

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6748219号
(P6748219)

(45) 発行日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月11日(2020.8.11)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/113	(2010.01)
A 61 K 31/7088	(2006.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
A 61 P 31/12	(2006.01)
A 61 P 31/20	(2006.01)
C 12 N	15/113
A 61 K	31/7088
A 61 P	43/00
A 61 P	31/12
A 61 P	31/20

請求項の数 21 (全 142 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-548393 (P2018-548393)	(73) 特許権者	591003013 エフ・ホフマン-ラ・ロシュ・アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日	平成29年3月14日 (2017.3.14)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(65) 公表番号	特表2019-512498 (P2019-512498A)	(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(43) 公表日	令和1年5月16日 (2019.5.16)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(86) 國際出願番号	PCT/EP2017/055925	(74) 代理人	100141977 弁理士 中島 勝
(87) 國際公開番号	W02017/157899		
(87) 國際公開日	平成29年9月21日 (2017.9.21)		
審査請求日	令和2年3月4日 (2020.3.4)		
(31) 優先権主張番号	16160149.7		
(32) 優先日	平成28年3月14日 (2016.3.14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 発現低減用のオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CCtatttaacatcAGACのアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、大文字が - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字が D N A ヌクレオシドを表し、すべての L N A の C が 5 - メチルシトシンであり、そしてすべてのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート・ヌクレオシド間結合である、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチドならびに当該オリゴヌクレオチドに共有結合されたコンジュゲート部分を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 3】

リンクマークが前記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存在する、請求項 2 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 4】

前記コンジュゲート部分が、アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含む、請求項 2 又は 3 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 5】

前記アシアロ糖タンパク質受容体標的化部分が、3 価N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分である、請求項 4 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 6】

前記リンクマークが、生体開裂性リンクマークである、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載のア

10

20

ンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 7】

前記生体開裂性リンカーがヌクレアーゼ感受性リンカーである、請求項6に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 8】

前記生体開裂性リンカーがシチジン - アデノシンジヌクレオチドを含む、請求項 6 又は7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 9】

リンカーが前記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存在し；
さらに前記コンジュゲート部分が、3価N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分であるアシアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含み；ここで前記リンカーが、生体開裂性リンカーであり；さらに前記生体開裂性リンカーがシチジン - アデノシンジヌクレオチドを含む、請求項 2 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は請求項 2 ~ 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コンジュゲート、並びに医薬的に許容される希釈剤、溶媒、担体、塩、および / または補助剤を含む、医薬組成物。

【請求項 11】

前記医薬的に許容される希釈剤が、滅菌リン酸緩衝生理食塩水である、請求項10に記載の医薬組成物。

10

【請求項 12】

前記医薬的に許容される塩が、ナトリウム塩である、請求項 10 又は 11 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 13】

前記医薬的に許容される塩が、カリウム塩である、請求項 10 又は 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

PD-L1を発現する標的細胞におけるPD-L1発現を生体外で調節する方法であって、当該方法が、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 2 ~ 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コンジュゲート、或いは請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を当該細胞に投与することを含む、を含む方法。

30

【請求項 15】

ウイルスに対する免疫応答の回復に使用するための請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記ウイルスがHBVである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

寄生虫に対する免疫応答の回復に使用するための請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記免疫応答の回復が、対照と比較した場合に 1 又は複数のHBV抗原に特異的なCD8 + T 細胞の肝臓における増加である、請求項 15 又は 17 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 19】

医薬として使用するための請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

HBV感染の治療において使用するための、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

HBV感染の治療用の医薬の製造のための、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 2 ~ 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コンジュ

50

ゲート、請求項10～13のいずれか一項に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プログラム死リガンド - 1 (PD-L1) に対して相補的であり且つ肝臓においてPD-L1の発現を低減させる、オリゴヌクレオチド(オリゴマー)に関する。本発明はまた、肝臓感染症又は肝臓における癌に起因するT細胞の疲弊を緩和する方法に関する。関連する感染症としては、マラリア及びトキソプラズマ症(例えば、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium*)、特に三日熱マラリア原虫(*P. vivax*)種、*P. malariae*種、及び*P. falciparum*種)の原生動物により引き起こされるもの)等の、慢性HBV、HCV及びHDV及び寄生虫感染がある。10

【背景技術】

【0002】

プログラム死 - 1 (PD-1) 受容体及びそのリガンドであるPD-L1(又はB7-H1もしくはCD274)からなる共刺激経路は、T細胞の疲弊に直接寄与し、結果として肝臓の慢性感染中にウイルス制御が欠如することが、公知となっている。PD-1経路はまた、この経路において破壊されたマウスが自己免疫疾患を発呈した際に、自己免疫に関与する。

【0003】

PD-1とPD-L1との間の相互作用をブロックする抗体によって、T細胞応答、特にCD8+細胞傷害性T細胞の応答が増強されることが明らかにされてきた(Barber et al 2006 Nature Vol 439 p682及びMaier et al 2007 J. Immunol. Vol 178 p 2714を参照のこと)。20

【0004】

国際公開第2006/042237号パンフレットには、腫瘍におけるPD-L1(B7-H1)の発現を評価することによる癌の診断法が記載されていると共に、PD-1/PD-L1の相互作用を妨害する薬剤を患者に送達することが示唆されている。妨害剤は、抗体、抗体断片、siRNA又はアンチセンスオリゴヌクレオチドとすることができる。そのような妨害剤の具体例も存在しないし、また慢性肝臓感染症の記載も存在していない。30

【0005】

二本鎖RNA(dsRNA、RNAi又はsiRNA)分子を用いるPD-L1のRNA干渉媒介性阻害はまた、例えば、国際公開第2005/007855号パンフレット、国際公開第2007/084865号パンフレット、及び米国特許第8,507,663号明細書にも開示されている。これらはいずれも、肝臓への標的送達について記載されていない。

【0006】

Dolina et al. 2013 Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2 e72には、siRNA分子を標的化するPD-L1を、Kupffer細胞にインビボで送達し、それによりMCMV感染マウスにおけるNK及びCD8+T細胞クリアランスを増強することが、記載されている。この論文が結論付いているところによれば、肝細胞に送達されたsiRNA分子を標的化するPD-L1は、CD8+T細胞エフェクター機能の増強に関して有効ではない。40

【0007】

siRNA手法が、一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド手法とかなり異なるのは、生体内分布及び作用様式が全く異なるためである。Xu et al 2003 Biochem.Biophys.Res.Comm. Vol 306 page 712-717に記載されているように、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びsiRNAは、mRNA中の標的部位に対する優先度が異なる。

【0008】

国際公開第2016/138278号パンフレットには、5'末端に連結された2つ以50

上の一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、P D - L 1 を含む免疫チェックポイントの阻害について、記載されている。この出願は、B型肝炎ウイルス（H B V）又は肝臓への標的送達に関しては、言及していない。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、K u p f f e r 細胞及び肝臓の正弦波状内皮細胞（L S E C s）などの非実質細胞における実質細胞（例えば、肝細胞）及び肝細胞の両方において、肝細胞内のP D - L 1 のm R N A を非常に効率的に低減させる、新規なオリゴヌクレオチドならびにオリゴヌクレオチドコンジュゲートを同定するものである。オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、P D - L 1 の低減又はサイレンシングによって、P D - 1 媒介性阻害を減らし、それによって疲弊したT細胞の免疫刺激を促進する。肝臓の慢性病原性感染におけるT細胞の疲弊を軽減することによって、肝臓の慢性病原性感染中の血中ウイルス抗原レベルの低下、及び免疫制御が回復される。ナチュラルキラー（N K）細胞及びナチュラルキラーT（N K T）細胞はまた、本発明のオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドコンジュゲートによる活性化が可能であるとされている。10

【0010】

オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、肝細胞においてP D - L 1 の局所的低減を確実に遂行し、それにより、P D - L 1 の全身枯渇に関連する肺炎、非ウイルス性肝炎及び大腸炎などの、自己免疫副作用リスクを低減する。

【0011】

本発明は、P D - L 1 の発現を調節できる核酸を標的化するオリゴヌクレオチド又はコンジュゲート、ならびにP D - L 1 の機能に関連する疾患を治療又は予防することに関する。オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、感染性因子に抗する免疫応答の疲弊した疾患を治療することを目的に、特に使用される場合がある。20

【0012】

したがって、第1の態様において、本発明は、P D - L 1 標的核酸に対する相補性が少なくとも90%である長さ10~30ヌクレオチドからなる連續ヌクレオチド配列を含む、オリゴヌクレオチドを提供するものである。オリゴヌクレオチドは、好ましくはギャップマーデザインを有する、アンチセンスオリゴヌクレオチドでありうる。オリゴヌクレオチドは、標的核酸の開裂によってP D - L 1 の発現を阻害できるものであることが、好ましい。開裂は、ヌクレアーゼの補充によって達成されるのが、好ましい。30

【0013】

更なる態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分、例えば、少なくとも1つのN - アセチルガラクトサミン（G a l N A c）部分を含む結合部分に結合されている。結合部分及びオリゴヌクレオチドは、リンカー、特に生体開裂性リンカーを介して、一体的に連結される場合がある。

【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又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ならびに医薬的に許容される希釈剤、担体、塩及び/又は補助剤を含む医薬組成物を提供するものである。40

【0015】

更なる態様において、本発明は、有効量の本発明のオリゴヌクレオチド又は組成物を前記細胞に投与することにより、P D - L 1 を発現する標的細胞におけるP D - L 1 発現量を減少させるインピボ又はインピトロ方法を提供するものである。

【0016】

更なる態様において、本発明は、ウイルスもしくは寄生虫に対する免疫回復に使用するための、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物を提供するものである。

【0017】

更なる態様において、本発明は、薬品として使用するための、オリゴヌクレオチド、オ50

リゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物を提供するものである。

【0018】

更なる態様において、本発明は、治療的もしくは予防的有効量の本発明のオリゴヌクレオチドを、疾患、障害又は機能障害、特にウイルス性肝炎感染もしくは寄生虫感染から選択される疾患に罹患しているか又は罹患しやすい被験者に投与することによって、疾患、障害もしくは機能不全を治療又は予防するために記載の方法を提供するものである。

【0019】

更なる態様において、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又は医薬組成物は、HBV、HCV及びHDVなどのウイルス性肝炎感染；あるいは、マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症及びトリパノソーマ症などの寄生虫感染；あるいは、肝臓癌もしくは肝臓の転移の治療又は予防に使用される。10

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A - B】オリゴヌクレオチドは、波線(A - D)又は「オリゴヌクレオチド」(E - H)又はT₂(I)として表され、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、3価N-アセチルガラクトサミン部分である例示的アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを例証する。化合物A～Dは、PEG3スペーサーに対する分子中のジ-リジンプラグと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。化合物A及びBにおいて、オリゴヌクレオチドは、リンカーなしで、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物C及びDにおいて、オリゴヌクレオチドは、C6リンカーを介して、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物E - Iは、トレブラー分枝分子と、長さ・構造が可変のスペーサーと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。20

【図1C - E】オリゴヌクレオチドは、波線(A - D)又は「オリゴヌクレオチド」(E - H)又はT₂(I)として表され、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、3価N-アセチルガラクトサミン部分である例示的アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを例証する。化合物A～Dは、PEG3スペーサーに対する分子中のジ-リジンプラグと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。化合物A及びBにおいて、オリゴヌクレオチドは、リンカーなしで、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物C及びDにおいて、オリゴヌクレオチドは、C6リンカーを介して、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物E - Iは、トレブラー分枝分子と、長さ・構造が可変のスペーサーと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。30

【図1F - H】オリゴヌクレオチドは、波線(A - D)又は「オリゴヌクレオチド」(E - H)又はT₂(I)として表され、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、3価N-アセチルガラクトサミン部分である例示的アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを例証する。化合物A～Dは、PEG3スペーサーに対する分子中のジ-リジンプラグと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。化合物A及びBにおいて、オリゴヌクレオチドは、リンckerなしで、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物C及びDにおいて、オリゴヌクレオチドは、C6リンckerを介して、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物E - Iは、トレブラー分枝分子と、長さ・構造が可変のスペーサーと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。40

【図1I】オリゴヌクレオチドは、波線(A - D)又は「オリゴヌクレオチド」(E - H)又はT₂(I)として表され、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、3価N-アセチルガラクトサミン部分である例示的アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートを例証する。化合物A～Dは、PEG3スペーサーに対する分子中のジ-リジンプラグと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。化合物A及びBにおいて、オリゴヌクレオチドは、リンckerなしで、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物C及びDにおいて、オリゴヌクレオチドは、C6リンckerを介して、ア50

シアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に直接付着する。化合物E-Iは、トレブラー分子と、長さ・構造が可変のスペーサーと、3つの末端GalNAc炭水化物部分と、を含む。

【図2】実施例2で試験された化合物について、標的核酸上のそれらの位置に関して、EC50(A)及びPD-L1ノックダウンを生理食塩水の%(B)として図示したグラフである。この細胞系において、試験の対象となった化合物はTHP1()及びKarpas(*)である。

【図3】3価GalNAc集落(GN2)の構造式である。GN2は、本発明における結合部分として有用である。波線は、母集団の(例えばC6アミノリンカーに対する、又は直接的にオリゴヌクレオチドに対する)結合部位を例証する。

10

【図4】CMP ID番号766_2の構造式である。

【図5】CMP ID番号767_2の構造式である。

【図6】CMP ID番号768_2の構造式である。

【図7】CMP ID番号769_2の構造式である。

【図8】CMP ID番号770_2の構造式である。

【図9A-C】生理食塩水及び指示されたCMP ID番号で処置した後、ウェスタンプロットで、ポリ(I C)誘導動物由来の肝臓内でのPD-L1タンパク質発現を検出した。各プロットは、同じオリゴヌクレオチド、すなわちプロットAの裸型オリゴヌクレオチドバージョン対GalNAc結合バージョン) CMP ID番号744_1及び755_2、B) CMP ID番号747_1及び758_2、C) CMP ID番号748_1及び759_2、D) CMP ID番号752_1及び763_2及びE) CMP ID番号753_1及び764_2を示す。上位バンドはピンキュリン・ローディング対照であり、下位バンドはPD-L1タンパク質である。各プロット中での第1のレーンは、ポリ(I C)誘導を伴わない生理食塩水処置マウスを示す。これらのマウスは、PD-L1タンパク質をごく少量しか発現しない。

