項目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。

10

【0340】

42. 前記領域Gが、6～16個のDNAヌクレオシドを含む領域である、項41に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0341】

43. 2'糖修飾ヌクレオシドが、FおよびF'領域の5'および3'末端を規定する、項41および42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。

【0342】

44. 前記2'糖修飾ヌクレオシドが、項29～33のいずれか一項に記載のものである、項41～43のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【0343】

45.

(a) 前記F領域が2～8ヌクレオチド長であり、2～5個の同一LNAヌクレオシドおよび0～4個のDNAヌクレオシドからなり、

(b) 前記F'領域が2～6ヌクレオチド長であり、2～4個の同一LNAヌクレオシドおよび0～2個のDNAヌクレオシドからなり、

(c) 領域Gが6～14個のDNAヌクレオチドである、項41～44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。

【0344】

46. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下からなる群から選択される化合物であるか、またはそれを含む、項1～45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：

30

ACcAgGcgggccgCG	(配列番号91；化合物番号91__1)
CAGggcgggccggaacGT	(配列番号66；化合物番号66__1)
CGcggaacgtCCTC	(配列番号46；化合物番号46__1)
CGcggaacgtCCTC	(配列番号46；化合物番号46__2)
CGcGgaacgtCCTC	(配列番号46；化合物番号46__3)
CGCggaacgtCCTC	(配列番号46；化合物番号46__4)
CGcGCgaacgtCCTC	(配列番号46；化合物番号46__5)
GCaacgtccctccATG	(配列番号25；化合物番号25__1)
GCAcgtccctccacATG	(配列番号25；化合物番号25__2)
GCaacgtccctccCaATG	(配列番号25；化合物番号25__3)
GCaacgtccctCCATG	(配列番号25；化合物番号25__4)
GCaacgtccctCCaATG	(配列番号25；化合物番号25__5)
GCaacgtccctCCATG	(配列番号25；化合物番号25__6)
GCggaacgtccctCC	(配列番号40；化合物番号40__1)
GCggaacgtccctCC	(配列番号40；化合物番号40__2)
GCgGCgaacgtccctCC	(配列番号40；化合物番号40__3)

40

(式中、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを示し、小文字はDNAヌクレ

50

オシドを示し、大文字Cは5-メチルシトシンベーターD-オキシLNAヌクレオシドを示し、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である)。

【0345】

47. ACCAGGCGCGCG (配列番号91; 化合物番号91__1)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0346】

48. CAGGCGCGCGCACGT (配列番号66; 化合物番号66__1)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0347】

49. CGCGCACGTCCTC (配列番号46; 化合物番号46__1)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 10

【0348】

50. CGCGCACGTCCTC (配列番号46; 化合物番号46__2)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0349】

51. CGCGCACGTCCTC (配列番号46; 化合物番号46__3)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0350】

52. CGCGCACGTCCTC (配列番号46; 化合物番号46__4)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 20

【0351】

53. CGCGCACGTCCTC (配列番号46; 化合物番号46__5)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0352】

54. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__1)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0353】

55. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__2)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0354】

56. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__3)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 30

【0355】

57. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__4)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0356】

58. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__5)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0357】

59. GCACGTCCTCCATG (配列番号25; 化合物番号25__6)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 40

【0358】

60. CGGCGACGTCCTCC (配列番号40; 化合物番号40__1)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0359】

61. CGGCGACGTCCTCC (配列番号40; 化合物番号40__2)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0360】

62. CGGCGACGTCCTCC (配列番号40; 化合物番号40__3)である、項46に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。 50

【0361】

63. 5つのうちの1つ、例えば、4つのうちの1つ、例えば前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'に1番目、3番目、および4番目に近いヌクレオチドのうちの1つ、またはそれらの連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の535位に相補的であり、グアニン核酸塩基を含む、項1～46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。

【0362】

64. 6つのうちの1つ、例えば前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'に1番目および6番目に近いヌクレオチドのうちの1つ、またはそれらの連続ヌクレオチド配列が、配列番号1の535位に相補的であり、グアニン核酸塩基を含む、項1～46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。

10

【0363】

65. 領域Gのヌクレオチドの1つが、配列番号1の535位に相補的であり、グアニン核酸塩基を含む、項1～46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。

【0364】

66. 領域Fのヌクレオチドの1つが、配列番号1の535位に相補的であり、グアニン核酸塩基を含む、項1～46のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【0365】

67. 領域F'のヌクレオチドの1つが、配列番号1の535位に相補的であり、グアニン核酸塩基を含む、項1～46のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

【0366】

68. 先行する項目のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、前記オリゴヌクレオチドに共有結合した少なくとも1つのコンジュゲート部分とを含む、コンジュゲート。

【0367】

69. 前記コンジュゲート部分が、炭水化物、細胞表面受容体リガンド、原薬、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素、ビタミン、ウイルスタンパク質、またはそれらの組合せから選択される、項68に記載のコンジュゲート。

30

【0368】

70. 前記コンジュゲート部分が、脳血液関門を通過する送達を促進する、項69に記載のコンジュゲート。

【0369】

71. 前記コンジュゲート部分が、トランスフェリン受容体を標的とする抗体または抗体断片である、項70に記載のコンジュゲート。

【0370】

72. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドと前記コンジュゲート部分との間に配置されたリンカーを含む、項68～70のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【0371】

73. 前記リンカーが、生理学的に不安定なリンカーである、項72に記載のコンジュゲート。

【0372】

74. 項1～67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または項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲートの、薬学的に許容され得る塩。

【0373】

75. 項1～67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、および／または項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、および／または項74に記載の薬学的に許容され得る塩と、薬学的に許容され得る希釈剤、溶媒、担体、塩および／

50

またはアジュバントとを含む、医薬組成物。

【0374】

76. ヌクレオチド単位を反応させ、それによって前記オリゴヌクレオチドに含まれる共有結合された連続ヌクレオチド単位を形成することを含む、項1～67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を製造する方法。

【0375】

77. 前記連続ヌクレオチド配列を、非ヌクレオチドコンジュゲーション部分と反応させることを更に含む、項76に記載の方法。

【0376】

78. 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを、薬学的に許容され得る希釈剤、担体、塩、および／またはアジュバントと混合することを含む、項75に記載の医薬組成物を製造する方法。

【0377】

79. ApoE4を発現する標的細胞内でApoE4発現を調節するための方法であって、前記方法が、項1～67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、項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、または項74に記載の医薬組成物を、前記細胞に有効量で投与することを含む、方法。

【0378】

80. インビボ方法またはインビトロ方法である、項79に記載の方法。

【0379】

81. 疾患の処置または予防方法であって、治療的または予防的に有効な量の、項1～67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、項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項74に記載の薬学的に許容され得る塩、または項75に記載の医薬組成物を、前記疾患に罹患しているまたはそのリスクがある対象に投与することを含む、方法。

【0380】

82. 医薬品として使用するための、項1～67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、項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項74に記載の薬学的に許容され得る塩、または項75に記載の医薬組成物。

【0381】

83. 疾患の処置または予防方法における使用のための、項1～67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、項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項74に記載の薬学的に許容され得る塩、または項75に記載の医薬組成物。

【0382】

84. 疾患の処置または予防方法のための医薬品の調製のための、項1～67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、項68～73のいずれか一項に記載のコンジュゲート、項74に記載の薬学的に許容され得る塩、または項75に記載の医薬組成物の使用。

【0383】

85. 前記疾患が、ApoE4のインビボ活性と関連する、項79～81のいずれか一項に記載の方法、項82および83のいずれか一項に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または項84に記載の使用。

【0384】

86. ApoE4の前記インビボ活性が、対照と比較して、少なくとも30%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%低下しており、任意に、前記対照が、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲートまたは医薬組成物を投与する前のApoE4の前記インビボ活性である、項85に記載の使用の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または