20

【図9D-E】生理食塩水及び指示されたCMP ID番号で処置した後、ウェスタンプロットで、ポリ(I C)誘導動物由来の肝臓内でのPD-L1タンパク質発現を検出した。各プロットは、同じオリゴヌクレオチド、すなわちプロットAの裸型オリゴヌクレオチドバージョン対GalNAc結合バージョン) CMP ID番号744_1及び755_2、B) CMP ID番号747_1及び758_2、C) CMP ID番号748_1及び759_2、D) CMP ID番号752_1及び763_2及びE) CMP ID番号753_1及び764_2を示す。上位バンドはピンキュリン・ローディング対照であり、下位バンドはPD-L1タンパク質である。各プロット中での第1のレーンは、ポリ(I C)誘導を伴わない生理食塩水処置マウスを示す。これらのマウスは、PD-L1タンパク質をごく少量しか発現しない。

30

【図10】ビヒクル(第10群及び第1群)、DNAワクチン(第11群及び第2群)、○抗PD-L1抗体(第12群)、裸型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)+DNAワクチン第7群)又はGalNAc結合型PD-L1 ASO+DNAワクチン(第8群)での処置後の肝臓における単核球の母集団、群毎の個々の動物を表すと共に、群毎の平均を垂直線で示してある(表18を参照のこと)。DNAワクチン群と3つの処置群との間の統計的有意性が評価されており、存在する場合、群間に*で示されている(*=P<0.05、***=P<0.001及び****=P<0.0001)。A)は、処置後の肝臓におけるT細胞の数を表す。B)はCD4+T細胞の画分を表す。C)は、CD8+T細胞の画分を表す。

40

【図11】ビヒクル(第10群及び第1群)、DNAワクチン(第11群及び第2群)、○抗PD-L1抗体(第12群)、裸型PD-L1 ASO+DNAワクチン(第7群)又はGalNAc結合型PD-L1 ASO+DNAワクチン(第8群)を用いての処置後の肝臓におけるPD-L1陽性細胞の調節、群毎の個々の動物を表すと共に、群毎の平均を垂直線で示してある(表19を参照のこと)。DNAワクチン群と3つの処置群との間の統計的有意性が評価されており、存在する場合、群間に

50

で示されている (= P < 0 . 0 5、及び**** = P < 0 . 0 0 0 1)。 A) は、処置後の肝臓において P D - L 1 を発現する C D 8 + T 細胞のパーセンテージを表す。 B) は、処置後の肝臓内で P D - L 1 を発現する C D 4 + T 細胞のパーセンテージを表す。 C) は、処置後の肝臓内で P D - L 1 を発現する B 細胞のパーセンテージを表す。

【図 12】 ビヒクル(第10群及び第1群)、DNAワクチン(第11群及び第2群)、○抗P D - L 1抗体(第12群)、裸型P D - L 1 A S O + D N Aワクチン第7群)又はG a l N A c結合型P D - L 1 A S O + DNAワクチン(第8群)を用いての処置後の肝臓内でのH B V抗原特異的C D 8 + サイトカイン分泌細胞、群毎の個々の動物を表すと共に、群毎の平均を垂直線で示してある(表20を参照のこと)。DNAワクチン群と3つの処置群との間の統計的有意性が評価されており、存在する場合、群間に*で示されている (* = P < 0 . 0 5)。A) は、処置後のH B VプレS 2 + S 抗原に対して特異的な肝臓におけるI F N - 分泌C D 8 + T 細胞のパーセンテージを表す。B) は処置後のH B Vコア抗原に対して特異的な肝臓におけるI F N - 分泌C D 8 + T 細胞のパーセンテージを表す。C) は処置後のH B VプレS 2 + S 抗原に対して特異的な肝臓におけるI F N - 及びT N F - 分泌C D 8 + T 細胞のパーセンテージを表す。

【図 13】 G a l N A c結合型P D - L 1アンチセンスC M P番号：7 5 9 _ 2 ()で処置した後のA A V / H B VマウスにおけるH B V - D N A、H B s 抗原及びH B e 抗原と、ビヒクル()との比較。縦線は処置の終了を示す。

【0021】

定義

オリゴヌクレオチド

本明細書において「オリゴヌクレオチド」という用語は概ね、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遍く理解されているものとして定義されている。そのような共有結合したヌクレオシドはまた、核酸分子又はオリゴマーでありうる。オリゴヌクレオチドは通例、実験室で(固相化学合成により)作製され、続いて精製される。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合、共有結合したヌクレオチドもしくはヌクレオシドの核酸塩基部分もしくはその修飾物の配列又は順序について説明する。本発明のオリゴヌクレオチドは人造、且つ化学的に合成されるものであり、精製又は単離されるのが一般的である。本発明のオリゴヌクレオチドは、1以上の修飾ヌクレオシド又はヌクレオチドを含む場合がある。

【0022】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

本明細書において、「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できるオリゴヌクレオチドとして定義される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本質的に二本鎖ではなく、したがってs i R N Aではない。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖であるが、好みしい。

【0023】

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、標的核酸に対して相補的なオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書中では「連続した核酸塩基配列」及び「オリゴヌクレオチド・モチーフ配列」という用語と同義に使用されている。幾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成している。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは隣接するヌクレオチド配列を含み、任意で、更なるヌクレオチド(例えば、連続ヌクレオチド配列に官能基を付着させるために使用可能なヌクレオチドリンカー領域)を含む場合がある。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る場合もあれば、あるいは相補的でない場合もある。

【0024】

ヌクレオチド

10

20

30

40

50

ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの構築ブロックであり、本発明の目的のためには、天然ヌクレオチド及び非天然ヌクレオチドの両方を含む。自然界において、DNA及びRNAヌクレオチドのようなヌクレオチドは、リボース糖部分、核酸塩基部分、及び1つ以上のリン酸基（ヌクレオシドには存在しない）を含む。ヌクレオシド及びヌクレオチドはまた、同じ意味で「単位」又は「モノマー」と呼ばれる場合もある。

【0025】

修飾ヌクレオシド

本明細書において「修飾ヌクレオシド」又は「ヌクレオシド修飾」という用語は、糖部分又は（ヌクレオ）塩基部分の1つ以上の修飾を導入することによって、同等のDNAもしくはRNAヌクレオシドと比べ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、修飾糖部分を含む。修飾ヌクレオシドという用語は、本明細書において、用語「ヌクレオシド類似体」又は修飾「単位」又は修飾「モノマー」と同義に使用することもできる。10

【0026】

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、ホスホジエステル（PO）結合以外の結合として当業者に遍く理解されており、2つのヌクレオシドを一体的に共有結合させる結合として定義されている。修飾ヌクレオシド間結合を有するヌクレオチドはまた、「修飾ヌクレオチド」と呼ばれる。幾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加させる。天然起源のオリゴヌクレオチドの場合、ヌクレオシド間結合には、隣接するヌクレオシド同士の間にホスホジエステル結合を生じるリン酸基が含まれる。修飾ヌクレオシド間結合は、インビボでの使用のためにオリゴヌクレオチドを安定化するのに特に有用であり、本発明のオリゴヌクレオチド中のDNA又はRNAヌクレオシドの領域における、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内、ならびに修飾ヌクレオシドの領域内のヌクレアーゼを開裂から防護する役目を果たしうる。20

【0027】

実施形態において、オリゴヌクレオチドは、天然リン酸ジエステルから、例えばヌクレアーゼ攻撃に対する耐性が増強された結合へと修飾された1つ以上のヌクレオシド間結合を含む。ヌクレアーゼ耐性の定量方法には、オリゴヌクレオチドを血清中でインキュベートする方法、あるい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））を使用する方法を挙げることができ、これらの方法は両方とも当該技術分野において周知である。オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増強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呼ばれる。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中のヌクレオシド間結合の少なくとも50%（例えば、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中のヌクレオシド間結合の少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも80%、又は例えば少なくとも90%）が修飾される。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中の全てのヌクレオシド間結合が修飾される。幾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に連結するヌクレオシド（例えば結合）は、ホスホジエステルでありうることが、認識されるであろう。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中の全ての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である。3040

【0028】

修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、ジホスホロチオエート及びボラノホスフェートを含む群から選択できる。幾つかの実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、本発明のオリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオエート、ジホスホロチオエート又はボラノホスフェートによるRNアーゼHの補充と適合する。

【0029】

50

幾つかの実施形態において、ヌクレオシド間結合は、硫黄 (S) (例えば、ホスホチオエートヌクレオシド間結合を含む。

【0030】

ホスホチオエートヌクレオシド間結合は、ヌクレアーゼ耐性、有益な薬物動態及び製造の容易さのために特に有用である。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中のヌクレオシド間結合の少なくとも50%はホスホチオエート(例えば、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中のヌクレオシド間結合の少なくとも60%、例えば少なくとも70%、例えば少なくとも80%、又は例えば少なくとも90%はホスホチオエート)である。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド配列中の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホチオエートである。10

【0031】

幾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、メチルホスホネート、MMI、アミド-3、ホルムアセタール又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。

【0032】

更なるヌクレオシド間結合は国際公開第2009/124238号パンフレットに開示されている(本明細書において参照により援用されている)。或る実施形態において、ヌクレオシド間結合は、国際公開第2007/031091号パンフレットに開示されているリンカーから選択される(本明細書において参照により援用されている)。特に、ヌクレオシド間結合は、-O-P(O)₂-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)₂-O-、-S-P(O)₂-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)₂-O-、-O-P(O)₂-S-、-O-P(O,S)-S-、-S-P(O)₂-S-、-O-PO(R^H)-O-、O-PO(OCH₃)-O-、-O-PO(NR^H)-O-、-O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-、-O-PO(BH₃)-O-、-O-PO(NHR^H)-O-、-O-P(O)₂-NR^H-、-NR^H-P(O)₂-O-、-NR^H-CO-O-、-NR^H-CO-NR^H-から選択可能であり、且つ/あるいはヌクレオシド間リンカーハーは、-O-CO-O-、-O-CO-NR^H-、-NR^H-CO-CH₂-、-O-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-、-CO-NR^H-CH₂-、-CH₂-NR^H-CO-、-O-CH₂-CH₂-S-、-S-CH₂-CH₂-O-、-S-CH₂-CH₂-S-、-CH₂-SO₂-CH₂-、-CH₂-CO-NR^H-、-O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-、-CH₂-NCH₃-O-CH₂- (式中、R^Hが水素及びC1-4-アルキルから選択される)からなる群から選択可能である。2030

【0033】

ホスホチオエート結合のようなヌクレアーゼ耐性結合は、標的核酸との二本鎖形成の際にヌクレアーゼを補充する能力を有するオリゴヌクレオチド領域、例えばギャップマー用の領域G、又はヘッドマー及びテールマーの非修飾ヌクレオシド領域において特に有用であるが、ホスホチオエート結合はまた、非ヌクレアーゼ補充領域及び/もしくはギャップマーのための領域F及びF'のような親和性増強領域において、又は頭部及び尾部の修飾されたヌクレオシド領域において有用であると思われる。40

【0034】

しかしながら、デザイン領域の各々は、ホスホチオエート以外のヌクレオシド間結合、例えばロッド核酸(LNA)などの修飾ヌクレオシドがヌクレアーゼ分解との結合を保護する領域において、ホスホジエステル結合などのヌクレオシド結合を含む場合がある。特に修飾されたヌクレオシド単位の間に(又は、通常は非ヌクレアーゼの補充領域に)、1つもしくは2つの結合のような、ホスホジエステル結合を含めることにより、オリゴヌクレオチドのバイオアベイラビリティ及び/又は生体分布を修飾することができる。これについては、本明細書において参照により援用されている国際公開第2008/113832号パンフレットを参照のこと。

【0035】

50

或る実施形態において、オリゴヌクレオチド内の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合及び／又はボラノホスフェート結合である。オリゴヌクレオチド内の全てのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であるのが、好ましい。

【0036】

核酸塩基

核酸塩基という用語は、核酸ハイブリダイゼーションにおいて水素結合を形成するヌクレオシド及びヌクレオチド中に存在するプリン（例えば、アデニン及びグアニン）部分ならびにピリミジン（例えば、ウラシル、チミン及びシトシン）部分を包含される。本発明の文脈において、核酸塩基という用語はまた、天然起源の核酸塩基とは異なるが、核酸ハイブリダイゼーションの間に機能する修飾された核酸塩基を包含する。この文脈において、「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチン及びヒポキサンチンなどの天然起源の核酸塩基、ならびに天然に存在しない変異体の両方を指す。そのような変異体は、例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055、及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1. 4. 1に記載されている。10

【0037】

幾つかの実施形態において、核酸塩基部分は、プリン又はピリミジンを、修飾プリン又はピリミジン（例えばイソシトシン、プソイドイソシトシン、5 - メチルシトシン、5 - チオゾロ - シトシン、5 - プロピニル - シトシン、5 - プロピニル - ウラシル、5 - プロモウラシル 5 - チアゾロ - ウラシル、2 - チオ - ウラシル、2' - チオ - チミン、イノシン、ジアミノプリン、6 - アミノプリン、2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、及び 2 - クロロ - 6 - アミノプリンのような置換プリン又は置換ピリミジン）に変更することによって修飾される。20

【0038】

核酸塩基部分は、それぞれの対応する核酸塩基の文字コード（例えば、A、T、G、C 又はU）で表される場合があり、各英字は、任意で、同等の機能を有する修飾塩基を含んでいてもよい。例えば、例示的オリゴヌクレオチドにおいて、核酸塩基部分は、A、T、G、C、及び 5 - メチルシトシンから選択される。任意で、LNAギャップマーとして、5 - メチルシトシン LNAヌクレオシドを使用できる。30

【0039】

修飾オリゴヌクレオチド

修飾オリゴヌクレオチドという用語は、1つ以上の糖修飾ヌクレオシド及び／又は修飾ヌクレオシド間結合を含む、オリゴヌクレオチドを表す。キメラ「オリゴヌクレオチド」という用語は、修飾ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドについて説明するため文献中に使用されている用語である。

【0040】

相補性

「相補性」という用語は、ヌクレオシド／ヌクレオチドのワトソン - クリック塩基対形成能力を説明するものである。ワトソン - クリック塩基対は、グアニン (G) - シトシン (C) 及びアデニン (A) - チミン (T) / ウラシル (U) である。オリゴヌクレオチドは、修飾された核酸塩基を有するヌクレオシドを含みうる。例えば、5 - メチルシトシンは多くの場合、シトシンの代わりに使用されるので、相補性という用語には、非修飾核酸塩基と修飾核酸塩基との間のワトソン - クリック塩基対形成が含まれることが理解される（例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol 45 page 2055 及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1. 4. 1 を参照のこと）。40

【0041】

本明細書において「%相補的である」という用語は、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中のヌクレオチドの割合（パーセントで表された数）が、所与の位置で別個の核酸分子（例えば、標的核酸）の所与の位置で連続ヌクレオチド50

配列に対して相補的である（すなわちこの連続ヌクレオチド配列と共にワトソン - クリック塩基対を形成する）ことを指す。パーセンテージは、（標的配列 5' - 3'、及び 3' - 5' からのオリゴヌクレオチド配列と整列した場合）2つの配列間に対を形成するアライメントされた塩基の数を数えることによって計算し、これをオリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数で除算して、100を乗算した値である。そのような比較において、アライメントしない（塩基対を形成する）核酸塩基 / ヌクレオチドは、ミスマッチと呼ばれる。

【0042】

「完全に相補的である」という用語は、100%の相補性を指す。

【0043】

標的核酸（配列番号：772に対して完全に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号：5）の例を、以下に示す。

5' gcagtagagccaaat3'（配列番号：772）
3' cgtcatctcggttaat5'（配列番号：5）

【0044】

同一性

本明細書において「同一性」という用語は、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中のヌクレオチドの割合（パーセントで表された数）が、所与の位置で別個の核酸分子（例えば、標的核酸）の所与の位置で連続ヌクレオチド配列に対して同一であること（すなわち、相補的ヌクレオシドと共にワトソン - クリック塩基対を形成する能力）を指す。パーセンテージは、ギャップを含む2つの配列間で同一なアライメントされた塩基の数を数えることによって計算し、これをオリゴヌクレオチド中のヌクレオチドの総数で除算して、100を乗算した値である。同一性 % = (一致 × 100) / アライメントされた領域の長さ（ギャップあり）

【0045】

ハイブリダイゼーション

本明細書において「ハイブリダイズ」又は「ハイブリダイズする」という用語は、反対側の鎖上の塩基対間に水素結合を形成し、それによって二本鎖を形成する2つの核酸鎖（例えば、オリゴヌクレオチド及び標的核酸）として理解される。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り、多くの場合、オリゴヌクレオチドの半分が標的核酸と二本鎖を成す温度として定義される融解温度 (T_m) に関連して説明される。生理学的条件 T_m は厳密に親和性に比例しない (Mergny 及び Lacroix, 2003, Oligonucleotides 13: 515-537)。標準状態のギブス自由エネルギー G° は、結合親和性のより正確な表現であり、 $G^\circ = -R T \ln(K_d)$ (式中、R は気体定数であり、T は絶対温度である) による反応の解離定数 (K_d) に関連する。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性が極めて低い G° は、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の強いハイブリダイゼーションを反映する。 G° は、水の濃度が 1 M であり、pH が 7 であり、温度が 37 である反応に関連するエネルギーである。標的核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは自発的反応であり、自発的な反応が誘発されるように G° はゼロ未満とされる。 G° は、例えば Hansen et al., 1965, Chem. Comm. 36-38 及び Holdgate et al., 2005, Drug Discov Today に記載されている等温滴定熱量測定法 (ITC) で実験的に測定できる。当業者であれば、商業的機器が G° の測定に利用可能であることを知るであろう。 G° は、SantaLucia, 1998, Proc Natl Acad Sci USA. 95:1460-1465 に記載されている最近傍点を使用して、Sugimoto et al., 1995, Biochemistry 34: 11211-11216 及び McTigue et al., 2004, Biochemistry 43: 5388-5405 に記載されている適切に導出された熱力学的パラメータを使用して、数値的に推定できる。その意図され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有するために、本発明のオリゴヌクレオチドは、10 ~ 30 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドに対して -10 kcal 未満の推定 G° 値で標的核酸にハイブリダイズする。幾つかの実施形態において、ハイブリダイゼーションの程度又は強度は、標準状態のギブス自由エネル

10

20

30

40

50

ギー G° によって測定される。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の場合に、推定 G° 値が、-10 kcal 未満の範囲（例えば、-15 kcal 未満、-20 kcal 未満、例えば -25 kcal 未満）の標的核酸にハイブリダイズする。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、-10 ~ -60 kcal、例えば -12 ~ -40、例えば -15 ~ -30 kcal 又は -16 ~ -27 kcal、例えば -18 ~ -25 kcal の推定 G° 値を有する標的核酸にハイブリダイズする。

【0046】

標的核酸

本発明によれば、標的核酸は、哺乳動物 P D - L 1 をコードする核酸であり、例えば、遺伝子、RNA、mRNA、及びプレ mRNA、成熟 mRNA 又は cDNA 配列である。したがって、標的是、P D - L 1 標的核酸と呼ばれる場合がある。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば、哺乳動物 P D - L 1 の標的エキソン領域であってもよいし、又は例えば、P D - L 1 プレ mRNA の標的イントロン領域であってもよい（表 1 を参照のこと）。

【0047】

【表 1】

表 1：ヒト P D - L 1 エキソン及びイントロン

ヒト P D - L 1 プレ mRNA (配列番号 1) 内のエキソン領域			ヒト P D - L 1 プレ mRNA (配列番号 1) 内のイントロン領域		
ID	開始	終了	ID	開始	終了
e1	1	94	i1	95	5597
e2	5598	5663	i2	5664	6576
e3	6577	6918	i3	6919	12331
e4	12332	12736	i4	12737	14996
e5	14997	15410	i5	15411	16267
e6	16268	16327	i6	16328	17337
e7	17338	20064			

10

20

30

【0048】

好適には、標的核酸は、P D - L 1 タンパク質、特に哺乳類 P D - L 1、例えば、ヒト P D - L 1 をコードする（例えば、ヒト、サル及びマウス P D - L 1 の mRNA 及びプレ mRNA 配列について解説した表 2 及び表 3 を、参照のこと）。本発明の文脈において、プレ mRNA はまた、タンパク質をコードする核酸と考えられる。

【0049】

幾つかの実施形態において、標的核酸は、配列番号：1、2 及び 3 又はその天然起源の変異体（例えば、哺乳類 P D - L 1 タンパク質をコードする配列）からなる群から選択される。

40

【0050】

研究又は診断において本発明のオリゴヌクレオチドを使用する場合、標的核酸は、DNA もしくは RNA 由来の cDNA 又は合成核酸であってもよい。

【0051】

インビオ又はインビトロ用途では、本発明のオリゴヌクレオチドは典型的に、P D - L 1 標的核酸を発現する細胞における P D - L 1 標的核酸の発現を阻害しうる。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、任意で 1 つ又は 2 つのミスマッチを除く、且つ任意で、オリゴヌクレオチドを任意の官能基（例えばコンジュゲート）、又は他の非相補的末端ヌクレオチド（例えば、領域 D' 又は D''）に連結できる、ヌクレオチドベースのリンカー領域を除く、オリゴヌクレオチドの長さにわたって測定した場合、P

50

D - L 1 標的核酸に対して相補的である。幾つかの実施形態において、標的核酸は、RNA又はDNA（例えば、成熟mRNA又はプレmRNAのようなメッセンジャーRNA）でありうる。幾つかの実施形態において、標的核酸は、ヒトPD-L1などの哺乳動物PD-L1タンパク質をコードするRNA又はDNAであり、この哺乳動物PD-L1タンパク質は、ヒトPD-L1プレmRNA配列、例えば配列番号1として開示されるもの、又はNCBIリファレンス番号NM_014143を有するヒトmRNA配列である。例示的な標的核酸に関する詳細情報は、表2及び表3に示してある。

【0052】

【表2】

10

表2：種間のPD-L1のゲノム及びアセンブリ情報

種	Chr数	鎖	ゲノム座標 開始	終了	アセンブリ	NCBIリファレンス配列* mRNAの受託番号
ヒト	9	fwd	5450503	5470566	GRCh38:CM000671.2	NM_014143
カニクイザル (Cynomolgus monkey)	15		73560846	73581371	GCF_000364345.1	XM_005581779
マウス	19	fwd	29367455	29388095	GRCm38:CM001012.2	NM_021893

fwd=フォワード鎖。「ゲノム座標」にはプレmRNA配列（ゲノム配列）が記載してあり、「NCBIリファレンス」にはmRNA配列（cDNA配列）が記載してある。

20

* National Center for Biotechnology Informationの参照配列データベースは、ゲノム、転写物、及びタンパク質を含む包括的、統合型、非冗長、豊富な注釈付き参照配列のセットであり、www.ncbi.nlm.nih.gov/refseqでホスティングされている。

【0053】

【表3-1】

表3：種間でのPD-L1の配列詳細。

種	RNA型	長さ(nt)	配列番号
ヒト	プレmRNA	20064	1
カニクイザル(Monkey Cyno)	プレmRNA GCFレフ	20261	2
カニクイザル	プレmRNA内部	20340	3
マウス	プレmRNA	20641	4

【0054】

標的配列

本明細書において「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。幾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対して相補的な、標的核酸上の領域からなる。幾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、本発明の幾つかのオリゴヌクレオチドによって標的化できる標的核酸の好ましい領域を表しうる。

40

【0055】

標的配列は、標的核酸のサブ配列でありうる。

【0056】

幾つかの実施形態において、サブ配列はa1～a149からなる群から選択される配列である（表4を参照のこと）。幾つかの実施形態において、サブ配列は、ヒトPD-L1のmRNAエキソンからなる群から選択される配列、例えば、e1、e2、e3、e4、

50

e 5、e 6 及び e 7 からなる群から選択される P D - L 1 ヒト m R N A エキソンである（上の表 1 を参照のこと）。

【 0 0 5 7 】

幾つかの実施形態において、サブ配列は、ヒト P D - L 1 の m R N A イントロンからなる群から選択される配列、例えば、i 1、i 2、i 3、i 4、i 5 及び i 6 からなる群から選択される P D - L 1 ヒト m R N A イントロンである（上の表 1 を参照のこと）。

【 0 0 5 8 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、標的核酸に対して相補的であるか又はこの標的核酸にハイブリダイズする、連続ヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載の標的配列のような、標的核酸のサブ配列）を含む。 10

【 0 0 5 9 】

オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子中に存在する標的配列に対して相補的であるか又はその標的配列にハイブリダイズする、少なくとも 8 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含む。連続ヌクレオチド配列（及び、ひいては標的配列）は、少なくとも 8 個の連続したヌクレオチド、例えば、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 又は 30 連続ヌクレオチド（例えば、12～25、14～18 連続ヌクレオチド等）からなる。

【 0 0 6 0 】

標的細胞

本明細書において「標的細胞」という用語は、標的核酸を発現する細胞を指す。幾つかの実施形態において、標的細胞はインビポ又はインビトロでありうる。幾つかの実施形態において、標的細胞は、げっ歯類細胞（例えば、マウス細胞もしくはラット細胞）、又は靈長類細胞（例えば、サル細胞もしくはヒト細胞）のような哺乳動物細胞である。 20

【 0 0 6 1 】

好みしい実施形態において、標的細胞は、P D - L 1 m R N A、例えば P D - L 1 プレ m R N A 又は P D - L 1 成熟 m R N A を発現する。P D - L 1 の m R N A のポリ A 尾部は、典型的に、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化のために無視される。

【 0 0 6 2 】

天然起源の変異体

「天然起源の変異体」という用語は、P D - L 1 遺伝子の変異体、又は標的核酸と同じ遺伝子座に由来する転写物であって、但し、同じアミノ酸をコードする複数のコドンを引き起こす遺伝コードの縮重、又は代替スプライシングに起因するプレ m R N A の存在、又はポリモルフィズムの存在（例えば、単一ヌクレオチドポリモルフィズム、及び対立遺伝子変異体）が原因で、異なる可能性があるものを指す。したがって、本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドに対する充分な相補的配列の存在に基づいて、標的核酸及びその天然起源の変異体を標的化できる。 30

【 0 0 6 3 】

幾つかの実施形態において、天然起源の変異体は、哺乳類 P D - L 1 標的核酸（例えば、配列番号 1、2 及び 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 % 又は少なくとも 99 % の相同性を有する。 40

多数の単一ヌクレオチド多型が P D - L 1 遺伝子において公知であり、例えば、下の表に開示されている（ヒトプレ m R N A 開始 / 参照配列は、配列番号 2 である）。

【 0 0 6 4 】

【表3-2】

変異体名	変異体対立遺伝子	劣性対立遺伝子	劣性対立遺伝子頻度	配列番号1上の開始位置
rs73397192	G/A	A	0,10	2591
rs12342381	A/G	G	0,12	308
rs16923173	G/A	A	0,13	14760
rs2890658	C/A	A	0,16	14628
rs2890657	G/C	C	0,21	2058
rs3780395	A/G	A	0,21	14050
rs147367592	AG/-	-	0,21	13425
rs7023227	T/C	T	0,22	6048
rs2297137	G/A	A	0,23	15230
rs1329946	G/A	A	0,23	2910
rs5896124	-/G	G	0,23	2420
rs61061063	T/C	C	0,23	11709
rs1411263	T/C	C	0,23	8601
rs59906468	A/G	G	0,23	15583
rs6476976	T/C	T	0,24	21012
rs35744625	C/A	A	0,24	3557
rs17804441	T/C	C	0,24	7231
rs148602745	C/T	T	0,25	22548
rs4742099	G/A	A	0,25	20311
rs10815228	T/C	C	0,25	21877
rs58817806	A/G	G	0,26	20769
rs822342	T/C	T	0,27	3471
rs10481593	G/A	A	0,27	7593
rs822339	A/G	A	0,28	2670
rs860290	A/C	A	0,28	2696
rs822340	A/G	A	0,28	2758
rs822341	T/C	T	0,28	2894
rs12002985	C/G	C	0,28	6085
rs822338	C/T	C	0,28	1055
rs866066	C/T	T	0,28	451
rs6651524	A/T	T	0,28	8073
rs6415794	A/T	A	0,28	8200
rs4143815	G/C	C	0,28	17755
rs111423622	G/A	A	0,28	24096
rs6651525	C/A	A	0,29	8345
rs4742098	A/G	G	0,29	19995
rs10975123	C/T	T	0,30	10877
rs2282055	T/G	G	0,30	5230
rs4742100	A/C	C	0,30	20452
rs60520638	-/TC	TC	0,30	9502
rs17742278	T/C	C	0,30	6021
rs7048841	T/C	T	0,30	10299

【0065】

【表3-3】

変異体名	変異体対立遺伝子	劣性対立遺伝子	劣性対立遺伝子頻度	配列番号1上の開始位置
rs10815229	T/G	G	0.31	22143
rs10122089	C/T	C	0.32	13278
rs1970000	C/A	C	0.32	14534
rs112071324	AGAGAG/-	AGAGAG	0.33	16701
rs2297136	G/A	G	0.33	17453
rs10815226	A/T	T	0.33	9203
rs10123377	A/G	A	0.36	10892
rs10123444	A/G	A	0.36	11139
rs7042084	G/T	G	0.36	7533
rs10114060	G/A	A	0.36	11227
rs7028894	G/A	G	0.36	10408
rs4742097	C/T	C	0.37	5130
rs1536926	G/T	G	0.37	13486
rs1411262	C/T	T	0.39	8917
rs7041009	G/A	A	0.45	12741