10

20

30

40

50

使用。

【0385】

87. 前記疾患が、任意に、前記対象からの生物学的試料におけるApoE4の前記発現レベルに関連する、項79～81および85～86のいずれか一項に記載の方法、項82および83のいずれか一項に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または項84に記載の使用。

【0386】

88. ApoE4の前記発現レベルが、対照と比較して、少なくとも30%低下、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%低下しており、任意に、前記コントロールが、前記アンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲートまたは医薬組成物を投与する前のApoE4の前記発現レベルである、項87に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

10

【0387】

89. 前記疾患に罹患しているまたは前記疾患のリスクがある前記対象が、前記ゲノム中に少なくとも1コピーのAPOEε4遺伝子を保有している、項79～88のいずれか一項に記載の方法、アンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、使用のための塩もしくは医薬組成物、または使用。

【0388】

90. 疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある対象が、APOEε3/ε4遺伝子型の対象である、項89に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

20

【0389】

91. 疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある対象が、APOEε4/ε4遺伝子型の対象である、項89に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

【0390】

92. 前記疾患が、認知症に関連する疾患である、項79～91のいずれか一項に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

30

【0391】

93. 前記疾患が、アルツハイマー病(AD)、前頭側頭型認知症(FTD)、ピック病(PiD)、進行性核上性麻痺(PSPP)、パーキンソン病(PD)等の運動障害、レビー小体型認知症、ダウン症候群における認知症、およびニーマン・ピック病C1型等)から選択される、項79～92のいずれか一項に記載の使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

【0392】

94. 前記疾患が、ADである、項79～93のいずれか一項に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

40

【0393】

95. 疾患に罹患しているまたは疾患のリスクがある前記対象が、ヒト等の哺乳動物の対象である、項79～94のいずれか一項に記載の方法、使用のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド、コンジュゲート、塩もしくは医薬組成物、または使用。

【実施例】

【0394】

材料および方法

オリゴヌクレオチドモチーフ配列およびオリゴヌクレオチド化合物

50

【表 5】

表 5：化合物表

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

配列番号	モチーフ配列 * 5 = 3	設計	オリゴヌクレオチド 化合物	化合物 番号	配列番号 1 における 開始
9 1	accaggcgccgcg	2-1-1-1-1-1-2	ACcAgGcggccgCG	9 1__1	5 3 5
6 6	caggcgccgcgcacgt	2-1 3-2	CAGgcggccgcgcacGT	6 6__1	5 3 0
4 6	cgcgacgtcctc	2-7-1-1-2	CGcgacgtCcTC	4 6__1	5 2 6
4 6	cgcgacgtcctc	2-8-3	CGcgacgtcCTC	4 6__2	5 2 6
4 6	cgcgacgtcctc	2-1-1-6-3	CGcGcagtcCTC	4 6__3	5 2 6
4 6	cgcgacgtcctc	3-8-2	CGCgcagtcctcTC	4 6__4	5 2 6
4 6	cgcgacgtcctc	2-1-2-6-2	CGcGCagtcctcTC	4 6__5	5 2 6
2 5	gcagtcctccatg	2-9-3	GCagtcctccATG	2 5__1	5 2 2
2 5	gcagtcctccatg	3-9-2	GCAgtcctccaTG	2 5__2	5 2 2
2 5	gcagtcctccatg	2-8-1-1-2	GCagtcctcCaTG	2 5__3	5 2 2
2 5	gcagtcctccatg	2-7-1-1-3	GCagtcctCcATG	2 5__4	5 2 2
2 5	gcagtcctccatg	2-7-1-2-2	GCagtcctCcaTG	2 5__5	5 2 2
2 5	gcagtcctccatg	2-8-4	GCagtcctcCATG	2 5__6	5 2 2
4 0	gcgcagtcctcc	2-9-2	GCgcagtcctCC	4 0__1	5 2 5
4 0	gcgcagtcctcc	2-2-1-6-2	GCgcAgtcctCC	4 0__2	5 2 5
4 0	gcgcagtcctcc	2-1-1-7-2	GCgCagtcctCC	4 0__3	5 2 5