10

20

【0066】

発現の調節

本明細書において「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P D - L 1の量と比較して、P D - L 1の量を変化させるオリゴヌクレオチドの能力の包括的用語として理解すべきである。あるいは、発現の調節は、対照実験を参照して定量できる。対照は、非標的オリゴヌクレオチド（モック）で処理した生理食塩水組成物、個体もしくは標的細胞で処置した個体又は標的細胞であることが概ね理解されるが、また、ケア基準で処置される個体である場合もある。

【0067】

1つのタイプの調節は、例えばm R N Aの分解又は転写の妨害によって、オリゴヌクレオチドがP D - L 1の発現を阻害、下方制御、低減、抑制、除去、中断、ブロック、防止、軽減、低下、回避又は停止する能力である。別のタイプの調節は、オリゴヌクレオチドの、P D - L 1の発現を回復、増加又は増強する能力である。スプライス部位の修復もしくはマイクロR N A抑制などの阻害機構のスプライシング、除去又は遮断の防止によって行うことができる。

30

【0068】

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、オリゴヌクレオチド内に取り込まれた場合に、その相補的標的にに対するオリゴヌクレオチドの、例えば融解温度（T^m）で測定された親和性を増強するように修飾されたヌクレオチドである。本発明の高親和性修飾ヌクレオシドは、修飾ヌクレオシド当たり好ましくは+0.5～+1.2、より好ましくは+1.5～+1.0、最も好ましくは+3～+8の間の融解温度の上昇をもたらす。当該技術分野において多数の高親和性修飾ヌクレオシドが公知であり、例えば、多数の2'置換ヌクレオシド、ならびにロックド核酸（L N A）が含まれる（例えば、Freier & Altman；Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann；Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213を参照のこと）。

40

【0069】

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D N A及びR N Aに見出されるリボース糖部分と比較して、糖部分の修飾を有する1つ以上のヌクレオシドを含む場合があ

50

る。

【0070】

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

【0071】

そのような修飾には、例えば、典型的にはリボース環（LNA）上のC2炭素とC4炭素との間のピラジカル架橋を有するヘキソース環（HNA）又は二環式環、又は典型的にはC2炭素とC3炭素との間の結合を欠く非連結リボース環（例えば、UNA）の置換によって、リボース環構造が修飾されたものが含まれる。他の糖修飾ヌクレオシドには、例えば、ビシクロヘキソース核酸（国際公開第2011/017521号パンフレット）又は三環核酸（国際公開第2013/154798号パンフレット）が含まれる。修飾ヌクレオシドはまた、例えばペプチド核酸（PNA）又はモルホリノ核酸の場合、糖部分が非糖部分で置換されたヌクレオシドも含む。
10

【0072】

糖修飾にはまた、リボース環上の置換基を、水素以外の基、又はDNA及びRNAヌクレオシド内に天然に存在する2'-OH基に変更することによって施される修飾も含まれる。置換基は、例えば、2'、3'、4'又は5'の位置に導入することができる。修飾糖部分を有するヌクレオシドにはまた、2'修飾ヌクレオシド、例えば2'置換ヌクレオシドも含まれる。実際、2'置換ヌクレオシドの開発にかなりの焦点が当てられてきており、2'置換ヌクレオシドの多くは、オリゴヌクレオチドに取り込まれたときに、ヌクレオシド耐性の増強及び親和性の増強などの有益な特性を呈することが見出されている。
20

【0073】

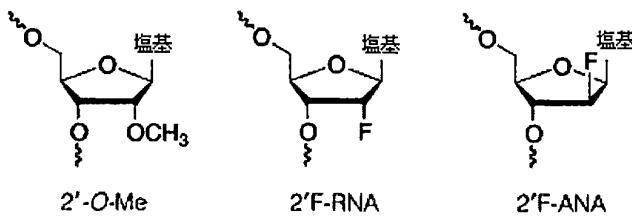
2'修飾ヌクレオシド。

【0074】

2'糖修飾ヌクレオシドは、2'位（2'置換ヌクレオシド）にHもしくは-OH以外の置換基を有するか、又は2'結合されたピラジドを含み、2'置換ヌクレオシド及びLNA（2'～4'ピラジカル架橋）ヌクレオシドを含む。例えば、2'修飾糖は、結合親和性の増大、及び／又はオリゴヌクレオチドに対するヌクレアーゼ耐性の増加をもたらし得る。2'置換修飾ヌクレオシドの例は、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA（MOE）、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、及び2'-F-ANAヌクレオシドである。更なる例については、例えば、Freier & Altmann；Nucl.Acid Res., 1997, 25, 4429-4443及びUhlmann；Curr.Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213、ならびにDeleavey及びDamha, Chemistry and Biology 2012, 19, 937を参照のこと。以下は、幾つかの2'置換修飾ヌクレオシドの図である。
30

【0075】

【化1】



【0076】

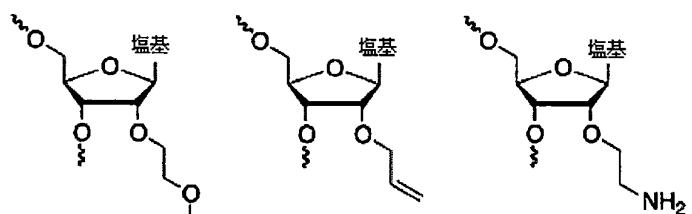
10

20

30

40

【化2】



2'-O-MOE

2'-O-アリル

2'-O-エチルアミン

10

【0077】

ロックド核酸ヌクレオシド (LNA)。

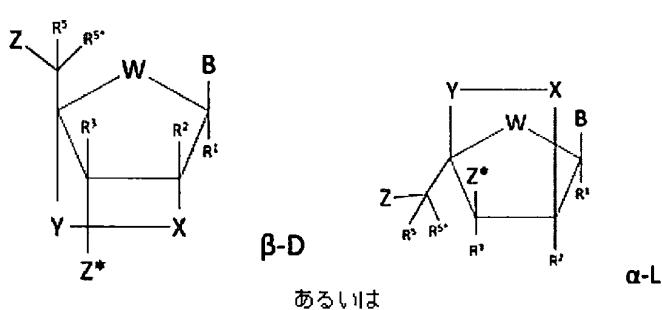
LNAヌクレオシドは、C_{2'}とC_{4'}との間にリンカー基（ビラジカル又はブリッジと呼ばれる）を含む、修飾ヌクレオシドである。これらのヌクレオシドは、文献中では、架橋核酸又は二環式核酸（BNA）とも呼ばれる。

幾つかの実施形態において、本発明のオリゴマーの修飾ヌクレオシド又はLNAヌクレオシドは、式I又は式IIの一般構造を有する。

【0078】

【化3】

20



あるいは

式I

式II

30

α-L

【0079】

式中、Wは-O-、-S-、-N(R^a)-、-C(R^aR^b)-、例えば、幾つかの実施形態では-O-から選択され、Bは、核酸塩基又は修飾核酸塩基部分を表し、Zは、隣接ヌクレオシド、又は5'末端基へのヌクレオシド間結合を表し、Z*は、隣接するヌクレオシド、又は3'末端基へのヌクレオシド間結合を表し、Xは、-C(R^aR^b)-、-C(R^a)=C(R^b)-、-C(R^a)=N-、-O-、-Si(R^a)₂-、-S-、-SO₂-、-N(R^a)-及び>C=Zからなるリストから選択される基を表す。

幾つかの実施形態において、Xは、-O-、-S-、NH-、NR^aR^b、-CH₂-、CR^aR^b、-C(=CH₂)-及び-C(=CR^aR^b)-からなる群から選択される。

40

幾つかの実施形態において、Xは、-O-である。

Yは、-C(R^aR^b)-、-C(R^a)=C(R^b)-、-C(R^a)=N-、-O-、-Si(R^a)₂-、-S-、-SO₂-、-N(R^a)-及び>C=Zからなる群から選択される基を表す。

幾つかの実施形態において、Yは、-CH₂-、-C(R^aR^b)-、-CH₂CH₂-、-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-C(R^aR^b)-、-C(R^a)=C(R^b)-及び-C(R^a)=N-からなる群から選択される。

幾つかの実施形態において、Yは、-CH₂-、-CHR^a-、-CH₂CH₃-、CR^aR^b-

50

又は - X - Y - からなる群から選択され、共に 2 値リンカー基（基質とも呼ばれる）を表し、 - C (R^aR^b) - 、 - C (R^a) = C (R^b) - 、 - C (R^a) = N - 、 - O - 、 - S i (R^a)₂ - 、 - S - 、 - SO₂ - 、 - N (R^a) - 及び > C = Z からなる群から選択される 1、2、3 又は 4 基 / 原子からなる 2 値リンカー基を表す。

幾つかの実施形態において、 - X - Y - は、 - X - CH₂ - 、 - X - CR^aR^b - 、 - X - CHR^a - 、 - X - C (HCH₃) - 、 - O - Y - 、 - O - CH₂ - 、 - S - CH₂ - 、 - NH - CH₂ - 、 - O - CHCH₃ - 、 - CH₂ - O - CH₂ - 、 - O - CH (CH₃CH₃) - 、 - O - CH₂ - CH₂ - 、 OCH₂ - CH₂ - CH₂ - 、 - O - CH₂OCH₂ - 、 - O - NC H₂ - 、 - C (= CH₂) - CH₂ - 、 - NR^a - CH₂ - 、 N - O - CH₂ - 、 - S - CR^aR^b - 及び - S - CHR^a - からなる群から選択されるピラジカルを表す。 10

【 0080 】

幾つかの実施形態において、 - X - Y - は - O - CH₂ - 又は - O - CH (CH₃) - を表し、式中、Z は - O - 、 - S - 、及び - N (R^a) - から選択され、且つ R^a は R^b を表す場合、各々が独立に、水素、任意で置換された C₁₋₆ - アルキル、任意で置換された C₂₋₆ - アルケニル、任意で置換された C₂₋₆ - アルキニル、ヒドロキシ、任意で置換された C₁₋₆ - アルコキシ、C₂₋₆ - アルケニルオキシ、C₂₋₆ - アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₆ - アルコキシカルボニル、C₁₋₆ - アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ - カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) アミノ、カルバモイル；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) - アミノ - カルボニル、アミノ - C₁₋₆ - アルキル - アミノカルボニル；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) アミノ - C₁₋₆ - アルキル - アミノカルボニル、C₁₋₆ - アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆ - アルカノイルオキシ、スルホノ (sulphon o) 、C₁₋₆ - アルキルスルホノ (sulphono) オキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆ - アルキルチオ、ハロゲンから選択され、アリール及びヘテロアリールは任意で置換されていてもよく、2 つのジェミナル置換基 R^a 及び R^b は一緒になって、置換されていてもよいメチレン (= CH₂) を示すことができ、ここで、全てのキラル中心について、不斉基は R 又は S 配向のいずれかに見出される。

R¹、R²、R³、R⁵ 及び R^{5*} は独立に、水素、任意で置換された C₁₋₆ - アルキル、任意に置換された C₂₋₆ - アルケニル、任意で置換された C₂₋₆ - アルキニル、ヒドロキシ、C₁₋₆ - アルコキシ、C₂₋₆ - アルケニルオキシ、C₂₋₆ - アルケニルオキシ、カルボキシ、C₁₋₆ - アルコキシカルボニル、C₁₋₆ - アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ - カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) アミノ、カルバモイル；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) - アミノ - カルボニル、アミノ - C₁₋₆ - アルキル - アミノカルボニル；モノ - 及びジ (C₁₋₆ - アルキル) アミノ - C₁₋₆ - アルキル - アミノカルボニル、C₁₋₆ - アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C₁₋₆ - アルカノイルオキシ、スルホノ (sulphon o) 、C₁₋₆ - アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C₁₋₆ - アルキルチオ、ハロゲンからなる群から選択され、アリール及びヘテロアリールは任意で置換可能であり、且つ 2 つのジェミナル置換基が一緒になってオキソ、チオキソ、イミノ及び任意で置換されるメチレンを表しうる。 40

【 0081 】

幾つかの実施形態において、R¹、R²、R³、R⁵ 及び R^{5*} が独立に、C₁₋₆ アルキル（例えば、メチル及び水素）から選択される。

【 0082 】

幾つかの実施形態において、R¹、R²、R³、R⁵ 及び R^{5*} は全ていずれも水素である。

【 0083 】

幾つかの実施形態において、R¹、R²、R³ はいずれも水素であり、同様に R⁵ 及び R^{5*} のいずれかは水素であり、且つ R⁵ 及び R^{5*} のうちの他方は水素以外（例えば、メチル等 50

の C₁₋₆アルキル)である。

【0084】

幾つかの実施形態において、R^aは、水素又はメチルのいずれかである。幾つかの実施形態において、存在する場合、R^bは、水素又はメチルのいずれかである。

【0085】

幾つかの実施形態において、R^a及びR^bの一方又は両方は、水素である。

【0086】

幾つかの実施形態において、R^a及びR^bの一方は水素であり、他方は水素以外である。

【0087】

幾つかの実施形態において、R^a及びR^bの一方はメチルであり、他方は水素である。

【0088】

幾つかの実施形態において、R^a及びR^bは両方ともメチルである。

【0089】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH₂-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、いずれも本明細書において参照により援用されている国際公開第99/014226号パンフレット、国際公開第00/66604号パンフレット、国際公開第98/039352号パンフレット、及び国際公開第2004/046160号パンフレットに開示されており、-D-オキシLNA及び-L-オキシLNAヌクレオシドと俗稱されているものが挙げられる。

10

20

【0090】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-S-CH₂-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなチオLNAヌクレオシドは、国際公開第99/014226号パンフレット、及び国際公開第2004/046160号パンフレットに開示されている。これらの出願は、本明細書において参照により援用されている。

【0091】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-NH-CH₂-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなアミノLNAヌクレオシドは、国際公開第99/014226号パンフレット、及び国際公開第2004/046160号パンフレットに開示されている。これらの出願は、本明細書において参照により援用されている。

30

【0092】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、-O-CH₂-CH₂-又は-O-CH₂-CH₂-CH₂-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、本明細書中で参照により援用されている国際公開第00/047599号パンフレット、及びMorita et al, Bioorganic & Med.Chem.Lett.12 73-76に開示されており、2'-O-4'C-エチレン架橋核酸(ENA)と俗稱されているものを含む。

【0093】

40

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH₂-であり、WはOであり、且つR¹、R²及びR³の全てならびにR⁵及びR^{5*}のうちの一方は水素で、これらR⁵及びR^{5*}のうちの他方は水素以外、例えばメチル等のC₁₋₆アルキル)である。そのような5'置換LNAヌクレオシドは、国際公開第2007/134181号パンフレットに開示されている。この出願は、本明細書において参照により援用されている。

【0094】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-O-CR^aR^b-であり、R^a及びR^bの一方又は両方は水素以外(例えばメチル)であり、WはOであり、且つR¹、R²及びR³の全てならびにR⁵及びR^{5*}のうちの一方は水素で、これらR⁵及びR^{5*}のうちの他方は水素以外(例えばメチル等のC₁₋₆アルキル)である。そのようなビス修飾LNA

50

スクレオシドは、国際公開第2010/077578号パンフレットに開示されている。この出願は、本明細書において参照により援用されている。

【0095】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、2価リンカー基-O-CH(CH2OCH3)- (2'-O-メトキシエチル二環式核酸を表す (Seth et al., 2010, J. Org.Chem.Vol 75(5) pp. 1569-81)。幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、2価リンカー基-O-CH(CH2CH3)- (2'-O-エチル二環式核酸を表す (Seth et al., 2010, J. Org.Chem.Vol 75(5) pp. 1569-81)。幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-O-CHR^a-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのような6'置換LNAスクレオシドは、国際公開第10036698号パンフレット、及び国際公開第07090071号パンフレットに開示されている。これらの出願は両方とも本明細書において参照により援用されている。
10

【0096】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、-O-CH(CH2OCH3)-、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなLNAスクレオシドは、当該技術分野において環状MOE(cMOE)としても公知であり、国際公開第07090071号パンフレットに開示されている。

【0097】

幾つかの実施形態において、-R-又はS-のいずれかの構成内で、ビラジカル-X-Y-は、2価リンカー基-O-CH(CH3)-を表す。幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は共に、2価リンカー基-O-CH₂-O-CH₂を表す (Seth et al., 2010, J. Org.Chem.)。幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、-O-CH(CH3)-、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのような6'メチルLNAスクレオシドは、当該分野においてcETスクレオシドとしても知られており、国際公開第07090071号パンフレット(-D)、及び国際公開第2010/036698号パンフレット(-L)に開示されている(S)cET又は(R)cET立体異性体のいずれかでありうる。これらの出願は両方とも本明細書において参照により援用されている)。
20

【0098】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-O-CR^aR^b-であり、R^a又はR^bはいずれも水素ではなく、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。幾つかの実施形態において、R^a及びR^bは両方ともメチルである。そのような6'二置換LNAスクレオシドは、国際公開第2009006478号パンフレットに開示されている。この出願は、本明細書において参照により援用されている。
30

【0099】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-S-CHR^a-であり、WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのような6'置換チオLNAスクレオシドは、国際公開第11156202号パンフレットに開示されており、この出願は、本明細書において参照により援用されている。幾つかの6'置換チオLNAの実施形態において、R^aはメチルである。
40

【0100】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は、-C(=CH₂)-C(R^aR^b)-、例えば-C(=CH₂)-CH₂-であるか、又は-C(=CH₂)-CH(CH₃)-WはOであり、且つR¹、R²、R³、R⁵及びR^{5*}は全ていずれも水素である。そのようなビニルカーボLNAスクレオシドは、国際公開第08154401号パンフレット、及び国際公開第09067647号パンフレットに開示されており、これらの出願は両方とも本明細書において参照により援用されている。
50

【0101】

幾つかの実施形態において、ビラジカル-X-Y-は-N(-OR^a)-、WはOであ

り、且つ R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 及び R^{5*} は全ていずれも水素である。幾つかの実施形態において、 R^a は、メチル等の C_{1-6} アルキルである。そのような LNA ヌクレオシドは、N 置換 LNA としても公知であり、本明細書において参照により援用されている国際公開第 2008 / 150729 号パンフレットに開示されている。幾つかの実施形態において、ピラジカル - X - Y - は、2 倍リンカー基 - O - NR^a - CH₃ を一緒に指定する (Seth et al., 2010, J. Org. Chem.)。幾つかの実施形態において、ピラジカル - X - Y - は、- N (R^a) - 、W は O であり、且つ R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 及び R^{5*} は全ていずれも水素である。幾つかの実施形態において、 R^a は、 C_{1-6} アルキル、例えばメチルである。

【0102】

幾つかの実施形態において、 R^5 及び R^{5*} のうちの一方又は両方は水素であり、且つ置換時に、 R^5 及び R^{5*} のうちの他方は、 C_{1-6} アルキル、例えばメチルである。そのような実施形態において、 R^1 、 R^2 、 R^3 は全ていずれも水素であってよいし、ピラジカル - X - Y - は、- O - CH₂ - 又は - O - C (HCR^a) - 、例えば - O - C (HCH₃) - から選択可能である。

【0103】

幾つかの実施形態において、ピラジカルは、- CR^aR^b - O - CR^aR^b - 、例えば CH₂ - O - CH₂ - 、W は O であり、且つ R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 及び R^{5*} は全ていずれも水素である。幾つかの実施形態において、 R^a は、 C_{1-6} アルキル、例えばメチルである。そのような LNA ヌクレオシドは、立体構造的に制限されたヌクレオチド (CRN) としても知られており、国際公開第 2013036868 号パンフレットに開示されている。この出願は、本明細書において参照により援用されている。

【0104】

幾つかの実施形態において、ピラジカルは、- O - CR^aR^b - O - CR^aR^b - 、例えば O - CH₂ - O - CH₂ - 、W は O であり、且つ R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 及び R^{5*} は全ていずれも水素である。幾つかの実施形態において、 R^a は C_{1-6} アルキル、例えばメチルである。そのような LNA ヌクレオシドは、COC ヌクレオチドとしても知られており、Mitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009 37(4), 1225-1238 に開示されており、この出願は、本明細書において参照により援用されている。

【0105】

指定されない限り、LNA ヌクレオシドは - D 又は - L 立体異性体でありうることが認識されるであろう。

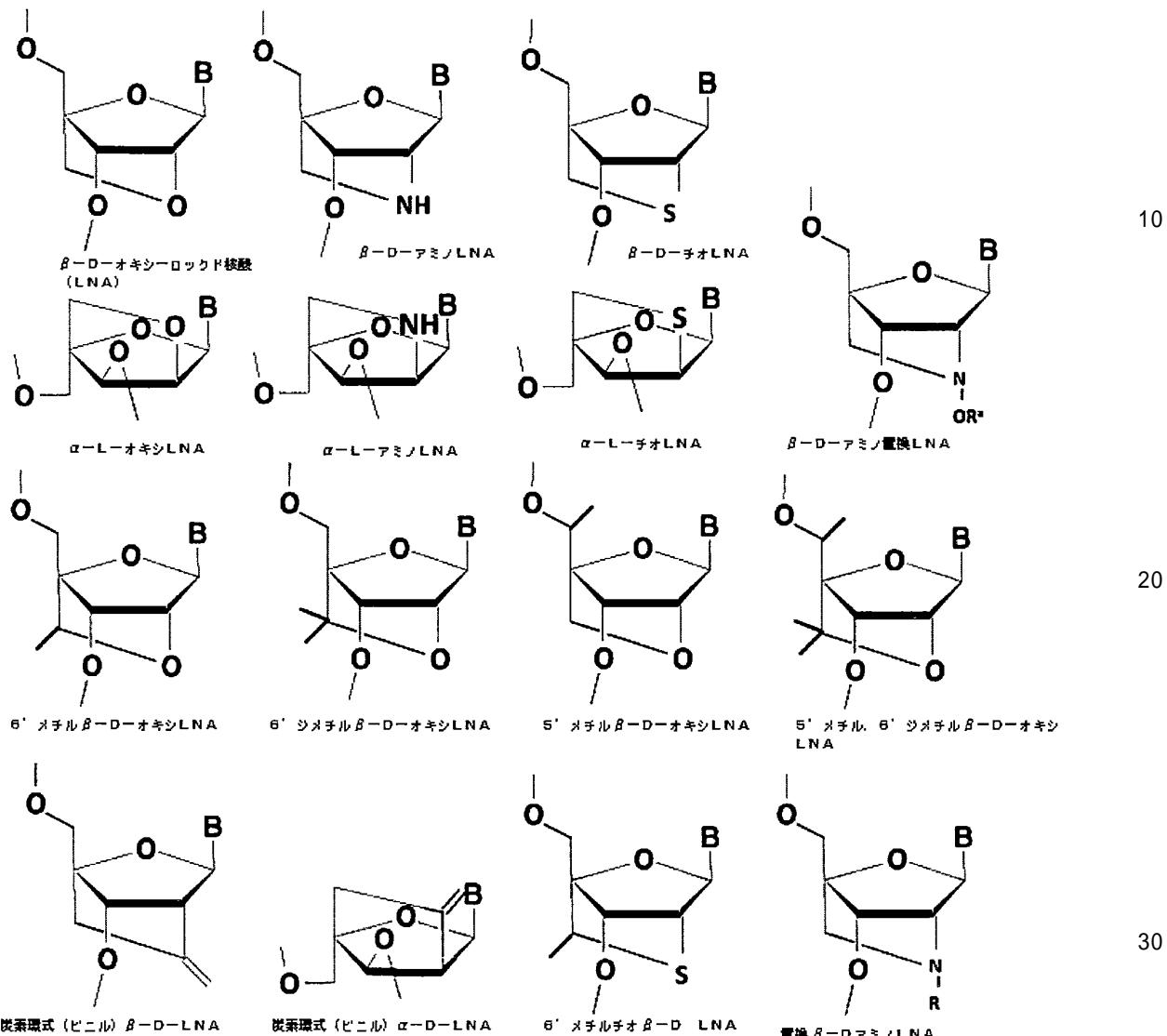
【0106】

LNA ヌクレオシドの或る例は、スキーム 1 に図示されている。

【0107】

【化4】

スキーム1



【0108】

実施例に例証されているように、本発明の幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド中のLNAヌクレオシドは、-D-オキシ-LNAヌクレオシドである。

【0109】

ヌクレアーゼ媒介分解

ヌクレアーゼ媒介分解は、そのような配列と二本鎖を形成する場合、相補的なヌクレオチド配列の分解を媒介できるオリゴヌクレオチドを指す。

【0110】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、本発明のオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ、特にエンドヌクレアーゼ、好ましくはエンドヌクレアーゼ(RNアーゼ)、例えばRNアーゼHを補充する能力を有する標的核酸のヌクレアーゼ媒介性分解を介して機能できる。ヌクレアーゼ媒介機構は、典型的に少なくとも5もしくは6個のDNAヌクレオシドの領域を含み、親和性を高めるヌクレオシド、例えばギャップマー、ヘッダー及びテールマーによって片側又は両側に隣接するオリゴヌクレオチドである。

【0111】

RNアーゼHの活性及び補充

アンチセンスオリゴヌクレオチドのRNアーゼH活性は、相補的RNA分子と二本鎖を

成す場合に R N アーゼ H を補充する能力を指す。国際公開第 0 1 / 2 3 6 1 3 号パンフレットは、R N アーゼ H を補充する能力を決定するために使用できる R N アーゼ H 活性を測定するためのインピトロの方法を提供するものである。オリゴヌクレオチドは典型的に、R N アーゼ H を補充する能力を有すると考えられ、相補的な標的核酸配列が提供されているとき、初期速度を p m o l / l / m i n で測定した場合に、定量された初期速度の少なくとも 5 %、例えば少なくとも 1 0 % 又は 2 0 % 超の初期速度を有する（試験対象の修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで、但し、オリゴヌクレオチド中の全てのモノマー間のホスホロチオエート結合を有する D N A モノマーのみを含有するものを使用し、且つ本明細書において参照により援用されている国際公開第 0 1 / 2 3 6 1 3 号パンフレットの実施例 9 1 ~ 9 5 に記載の方法論を使用した場合）。 10

【 0 1 1 2 】

ギャップマー

本明細書において「ギャップマー」という用語は、1 つ以上の親和性を増強する修飾又クレオシド（側面又はウイング）を含む領域によって 5 ' 及び 3 ' に隣接する R N アーゼ H 補充オリゴヌクレオチド（ギャップ）の領域を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。様々なギャップマーデザインが、本明細書に記載されており、R N アーゼ H を補充する能力によって特徴付けられる。ヘッダー及びテールマーは、側面のうちの 1 つが欠けている、すなわちオリゴヌクレオチドの末端のうちの 1 つのみが親和性を増強する修飾又クレオシドを含む、R N アーゼ H を補充する能力を有するオリゴヌクレオチドである。頭部の場合、3 ' 側面は欠けている（すなわち、5 ' 側面は親和性修飾ヌクレオシドを含む）、テールマーは 5 ' 側面が欠けている（すなわち、3 ' 側面は親和性修飾ヌクレオシドを含む）。 20

【 0 1 1 3 】

L N A ギャップマー

L N A ギャップマーという用語は、親和性増強修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも 1 つが L N A ヌクレオシドである、ギャップマー オリゴヌクレオチドを言う。

【 0 1 1 4 】

混合ウイングギャップマー

混合ウイングギャップマー又は混合側面ギャップマーという用語は、側面領域のうちの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの L N A ヌクレオシドと、少なくとも 1 つの非 L N A 修飾ヌクレオシド（例えば、2 ' - O - アルキル - R N A 、2 ' - O - メチル - R N A 、2 ' - アルコキシ - R N A 、2 ' - O - メトキシエチル - R N A 、2 ' - アミノ - D N A 、2 ' - フルオロ - R N A 及び 2 ' - F - A N A ヌクレオシドのような、少なくとも 1 つの 2 ' - 置換修飾ヌクレオシド）と、を含んでなる L N A ギャップマーを指す。幾つかの実施形態において、混合ウイングギャップマーは、一方の側面に L N A ヌクレオシド（例えば、5 ' 又は 3 ' ）のみを含み、他方の側面（それぞれ 3 ' 又は 5 ' ）に 2 ' 置換修飾ヌクレオシド及び任意で L N A ヌクレオシドを含む。 30

【 0 1 1 5 】

ギャップブレイカー

「ギャップブレイカー・オリゴヌクレオチド」という用語は、ギャップ領域が非 R N アーゼ H 補充ヌクレオシド（ギャップブレイカー・ヌクレオシド、E ）で破壊された結果、ギャップ領域内に含まれる連続 D N A ヌクレオシド数が 5 未満となった場合でも R N アーゼ H の補充を維持する能力を有するギャップマーに関して使用される。非 R N アーゼ H 補充ヌクレオシドは、例えば、ヌクレオシドのリボース糖環の C 2 ' と C 4 ' との間の架橋が - D - オキシ L N A 又は S c E T ヌクレオシドのような 立体配座にある、L N A のような 3 ' 末端立体構造のヌクレオシドである。ギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドが R N アーゼ H を補充する能力は、典型的に、配列特異的、又は化合物特異的でさえある（Rukov et al. 2015 Nucl. Acids Res. Vol. 43 pp. 8476-8487 を参照）。本文献には、「ギャップブレイカー」オリゴヌクレオチドが開示されている。このギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドは、幾つかの例において標的 R N A のより特異的な開裂を提供する 40 50