10

20

【0395】

モチーフ配列は、オリゴヌクレオチドに存在する核酸塩基の連続配列を表す。

【0396】

設計は、本明細書の他の箇所に記載されているような交互フランクを含むギャップマー設計 F-G-F' を指す。

30

【0397】

オリゴヌクレオチド化合物において、大文字はベーター D-オキシ LNA ヌクレオシドを示し、小文字は DNA ヌクレオシドを示し、大文字 C は 5-メチルシトシンベーター D-オキシ LNA ヌクレオシドを示し、全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。HELM_アノテーションによるこれらの化合物の説明については、表 4 を参照されたい。

【0398】

オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド合成は当該技術分野で一般に知られている。以下は、適用できるプロトコルである。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド化合物は、使用される装置、支持体および濃度に関してわずかに異なる方法によって製造されていてもよい。

40

【0399】

オリゴヌクレオチドは、1 μmol スケールの MermMade 192 オリゴヌクレオチド合成装置でホスホラミダイト法を使用して、Uny linker ユニバーサル固体支持体 (Org. Process Res. Dev. 2008, 12, 3, 399-410) 上で合成される。合成の終わりに、オリゴヌクレオチドを、アンモニア水を用いて 60 °C で 5 ~ 16 時間、固体支持体から切断する。オリゴヌクレオチドを逆相 HPLC (RP-HPLC) または固相抽出によって精製し、UPLC によって特徴付け、分子量を

50

更にESI-MSによって確認する。

【0400】

オリゴヌクレオチドの伸長：

DNA-A (Bz)、DNA-G (iBu)、DNA-C (Bz)、DNA-T、LNA-A-5-methyl-C (Bz)、LNA-A (Bz)、LNA-G (dmf)、LNA-A-T、2' OMe-A (Bz)、2' OMe (U)、2' OMe (T)、2' OMe-C (Ac)、2' OMe-G (iBu)、2' OMe-G (dmf)を含む5' DMT保護ヌクレオシドβ-シアノエチル-ホスホラミダイトのカップリングは、活性化剤としてアセトニトリル中の0.1Mの5'-O-DMT保護ホスホルミダイトおよびアセトニトリル(0.25M)中のDCI(4,5-ジシアノイミダゾール)の溶液を使用することによって行われる。

10

【0401】

RP-HPLCによる精製：

粗化合物は、Phenomenex Jupiter C18 10μ 150x10 mmカラムでの取RP-HPLCにより精製される。0.1M酢酸アンモニウムpH8およびアセトニトリルを5mL/分の流速で緩衝液として使用する。収集された画分を凍結乾燥して、精製された化合物を典型的には白色固体として得る。

略語：

DCI：4,5-ジシアノイミダゾール

DCM：ジクロロメタン

DMF：ジメチルホルムアミジン

DMT：4,4'-ジメトキシトリチル

THF：テトラヒドロフラン

Bz：ベンゾイル

Ibu：イソブチリル

RP-HPLC：逆相高速液体クロマトグラフィ

20

【0402】

実施例1：APOE3およびAPOE4発現レベルに対する影響についてスクリーニングした15個のオリゴヌクレオチド

ヒトKELLY神経芽腫細胞(ACC 355、DSMZ)を、190μLの標準的な細胞培養培地(RPMI-1640 Sigma R2405、10%FBS、25μg/mLペニシリン-ストレプトマイシン)中、30000細胞/ウェルの96ウェルプレートに、処置の前日に播種した。APOE3およびAPOE4のヘテロ接合遺伝子型に基づいて、KELLY細胞を選択した(Schaffer et al., Genes Nutr. 2014 Jan; 9(1))。処置日に、PBS(Gibco #14190-094)で希釈したオリゴヌクレオチドを添加して、ウェルあたり200μLの総体積でそれぞれ5μMおよび25μMの培地中最終濃度のジムノティック(gymnotic)取込みを得た。