R N アーゼ H を補充するものである。

【 0 1 1 6 】

幾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、ギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドである。幾つかの実施形態において、ギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドは、5' - 側面 (F) とギャップ (G) と 3' - 側面 (F') とを含み、非 R N アーゼ H 補充ヌクレオシド (ギャッププロッカーヌクレオシド、E) によってギャップが破壊され、ギャップ中に、少なくとも 3 又は 4 個の連続 D N A ヌクレオシドが含まれるようになる。幾つかの実施形態において、ギャップブレイカー・ヌクレオシド (E) が L N A ヌクレオシドであり、ヌクレオシドのリボース糖環の C 2' と C 4' との間の架橋が立体配座であり、ギャップ領域内に配置されていて、ギャップ・ブレーカー L N A ヌクレオシドが少なくとも 3' (5') 及び 3 (3') D N A ヌクレオシド、又は少なくとも 3 (5') 及び 4 (3') D N A ヌクレオシド、又は少なくとも 4 (5') 及び 3 (3') D N A ヌクレオシド隣接した 5' ならびに 3' であり、且つオリゴヌクレオチドが R N アーゼ H を補充する能力を有する。
10

【 0 1 1 7 】

ギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドは、次式で表すことができる。

F - G - E - G - F' ; 特に F₁₋₇ - G₃₋₄ - E₁ - G₃₋₄ - F'₁₋₇

D' - F - G - F' 、特に D'₁₋₃ - F₁₋₇ - G₃₋₄ - E₁ - G₃₋₄ - F'₁₋₇

F - G - F' - D" 、特に F₁₋₇ - G₃₋₄ - E₁ - G₃₋₄ - F'₁₋₇ - D"₁₋₃

D' - F - G - F' - D" 、特に D'₁₋₃ - F₁₋₇ - G₃₋₄ - E₁ - G₃₋₄ - F'₁₋₇ - D" 20

"₁₋₃

【 0 1 1 8 】

領域 D' 及び D" は、「ギャップマーデザイン」の節に記載されている。

【 0 1 1 9 】

幾つかの実施形態において、ギャップブレイカー・ヌクレオシド (E) は、スキーム 1 に図示されている - D - オキシ L N A 又は S c E T、又は別の - L N A ヌクレオシドである。

【 0 1 2 0 】

コンジュゲート

本明細書において、コンジュゲートという用語は、非ヌクレオチド部分（結合部分又は領域 C 又は第 3 の領域）に共有結合しているオリゴヌクレオチドを指し、オリゴヌクレオチドコンジュゲートとも呼ばれる。
30

【 0 1 2 1 】

本発明のオリゴヌクレオチドが 1 以上の非ヌクレオチド部分に結合されている場合、オリゴヌクレオチドの薬理を改善しうる。オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞取り込み又は安定性に影響を与えることによって達成される。幾つかの実施形態において、結合部分はオリゴヌクレオチドを肝臓に対して標的化する。同時に、コンジュゲートは、非標的細胞型、組織又は器官（例えば、組織もしくは臓器）におけるオリゴヌクレオチドの活性を低下させるように機能し、対象外の細胞型、組織又は器官における標的活性又は活性を遮断する。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コンジュゲートは、非コンジュゲートオリゴヌクレオチドと比較して、標的細胞における P D - L 1 の阻害が改善されていることを示す。別の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、非結合オリゴヌクレオチドと比較して、肝臓と、脾臓又は腎臓のような、他の器官との間の細胞分布が改善されている。すなわち、結合オリゴヌクレオチドは、脾臓又は腎臓によりも寧ろ肝臓に移行しがちである。別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって、結合オリゴヌクレオチドと比較した場合、結合オリゴヌクレオチドの肝臓への細胞の取り込みが改善されたことが明らかにされる。
40

【 0 1 2 2 】

国際公開第 9 3 / 0 7 8 8 3 号パンフレット、及び国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 3 2 3 0 号パンフレットは、好適な結合部分を提供するものであり、これらの出願は、本明細書に
50

おいて参照により援用されている。結合部分は、アシアロ糖タクパク質受容体（ASGP_r）に結合する能力を有するものが、更に好適とされる。特に、3価N-アセチルガラクトサミン結合部分は、ASGP_rへの結合に適している。例えば、本明細書において参照により援用されている、国際公開第2014/076196号パンフレット、国際公開第2014/207232号パンフレット、及び国際公開第2014/179620号パンフレットを参照のこと。この結合部分は、本質的に、核酸から構成されていないアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートの一部である。

【0123】

オリゴヌクレオチドコンジュゲート及びその合成についてはまた、Manoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T.Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001、及びManoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103による包括的総評もレポートされており、これらの文献は、その全容が本明細書において参照により援用されている。

【0124】

或る実施形態において、非ヌクレオチド部分（結合部分）は、炭水化物、細胞表面受容体リガンド、薬物物質、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素（例えば細菌毒素）、ビタミン、ウイルスタンパク質（例えばカプシド）又はこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0125】

リンカー

連鎖（linkage）又はリンカーは、1つの化学基又は関心のあるセグメントを1つ以上の共有結合を介して別の化学基又は関心対象のセグメントに連結する2つの原子間の結合である。結合部分は、オリゴヌクレオチドに直接又は連結部分（例えば、リンカーもしくはテザー）を介して結合させることができる。リンカーは、第3の領域、例えば結合部分（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又は連続ヌクレオチド配列（領域A）に共有結合するように機能する。

【0126】

本発明の幾つかの実施形態において、本発明のコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、任意で、標的核酸（第1の領域、すなわち領域A）に相補的なオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列と結合部分（第3の領域、すなわち領域C）との間に位置するリンカー領域（第2の領域、すなわち領域B及び／もしくは領域Y）を含む。

【0127】

領域Bは、哺乳類の体内で通常遭遇するか又は遭遇するものに類似した条件下にて開裂可能な生理学的に易変的な結合を含むか又はそれからなる、生体開裂性リンカーを指す。生理学的に易変的なリンカーが化学的変換（例えば開裂）を受ける条件は、pH、温度、酸化的もしくは還元的条件又は薬剤等の化学的条件、及び哺乳類細胞内で見つかる塩濃度又は遭遇するものに類似の塩濃度を含む。哺乳類の細胞内状態にはまた、タンパク質分解酵素、加水分解酵素又はヌクレアーゼなどの哺乳動物細胞に通常存在する酵素活性の存在も含まれる。一実施形態において、生体開裂性リンカーは、S1ヌクレアーゼの開裂に感受性である。好みの実施形態において、ヌクレアーゼ感受性リンカーは、1~10ヌクレオシド、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオシド、より好みの2~6ヌクレオシド、最も好みの少なくとも2連続ホスホジエステル結合、例えば少なくとも3又は4又は5連続ホスホジエステル結合、2~4連結ヌクレオシドを含む。ヌクレオシドは、DNA又はRNAが好み。ホスホジエステル含有の生体開裂性リンカーは、本明細書中で参照により援用されている国際公開第2014/076195号パンフレットに詳述されている。

【0128】

領域Yは、必ずしも生体開裂性ではないが、主に、結合部分（領域C又は第3領域）を、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列（領域A又は第1領

10

20

30

40

50

域)に共有結合させる機能を果たすリンカーをいう。領域Yのリンカーは、エチレングリコール、アミノ酸単位又はアミノアルキル基などの繰り返し単位の鎖構造又はオリゴマーを含みうる。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、A - B - C、A - B - Y - C、A - Y - B - C又はA - Y - Cのように構成できる。幾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アミノアルキル基等の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。

【0129】

処置

本明細書において「処置」という用語は、既存の疾患(例えば、本明細書で言及する疾患もしくは障害)の治療、又は疾患の防止、すなわち予防を指す。したがって、幾つかの実施形態において本明細書中で言及される治療は予防的でありうることが認識されるであろう。

10

【0130】

病原体に対する免疫応答の回復

免疫応答は、先天性及び適応性の免疫応答に分類される。自然免疫系は、即時的ではあるが非特異的な応答を提供するものである。適応免疫応答は、自然免疫応答によって活性化され、特定の病原体に対して高度に特異的である。抗原提示細胞の表面上に病原体由来抗原が提示されると、適応免疫応答の免疫細胞(すなわち、Tリンパ球及びBリンパ球)が、抗原特異的受容体を介して活性化され、病原性特異的免疫応答、及び免疫記憶の発生につながる。HBV及びHCVのような慢性ウイルス感染症は、ウイルス特異的T細胞の非応答性を特徴とするT細胞枯渇と関連している。T細胞の疲弊は充分に研究され、総説については、例えばYi et al 2010 Immunology 129, 474-481を参照のこと。慢性ウイルス感染はまた、先天性免疫細胞であるNK細胞の機能低下に関連する。慢性感染のクリアランスのためには、ウイルス免疫応答の強化が重要である。T細胞及びNK細胞媒介性の病原体に対する免疫応答の回復は、増殖、サイトカイン分泌及び細胞溶解性機能の測定によって評価できる(Dolina et al. 2013 Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2 e72、及び本明細書中の実施例6)。

20

【発明を実施するための形態】

【0131】

30

本発明は、動物、特にヒトに感染した病原体に対する免疫応答を回復させるための、アンチセンスオリゴヌクレオチド及びそのコンジュゲート、ならびにこれらを含む医薬組成物の使用に関する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、肝臓に感染した病原体、特にHBVのような慢性肝臓感染症に対して、特に有用である。コンジュゲートは、オリゴヌクレオチドの分布の標的化を可能にし、標的核酸の全身的ノックダウンを防止する。

【0132】

本発明のオリゴヌクレオチド

本発明は、PD-L1の発現を調節できるオリゴヌクレオチドに関する。調節は、PD-L1をコードする標的核酸又はPD-L1の調節に関与する標的核酸にハイブリダイズによって達成できる。標的核酸は、(例えば、配列番号:1、配列番号:2及び/又は配列番号:3からなる群から選択される配列)哺乳類PD-L1配列でありうる。標的核酸は、PD-L1の発現又は調節を支持する哺乳類の細胞から発現されたプレmRNA、mRNA又は任意のRNA配列であってもよい。

40

【0133】

本発明のオリゴヌクレオチドは、PD-L1を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0134】

本発明の一態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、結合部分、特にアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分に結合されている。

50

【 0 1 3 5 】

幾つかの実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを阻害又は下方制御することによって標的の発現を調節できる。そのような調節によって、標的の正常発現レベルと比較して少なくとも 20%、より好ましくは少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%又は90%標的の正常発現レベルを生ずることが好ましい。
細胞もしくは生物体を感染性薬剤で抗原投与した場合、又は感染性薬剤で抗原投与をシミュレートする薬剤（例えば、ポリ I : C もしくは L P S）で処置した場合、そのような調節によって、発現レベルと比較して少なくとも 20%、より好ましくは少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、又は 90% の発現の阻害を生ずることが好ましい。
幾つかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドを、K A R P A S - 2 9 9
又は T H P 1 細胞を使用して、P D - L 1 の m R N A の発現レベルをインビボで少なくとも 60% 又は 70% 阻害できる可能性がある。
幾つかの実施形態では、本発明の化合物を、K A R P A S - 2 9 9 又は T H P 1 細胞を使用して、P D - L 1 タンパク質の発現レベルをインビボで少なくとも 50% 阻害できる可能性がある。
好適には、実施例は、P D - L 1 R N A（例えば、実施例 1）を測定するために使用できるアッセイを提供する。
標的の調節は、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誘発される。
幾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、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。ミスマッチに關係なく、標的核酸へのハイブリダイゼーションは、依然として P D - L 1 発現の所望の調節を示すのに充分でありうる。
ミスマッチの結果として結合親和性が低減した場合、オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド数を増加させることによって、且つ / あるいは、標的（例えば、オリゴヌクレオチド配列内に存在する、L N A 等の 2' 修飾ヌクレオシド）に対する結合親和性を増強することによって、補償するのが有利な場合がある。

【 0 1 3 6 】

幾つかの実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、病原体特異的 T 細胞を回復させる機能を有する。
幾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、未処置対照、又は標準ケアで処置された対照と比較した場合、病原体特異的 T 細胞を少なくとも 40%、50%、60% 又は 70% 増加させる機能を有する。
一実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートは、未処置対照、又は標準ケアで処置された対照と比較して、H B V 特異的 T 細胞を増加させる機能を有する。
実施例は、H B V 特異的 T 細胞（例えば、T 細胞増殖、サイトカイン分泌及び細胞溶解活性）を測定するために使用できるアッセイを提供するのが好適である。
別の実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートは、未処置対照、又は標準ケアで処置された対照と比較して、H C V 特異的 T 細胞を増加させる機能を有する。
別の実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又はコンジュゲートは、未処置対照、又は標準ケアで処置された対照と比較して、H D V 特異的 T 細胞を増加させることができる。

【 0 1 3 7 】

幾つかの実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは動物又はヒトの H B s 抗原レベルを低減させることができる。
幾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、処置前のレベルと比較して、H B s 抗原レベルを少なくとも 40%、50%、60% 又は 70%、より好ましくは少なくとも 80%、90% 又は 95% 低減させることができる。
本発明のオリゴヌクレオチドを、H B V に感染した動物又はヒトにおける H B s 抗原の血清変換を達成できることが、最も好ましい。

【 0 1 3 8 】

本発明の態様は、P D - L 1 標的核酸に対する相補性が少なくとも 90% である長さ 10 ~ 30 ヌクレオチドからなる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。

【 0 1 3 9 】

幾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 90% 相補的、例えば

標的核酸の領域に少なくとも 9 1 %、例えば少なくとも 9 2 %、例えば少なくとも 9 3 %、例えば少なくとも 9 4 %、例えば少なくとも 9 5 %、例えば少なくとも 9 6 %、例えば少なくとも 9 7 %、例えば少なくとも 9 8 %、又は 1 0 0 %に対して相補的な連続配列を含む。

【 0 1 4 0 】

好みしい実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド、又はこれらの連続ヌクレオチド配列は、標的核酸の領域に完全に対して相補的である（1 0 0 %相補的である）、あるいは幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間に 1 つ又は 2 つのミスマッチを含む場合がある。

【 0 1 4 1 】

幾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 又は配列番号：2 内に存在する標的核酸領域に対して、少なくとも 9 0 %相補的、例えば完全に（すなわち 1 0 0 %）相補的である、1 0 ~ 3 0 ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含む。幾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 及び配列番号：2 内に存在する対応する標的核酸領域に対して 1 0 0 %相補的である。幾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 及び配列番号：3 内に存在する対応する標的核酸領域に対して 1 0 0 %相補的である。

【 0 1 4 2 】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、対応する標的核酸領域に対して少なくとも 9 0 %相補性、例えば 1 0 0 %相補性を有する長さ 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの連続ヌクレオチド配列を含み、連続ヌクレオチド配列が、配列番号：1 上の位置 3 7 1 - 3 0 6 8、5 4 6 7 - 1 2 1 0 7 及び 1 5 3 1 7 - 1 9 5 1 1 からなる群から選択される標的核酸のサブ配列に対して相補的である。更なる実施形態において、標的核酸のサブ配列は、配列番号：1 上の位置 3 7 1 - 5 1 0、8 2 2 - 1 0 9 0、1 9 9 2 - 3 0 6 8、5 4 6 7 - 5 6 0 6、6 4 7 0 - 1 2 1 0 7、1 5 3 1 7 - 1 5 7 2 0、1 5 3 1 7 - 1 8 0 8 3、1 8 8 8 1 - 1 9 4 9 4 及び 1 8 8 1 - 1 9 4 9 4 からなる群から選択される。好みしい実施形態において、標的核酸のサブ配列は、配列番号：1 上の位置 7 3 0 0 - 7 3 3 3、8 0 2 8 - 8 0 7 2、9 8 1 2 - 9 8 5 9、1 1 7 8 7 - 1 1 8 7 3 及び 1 5 6 9 0 - 1 5 7 3 5 からなる群から選択される。

【 0 1 4 3 】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、配列番号：1 内に存在する対応する標的核酸領域に対して、少なくとも 9 0 %相補的、例えば 1 0 0 %相補的である、1 0 ~ 3 0 ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含み、標的核酸領域は、表 4 の領域 a 1 ~ a 4 4 9 からなる群から選択される。

【 0 1 4 4 】

10

20

30

【表4-1】

表4：本発明のオリゴヌクレオチドを使用して標的化できる配列番号1の領域

領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ
	開始	終了			開始	終了			開始	終了	
a1	51	82	32	a151	6994	7020	27	a301	13092	13115	24
a2	87	116	30	a152	7033	7048	16	a302	13117	13134	18
a3	118	133	16	a153	7050	7066	17	a303	13136	13169	34
a4	173	206	34	a154	7078	7094	17	a304	13229	13249	21
a5	221	287	67	a155	7106	7122	17	a305	13295	13328	34
a6	304	350	47	a156	7123	7144	22	a306	13330	13372	43
a7	354	387	34	a157	7146	7166	21	a307	13388	13406	19
a8	389	423	35	a158	7173	7193	21	a308	13408	13426	19
a9	425	440	16	a159	7233	7291	59	a309	13437	13453	17
a10	452	468	17	a160	7300	7333	34	a310	13455	13471	17
a11	470	484	15	a161	7336	7351	16	a311	13518	13547	30
a12	486	500	15	a162	7353	7373	21	a312	13565	13597	33
a13	503	529	27	a163	7375	7412	38	a313	13603	13620	18
a14	540	574	35	a164	7414	7429	16	a314	13630	13663	34
a15	576	649	74	a165	7431	7451	21	a315	13665	13679	15
a16	652	698	47	a166	7453	7472	20	a316	13706	13725	20
a17	700	750	51	a167	7474	7497	24	a317	13727	13774	48
a18	744	758	15	a168	7517	7532	16	a318	13784	13821	38
a19	774	801	28	a169	7547	7601	55	a319	13831	13878	48
a20	805	820	16	a170	7603	7617	15	a320	13881	13940	60
a21	827	891	65	a171	7632	7647	16	a321	13959	14013	55
a22	915	943	29	a172	7649	7666	18	a322	14015	14031	17
a23	950	982	33	a173	7668	7729	62	a323	14034	14049	16
a24	984	1000	17	a174	7731	7764	34	a324	14064	14114	51
a25	1002	1054	53	a175	7767	7817	51	a325	14116	14226	111
a26	1060	1118	59	a176	7838	7860	23	a326	14229	14276	48
a27	1124	1205	82	a177	7862	7876	15	a327	14292	14306	15
a28	1207	1255	49	a178	7880	7944	65	a328	14313	14384	72
a29	1334	1349	16	a179	7964	8012	49	a329	14386	14408	23
a30	1399	1425	27	a180	8028	8072	45	a330	14462	14481	20
a31	1437	1458	22	a181	8086	8100	15	a331	14494	14519	26
a32	1460	1504	45	a182	8102	8123	22	a332	14557	14577	21
a33	1548	1567	20	a183	8125	8149	25	a333	14608	14628	21
a34	1569	1586	18	a184	8151	8199	49	a334	14646	14668	23
a35	1608	1662	55	a185	8218	8235	18	a335	14680	14767	88
a36	1677	1700	24	a186	8237	8276	40	a336	14765	14779	15
a37	1702	1721	20	a187	8299	8344	46	a337	14815	14844	30

【0145】

10

20

30

40

【表4-2】

領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ
	開始	終了			開始	終了			開始	終了	
a38	1723	1745	23	a188	8346	8436	91	a338	14848	14925	78
a39	1768	1794	27	a189	8438	8470	33	a339	14934	14976	43
a40	1820	1835	16	a190	8472	8499	28	a340	14978	15009	32
a41	1842	1874	33	a191	8505	8529	25	a341	15013	15057	45
a42	1889	1979	91	a192	8538	8559	22	a342	15064	15091	28
a43	1991	2011	21	a193	8562	8579	18	a343	15094	15140	47
a44	2013	2038	26	a194	8581	8685	105	a344	15149	15165	17
a45	2044	2073	30	a195	8688	8729	42	a345	15162	15182	21
a46	2075	2155	81	a196	8730	8751	22	a346	15184	15198	15
a47	2205	2228	24	a197	8777	8800	24	a347	15200	15221	22
a48	2253	2273	21	a198	8825	8865	41	a348	15232	15247	16
a49	2275	2303	29	a199	8862	8894	33	a349	15250	15271	22
a50	2302	2333	32	a200	8896	8911	16	a350	15290	15334	45
a51	2335	2366	32	a201	8938	8982	45	a351	15336	15369	34
a52	2368	2392	25	a202	8996	9045	50	a352	15394	15416	23
a53	2394	2431	38	a203	9048	9070	23	a353	15433	15451	19
a54	2441	2455	15	a204	9072	9139	68	a354	15453	15491	39
a55	2457	2494	38	a205	9150	9168	19	a355	15496	15511	16
a56	2531	2579	49	a206	9170	9186	17	a356	15520	15553	34
a57	2711	2732	22	a207	9188	9202	15	a357	15555	15626	72
a58	2734	2757	24	a208	9204	9236	33	a358	15634	15652	19
a59	2772	2786	15	a209	9252	9283	32	a359	15655	15688	34
a60	2788	2819	32	a210	9300	9331	32	a360	15690	15735	46
a61	2835	2851	17	a211	9339	9354	16	a361	15734	15764	31
a62	2851	2879	29	a212	9370	9398	29	a362	15766	15787	22
a63	2896	2912	17	a213	9400	9488	89	a363	15803	15819	17
a64	2915	2940	26	a214	9490	9537	48	a364	15846	15899	54
a65	2944	2973	30	a215	9611	9695	85	a365	15901	15934	34
a66	2973	2992	20	a216	9706	9721	16	a366	15936	15962	27
a67	2998	3016	19	a217	9723	9746	24	a367	15964	15985	22
a68	3018	3033	16	a218	9748	9765	18	a368	15987	16023	37
a69	3036	3051	16	a219	9767	9788	22	a369	16025	16061	37
a70	3114	3139	26	a220	9794	9808	15	a370	16102	16122	21
a71	3152	3173	22	a221	9812	9859	48	a371	16134	16183	50
a72	3181	3203	23	a222	9880	9913	34	a372	16185	16281	97
a73	3250	3271	22	a223	9923	9955	33	a373	16283	16298	16
a74	3305	3335	31	a224	9966	10007	42	a374	16305	16323	19
a75	3346	3363	18	a225	10009	10051	43	a375	16325	16356	32
a76	3391	3446	56	a226	10053	10088	36	a376	16362	16404	43

10

20

30

40

【0146】

【表4-3】

領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ
	開始	終了			開始	終了			開始	終了	
a77	3448	3470	23	a227	10098	10119	22	a377	16406	16456	51
a78	3479	3497	19	a228	10133	10163	31	a378	16494	16523	30
a79	3538	3554	17	a229	10214	10240	27	a379	16536	16562	27
a80	3576	3597	22	a230	10257	10272	16	a380	16564	16580	17
a81	3603	3639	37	a231	10281	10298	18	a381	16582	16637	56
a82	3663	3679	17	a232	10300	10318	19	a382	16631	16649	19
a83	3727	3812	86	a233	10339	10363	25	a383	16655	16701	47
a84	3843	3869	27	a234	10409	10426	18	a384	16737	16781	45
a85	3874	3904	31	a235	10447	10497	51	a385	16783	16804	22
a86	3926	3955	30	a236	10499	10529	31	a386	16832	16907	76
a87	3974	3993	20	a237	10531	10546	16	a387	16934	16965	32
a88	3995	4042	48	a238	10560	10580	21	a388	16972	17035	64
a89	4053	4073	21	a239	10582	10596	15	a389	17039	17069	31
a90	4075	4123	49	a240	10600	10621	22	a390	17072	17109	38
a91	4133	4157	25	a241	10623	10664	42	a391	17135	17150	16
a92	4158	4188	31	a242	10666	10685	20	a392	17167	17209	43
a93	4218	4250	33	a243	10717	10773	57	a393	17211	17242	32
a94	4277	4336	60	a244	10775	10792	18	a394	17244	17299	56
a95	4353	4375	23	a245	10794	10858	65	a395	17304	17344	41
a96	4383	4398	16	a246	10874	10888	15	a396	17346	17400	55
a97	4405	4446	42	a247	10893	10972	80	a397	17447	17466	20
a98	4448	4464	17	a248	10974	10994	21	a398	17474	17539	66
a99	4466	4493	28	a249	10996	11012	17	a399	17561	17604	44
a100	4495	4558	64	a250	11075	11097	23	a400	17610	17663	54
a101	4571	4613	43	a251	11099	11124	26	a401	17681	17763	83
a102	4624	4683	60	a252	11140	11157	18	a402	17793	17810	18
a103	4743	4759	17	a253	11159	11192	34	a403	17812	17852	41
a104	4761	4785	25	a254	11195	11226	32	a404	17854	17928	75
a105	4811	4858	48	a255	11235	11261	27	a405	17941	18005	65
a106	4873	4932	60	a256	11279	11337	59	a406	18007	18035	29
a107	4934	4948	15	a257	11344	11381	38	a407	18041	18077	37
a108	4955	4974	20	a258	11387	11411	25	a408	18085	18146	62
a109	4979	5010	32	a259	11427	11494	68	a409	18163	18177	15
a110	5012	5052	41	a260	11496	11510	15	a410	18179	18207	29
a111	5055	5115	61	a261	11512	11526	15	a411	18209	18228	20
a112	5138	5166	29	a262	11528	11551	24	a412	18230	18266	37
a113	5168	5198	31	a263	11570	11592	23	a413	18268	18285	18
a114	5200	5222	23	a264	11594	11634	41	a414	18287	18351	65
a115	5224	5284	61	a265	11664	11684	21	a415	18365	18395	31

10

20

30

40

【0147】

【表4-4】

領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ	領域a	配列番号1における位置		長さ
	開始	終了			開始	終了			開始	終了	
a116	5286	5302	17	a266	11699	11719	21	a416	18402	18432	31
a117	5317	5332	16	a267	11721	11746	26	a417	18434	18456	23
a118	5349	5436	88	a268	11753	11771	19	a418	18502	18530	29
a119	5460	5512	53	a269	11787	11873	87	a419	18545	18590	46
a120	5514	5534	21	a270	11873	11905	33	a420	18603	18621	19
a121	5548	5563	16	a271	11927	11942	16	a421	18623	18645	23
a122	5565	5579	15	a272	11946	11973	28	a422	18651	18708	58
a123	5581	5597	17	a273	11975	11993	19	a423	18710	18729	20
a124	5600	5639	40	a274	12019	12114	96	a424	18731	18758	28
a125	5644	5661	18	a275	12116	12135	20	a425	18760	18788	29
a126	5663	5735	73	a276	12137	12158	22	a426	18799	18859	61
a127	5737	5770	34	a277	12165	12192	28	a427	18861	18926	66
a128	5778	5801	24	a278	12194	12216	23	a428	18928	18980	53
a129	5852	5958	107	a279	12218	12246	29	a429	19001	19018	18
a130	6007	6041	35	a280	12262	12277	16	a430	19034	19054	21
a131	6049	6063	15	a281	12283	12319	37	a431	19070	19092	23
a132	6065	6084	20	a282	12334	12368	35	a432	19111	19154	44
a133	6086	6101	16	a283	12370	12395	26	a433	19191	19213	23
a134	6119	6186	68	a284	12397	12434	38	a434	19215	19240	26
a135	6189	6234	46	a285	12436	12509	74	a435	19255	19356	102
a136	6236	6278	43	a286	12511	12543	33	a436	19358	19446	89
a137	6291	6312	22	a287	12545	12565	21	a437	19450	19468	19
a138	6314	6373	60	a288	12567	12675	109	a438	19470	19512	43
a139	6404	6447	44	a289	12677	12706	30	a439	19514	19541	28
a140	6449	6482	34	a290	12708	12724	17	a440	19543	19568	26
a141	6533	6555	23	a291	12753	12768	16	a441	19570	19586	17
a142	6562	6622	61	a292	12785	12809	25	a442	19588	19619	32
a143	6624	6674	51	a293	12830	12859	30	a443	19683	19739	57
a144	6679	6762	84	a294	12864	12885	22	a444	19741	19777	37
a145	6764	6780	17	a295	12886	12916	31	a445	19779	19820	42
a146	6782	6822	41	a296	12922	12946	25	a446	19822	19836	15
a147	6824	6856	33	a297	12948	12970	23	a447	19838	19911	74
a148	6858	6898	41	a298	12983	13003	21	a448	19913	19966	54
a149	6906	6954	49	a299	13018	13051	34	a449	19968	20026	59
a150	6969	6992	24	a300	13070	13090	21				

【0148】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、a7、a26、a43、a119、a142、a159、a160、a163、a169、a178、a179、a180、a189、a201、a202、a204、a214、a221、a224、a226、a243、a254、a258、269、a274、a350、a360、a364、a365、a370、a372、a381、a383、a386、a389、a400、a427、a435及びa438からなる群から選択される標的核酸の領域に対して相補的である。