30

【0403】

細胞を、活性蒸発インキュベータ中、37°C、5%CO₂、および湿度98%で5日間インキュベートした。5日目に、細胞培地を培養ウェルからピペティングにより除去し、125μLのRLT buffer(Qiagen)を加え、QiagenのRNeasy 96 kitおよびプロトコルを使用することによりRNAを抽出した。cDNA合成は、4μLのインプットRNAを使用して行い、IScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR(Bio-Rad)を使用して行い、製造者のプロトコルに従ってddPCR supermix for probes(no dUTP)(Bio-Rad)を使用するデジタルドロッププレートPCR用のインプットとして2.5μLを使用した。以下のアッセイを使用した：

40

APOE3/4：TaqMan(登録商標)SNP Genotyping Assay、rs429358(アッセイID C____3084793__20、Thermo

50

F i s c h e r)

HPRT1 : HPRT1 (B i o r a d 製の d d P C R G E X C Y 5 . 5 アッセイ 1 2 0 0 5 5 8 7)

【 0 4 0 4 】

A P O E 3 および A P O E 4 m R N A 濃度は、Q u a n t a S o f t S o f t w a r e (B i o - R a d) を使用してハウスキーピング遺伝子 H P R T 1 と比べて定量化した。

【 0 4 0 5 】

次いで、発現レベルを、それぞれ A P O E 3 および A P O E 4 に対する未処置 P B S 対照の平均に対して正規化した。結果を表 6 に示し、A P O E 3 対 A P O E 4 の比も含む (10
高い比は A P O E 4 選択性を示す) 。

【表 6】

表 6 : データテーブル

それぞれ A P O E 3 および A P O E 4 の残留発現レベル、ならびに A P O E 3 対 A P O E 4 の比が示されている (高い比は A P O E 4 選択性を示す) 。

化合物 番号	APOE3 (5μM)	APOE3 (2.5μM)	APOE4 (5μM)	APOE4 (2.5μM)	APOE3/APOE4 比 (5μM)	APOE3/APOE4 比 (2.5μM)
91__1	ND	12		11	N/A	1.03
66__1	80	49	49	26	1.65	1.90
46__1	55	51	22	14	2.52	3.66
46__2	83	53	29	13	2.84	4.13
46__3	56	46	16	11	3.45	4.25
46__4	39	61	24	28	1.58	2.17
46__5	28	28	9	6	3.27	5.11
25__1	34	11	14	5	2.40	2.19
25__2	12	3	7	2	1.68	1.73
25__3	37	17	16	7	2.27	2.49
25__4	28	19	9	8	2.99	2.25
25__5	21	5	9	3	2.38	1.63
25__6	34	30	13	12	2.69	2.51
40__1	59	34	27	13	2.20	2.50
40__2	27	27	8	8	3.32	3.57
40__3	25	25	13	9	1.96	2.78

【 0 4 0 6 】

本発明の記載された態様の様々な修正および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には明らかであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して記載されているが、特許請求された発明は、そのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではない。実際、関連分野の当業者には明らかである本発明を実施する記載された態様の様々な変更は、以下の実施形態の範囲内であることが意図される。 40

【配列表】

2024540271000001.xml

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP2022/080478

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

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

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/712
ADD. A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7 517 644 B1 (SMITH LARRY J [US]) 14 April 2009 (2009-04-14) claim 1; table X; sequence 154 -----	1-9, 11
X	CN 110 257 510 A (JIANGSU BEAGLE BIOTECH CO LTD) 20 September 2019 (2019-09-20) claims 1-2; sequence 28 -----	1-9, 11
X	WO 2018/178994 A1 (UNIV RAMOT [IL]) 4 October 2018 (2018-10-04) pages 48, 77 - page 79; figures 2, 5 -----	1-9, 11-18 10
X	WO 2013/181618 A2 (UNIV COLUMBIA [US]; ABELIOVICH ASA) 5 December 2013 (2013-12-05) paragraphs [0151], [0011] - [0012], [0017], [0081], [0158] - [0161], [0193] - [0207] -----	1-9, 11-18 10
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2023

Date of mailing of the international search report

01/03/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Piret, Bernard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080478

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/112802 A1 (PREVAIL THERAPEUTICS INC [US]) 4 June 2020 (2020-06-04) pages 6,15 -----	1-9, 11-18
X,P	WO 2021/222065 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; BOSTWICK BRET LEE [US] ET AL.) 4 November 2021 (2021-11-04) the whole document -----	1-18
A	HUYNH TIEN-PHAT V. ET AL: "Age-Dependent Effects of apoE Reduction Using Antisense Oligonucleotides in a Model of [beta]-amyloidosis", NEURON, vol. 96, no. 5, 6 December 2017 (2017-12-06), pages 1013-1023+4, XP055867760, AMSTERDAM, NL ISSN: 0896-6273, DOI: 10.1016/j.neuron.2017.11.014 -----	1-18
A	LITVINCHUK ALEXANDRA ET AL: "Apolipoprotein E4 Reduction with Antisense Oligonucleotides Decreases Neurodegeneration in a Tauopathy Model", ANNALS OF NEUROLOGY, vol. 89, no. 5 24 February 2021 (2021-02-24), pages 952-966, XP055907596, Boston, US ISSN: 0364-5134, DOI: 10.1002/ana.26043 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/ana.26043 -----	1-18
A	WO 2021/172925 A1 (RZNOMICS INC [KR]) 2 September 2021 (2021-09-02) -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/080478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7517644 B1	14-04-2009	US 7517644 B1	14-04-2009
		US 2010010065 A1	14-01-2010
		US 2010172966 A1	08-07-2010

CN 110257510 A	20-09-2019	NONE	

WO 2018178994 A1	04-10-2018	EP 3600449 A1	05-02-2020
		US 2020046853 A1	13-02-2020
		WO 2018178994 A1	04-10-2018

WO 2013181618 A2	05-12-2013	US 2015337030 A1	26-11-2015
		WO 2013181618 A2	05-12-2013

WO 2020112802 A1	04-06-2020	AU 2019388975 A1	24-06-2021
		BR 112021010234 A2	24-08-2021
		CA 3121211 A1	04-06-2020
		CN 113557243 A	26-10-2021
		EP 3887396 A1	06-10-2021
		IL 283496 A	29-07-2021
		JP 2022511453 A	31-01-2022
		KR 20210096168 A	04-08-2021
		US 2022010001 A1	13-01-2022
		WO 2020112802 A1	04-06-2020

WO 2021222065 A1	04-11-2021	AU 2021263554 A1	08-12-2022
		BR 112022021813 A2	17-01-2023
		CA 3181400 A1	04-11-2021
		EP 4143319 A1	08-03-2023
		IL 297702 A	01-12-2022
		WO 2021222065 A1	04-11-2021

WO 2021172925 A1	02-09-2021	AU 2021225696 A1	29-09-2022
		CA 3173742 A1	02-09-2021
		CN 114269925 A	01-04-2022
		EP 3992292 A1	04-05-2022
		JP 2022543446 A	12-10-2022
		WO 2021172925 A1	02-09-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU, CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX, MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW				
スイス国、4 0 7 0 バーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4、ツェー／オー・エフ・ホ フマンーラ・ロシュ・アーゲー				
(72)発明者	モールハート、ホーグ・アニャ			
	デンマーク国、2 9 7 0 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・アー／エス			
(72)発明者	ニマル、ヘレ			
	デンマーク国、2 9 7 0 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・アー／エス			
(72)発明者	ピーダスン、リュケ			
	デンマーク国、2 9 7 0 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・アー／エス			
F ターム (参考)	4C076	AA95	CC01	EE59
	4C084	AA13	NA13	NA14 NA15 ZA02 ZA15 ZA16
	4C086	AA01	AA02	EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 NA15 ZA02 ZA15 ZA16