【0149】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、a 1 6 0、a 1 8 0、a 2 2 1、a 2 6 9 及びa 3 6 0 からなる群から選択される標的核酸領域の領域に対して相補的である。

【0150】

幾つかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドが、8～35ヌクレオチド長、例えば9～30、例えば10～22、例えば11～20、例えば12～18、例えば13～17又は14～16連続ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16～20ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。本明細書で示される任意の範囲は、範囲の端点を含むことを理解すべきである。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言える場合、10ヌクレオチドと30ヌクレオチドの両方が含まれる。10

【0151】

幾つかの実施形態において、連続ヌクレオチド配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30連続ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16、17、18、19又は20ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0152】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、表5に記載の配列からなる群から選択される配列を含むか又はそれからなる。20

【0153】

幾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又は連続ヌクレオチド配列が、配列番号：5～743なる群から選択される配列に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる（表5に掲載のモチーフ配列を参照のこと）。

【0154】

幾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又は連続ヌクレオチド配列が、配列番号：5～743及び771からなる群から選択される配列に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。30

【0155】

幾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又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号：6、8、9、13、41、42、58、77、92、111、128、151、164、166、169、171、222、233、245、246、250、251、252、256、272、273、287、292、303、314、318、320、324、336、342、343、344、345、346、349、359、360、374、408、409、415、417、424、429、430、458、464、466、474、490、493、512、519、519、529、533、534、547、566、567、578、582、601、619、620、636、637、638、640、645、650、651、652、653、658、659、660、665、678、679、680、682、683、684、687、694、706、716、728、733、734、及び735からなる群から選択される配列に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。40

【0156】

幾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又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号：287に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0157】

幾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又は連続ヌクレオチド配50

列は、配列番号：342に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0158】

幾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又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号：640に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

【0159】

幾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又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号：466に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

10

【0160】

幾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又は連続ヌクレオチド配列は、配列番号：566に対して少なくとも90%同一、好ましくは100%同一の10～30ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる。

10

【0161】

オリゴヌクレオチドが（標的核酸に相補的な）連続ヌクレオチド配列よりも長い実施形態において、表5のモチーフ配列は、本発明の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部分を形成する。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの配列は、（例えば、生体開裂性リンカーが添加されていない場合）連続的なヌクレオチド配列と同等である。

20

【0162】

連続した核酸塩基配列（モチーフ配列）は、例えばヌクレアーゼ耐性及び／又は標的核酸への結合親和性が増強するように修飾可能なことが理解される。修飾については、「定義」及び「オリゴヌクレオチドデザイン」の節に記載されている。表5には、各モチーフ配列の好ましいデザインが列挙されている。

【0163】

オリゴヌクレオチドデザイン

オリゴヌクレオチドデザインとは、オリゴヌクレオチド配列中のヌクレオシド糖修飾のパターンを指す。本発明のオリゴヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオシドを含み、また、DNA又はRNAヌクレオシドを含む場合がある。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、糖修飾ヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。本発明のオリゴヌクレオチドに修飾ヌクレオシドを取り込むことによって、標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増強できる。その場合、修飾ヌクレオシドは、親和性増強修飾ヌクレオチドと呼ばれる場合があり、修飾ヌクレオシドは単位と呼ばれる場合がある。

30

【0164】

実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1修飾ヌクレオシド、例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15又は少なくとも16修飾ヌクレオシドを含む。或る実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1～10修飾ヌクレオシド、例えば2～8修飾ヌクレオシド、例えば3～7修飾ヌクレオシド、例えば4～6修飾ヌクレオシド、例えば3、4、5、6又は7修飾ヌクレオシドを含む。

40

【0165】

実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1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。本発明のオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA及びLNAヌクレオシドからなる群から独立に選択された、1以上の2'糖修飾ヌクレオシドを含むことが、好ましい。更により好ましいのは、1以上の修飾ヌクレオシドは、ロックド核酸(LNA)である。

50

【0166】

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。好ましい実施形態において、連続ヌクレオチド配列内の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート又はボラノホスフェートヌクレオシド間結合である。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドの連続配列中の全てのヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合である。

【0167】

幾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、又は8のLNAヌクレオシド、例えば2～6のLNAヌクレオシド、例えば3～7のLNAヌクレオシド、4～6のLNAヌクレオシド又は3、4、5、6又は7のLNAヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド中の修飾ヌクレオシドの少なくとも75%は、LNAヌクレオシドであり、修飾ヌクレオシドの例えば80%、例えば85%、例えば90%はLNAヌクレオシドである。なお更に実施形態において、オリゴヌクレオチド中の全ての修飾ヌクレオシドは、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、-Dもしくは-L構成又はそれらの組み合わせのいずれかに、-D-Oキシ-LNA及び以下のLNAヌクレオシド(チオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、及び/又はENAのうちの1以上)の両方を含みうる。更なる実施形態において、全てのLNAシトシン単位は5-メチル-シトシンである。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列は、5'末端に少なくとも1つのLNAヌクレオシドを有し、且つヌクレオチド配列の3'末端に少なくとも2つのLNAヌクレオシドを有する。

10

【0168】

幾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、2'-MOE-RNAヌクレオシド(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の2'-MOE-RNAヌクレオシド)である少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、前記修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも1つは、2'-フルオロ-DNA(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の2'-フルオロ-DNAヌクレオシド)である。

20

【0169】

30

幾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ヌクレオシド及び少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシドを含む。

【0170】

本発明の幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、2'糖修飾ヌクレオシド及びDNA単位の両方を含む。オリゴヌクレオチドは、LNA及びDNAヌクレオシド(単位)の両方を含むのが好ましい。LNA及びDNA単位の総計は、8～30(例えば、10～25、好ましくは12～22(例えば、12～18、更により好ましくは11～16であるのが、好ましい。本発明の幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列(例えば、連続ヌクレオチド配列)は少なくとも1つの又は2つのLNAヌクレオシドからなり、残りのヌクレオシドはDNA単位である。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、LNAヌクレオシド、及び天然起源のヌクレオシド(RNA又はDNA、最も好ましくはDNAヌクレオシド)のみ、任意で、修飾ヌクレオシド間結合を有するもの(ホスホロチオエート等)を含む。

40

【0171】

本発明の実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、RNアーゼHを補充する能力を有する。

【0172】

本発明のオリゴヌクレオチドの構造デザインは、ギャブマー、ギャップブレイカー、ヘッドマー及びテールマーから選択できる。

【0173】

50

ギャップマー・デザイン

好ましい実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、本明細書中で単に「ギャップマー」とも呼ばれる、ギャップマー・デザイン又は構造を有する。ギャップマー構造において、オリゴヌクレオチドは、5'側面、ギャップ及び3' - 側面の、少なくとも3つの別個の構造領域、すなわち「5' - > 3'」配向のF - G - F'を含む。このデザインでは、フランкиングF領域及びF'領域（ウイング領域とも呼ばれる）は、P D - L 1標的核酸に対して相補的な修飾ヌクレオチドの連続ストレッチを含み、ギャップ領域Gは又クレオチドの連続ストレッチを含むオリゴヌクレオチドが標的核酸と二本鎖を成す場合、ヌクレアーゼ、好ましくはR N Aーゼのようなエンドヌクレアーゼ、例えばR N AーゼHを補充する能力を有する。¹⁰ ヌクレアーゼ、特にR N AーゼHを補充する能力を有するヌクレオシドは、D N A、- L - オキシ - L N A、2' - フルオロ(Flouro) - A N A及びU N Aからなる群から選択できる。領域Gの5'末端及び3'末端に隣接する領域F及びF'は、好ましくは非ヌクレアーゼ補充ヌクレオシド（3'末端構造を有するヌクレオシド）、より好ましくは1つ以上の親和性増強修飾ヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、3'側面は、少なくとも1つのL N Aヌクレオシド、好ましくは少なくとも2つのL N Aヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、5'側面は、少なくとも1つのL N Aヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、5'及び3'側面領域は両方とも、L N Aヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態において、側面領域中の全てのヌクレオシドは、L N Aヌクレオシドである。他の実施形態では、隣接領域は、D N Aヌクレオシド及び/又は非L N A修飾ヌクレオシド（例えば、2'置換ヌクレオシド）のような、L N Aヌクレオシド及び他のヌクレオシド（混合側面）の両方を含む場合がある。この場合、ギャップは、親和性増強修飾ヌクレオシド、好ましくはL N A（例えば、- D - オキシ - L N A）を介して5'末端及び3'末端に隣接した少なくとも5つのR N AーゼH補充ヌクレオシド（2'エンド構造を有するヌクレオシド、好ましくはD N A）の連続配列として定義される。結果として、ギャップ領域に隣接する5'隣接領域、及び3'隣接領域のヌクレオシドは修飾ヌクレオシド、好ましくは非ヌクレアーゼ補充ヌクレオシドである。²⁰

【0174】

領域F

領域Gの5'末端に付着された領域F（5'側面又は5'ウイング）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修飾ヌクレオシドを含むか、含有するか又はそれらからなる。或る実施形態において、領域Fが、1~7修飾ヌクレオシド、例えば2~6修飾ヌクレオシド、例えば2~5修飾ヌクレオシド、例えば2~4修飾ヌクレオシド、例えば1~3修飾ヌクレオシド、例えば1、2、3もしくは4修飾ヌクレオシドを含むか又はそれからなる。F領域は、その領域の5'末端及び3'末端に少なくとも修飾ヌクレオシドを有することによって、画定される。³⁰

【0175】

幾つかの実施形態において、領域F内の修飾ヌクレオシドは3'末端構造を有する。

【0176】

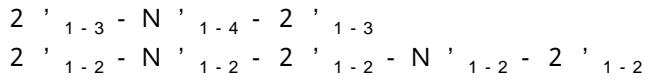
実施形態において、領域F内の修飾ヌクレオシドの1つ以上は、2'修飾ヌクレオシドである。一実施形態において、領域F内の全てのヌクレオシドは2'修飾ヌクレオシドである。

【0177】

別の実施形態において、領域Fは、2'修飾ヌクレオシドに加えて、D N A及び/又はR N Aを含む。D N A及び/又はR N Aを含む側面は、F領域の5'末端及び3'末端（G領域に隣接する）内に、2'修飾ヌクレオシドを有することを特徴とする。一実施形態において、領域Fは、D N Aヌクレオシド（例えば、1~3又は1~2の連続D N Aヌクレオシドのような、1~3の連続D N Aヌクレオシド）を含む。側面に位置するD N Aヌクレオシドは、R N AーゼHを当然補充できるものであるのが好ましい。幾つかの実施形⁵⁰

態では、F領域の2'修飾ヌクレオシド、ならびにDNA及び/又はRNAヌクレオシドは、1~3個の2'修飾ヌクレオシド、ならびに1~3個のDNAと交互に存在し、及び/又はRNAヌクレオシドである。そのような側面は、交互の側面と呼ばれる場合もある。交互の側面を有するオリゴヌクレオチド中の5'側の側面(領域F)の長さは、4~10ヌクレオシド、例えば4~8、例えば4~6ヌクレオシド、例えば4、5、6又は7修飾ヌクレオシドでありうる。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの5'側面のみが交互になっている。

交互ヌクレオシドを有する領域Fの具体例は、



10

である。

【0178】

式中、2'は、修飾ヌクレオシド及びN'がRNA又はDNAであることを表す。幾つかの実施形態において、交互側面内の全ての修飾ヌクレオシドはLNAであり、N'はDNAである。更なる実施形態において、領域F内の2'修飾ヌクレオシドのうちの1以上が、2' - O - アルキル - RNA単位、2' - O - メチル - RNA、2' - アミノ - DNA単位、2' - フルオロ - DNA単位、2' - アルコキシ - RNA、MOE単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位及び2' - フルオロ - ANA単位から選択される。

【0179】

幾つかの実施形態において、F領域は、LNA及び2'置換修飾ヌクレオシドの両方を含む。これらは、多くの場合、混合ウイング又は混合側面オリゴヌクレオチドと呼ばれる。

20

【0180】

本発明の一実施形態において、領域F内の全ての修飾ヌクレオシドはLNAヌクレオシドである。更なる実施形態において、領域F内の全てのヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。更なる実施形態において、領域F内のLNAヌクレオシドが独立に、-Dもしくは-L構成又はそれらの組み合わせのいずれかに、オキシ-LNA、チオ-LNA、アミノ-LNA、cET、及び/又はENAからなる群から選択される。好ましい実施形態において、領域Fは、連続配列の5'末端に少なくとも1つの-D-オキシLNA単位を含む。

30

領域G

【0181】

領域G(ギャップ領域)は、前述のヌクレアーゼ、特にRNアーゼHを補充する能力を有する少なくとも4、例えば、少なくとも5、例えば、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15又は少なくとも16連続ヌクレオシドを含むか又はそれからなるのが、好ましい。更なる実施形態において、領域Gは、5~12、又は6~10又は7~9(例えば、前述のヌクレアーゼを補充する能力を有する8連続ヌクレオチド単位)を含むか又はそれからなる。

40

【0182】

或る実施形態において、ヌクレアーゼを補充する能力を有する領域Gのヌクレオシド単位は、DNA、-L-LNA、C4'アルキル化DNA(国際出願PCT/EP2009/050349号明細書及びVester et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296-2300。これら両文献は本明細書に中で参照により援用されている)、ならびに、ANA及び2'F-ANAのようなアラビノース由来ヌクレオシドヌクレオシド(Mangos et al. 2003 J. AM.CHEM.SOC.125, 654-661)、UNA(アンロックド核酸)(出典:Fluitter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039。これらの文献は本明細書中で参照により援用されている)からなる群から選択される。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てアンロックド「糖」部分を生じた、アンロックド核酸である。

【0183】

50

なお更なる実施形態において、領域G内の少なくとも1つのヌクレオシド単位は、DNAヌクレオシド単位（例えば、1～18DNA単位（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17DNA単位、好ましくは2～17DNA単位（例えば、3～16DNA単位（例えば、4～15DNA単位、例えば、5～14DNA単位（例えば、6～13DNA単位（例えば、7～12DNA単位（例えば、8～11DNA単位、より好ましくは単位8～17DNA単位、又は9～16DNA単位、10～15DNA単位又は11～13DNA単位（例えば、8、9、10、11、12、13、14、154、16、17DNA単位である。幾つかの実施形態において、領域Gは100%DNA単位からなる。

【0184】

10

更なる実施形態において、領域Gは、RNアーゼH開裂を媒介できるDNAと他のヌクレオシドとの混合物からなりうる。領域Gは、少なくとも50%のDNA、より好ましくは60%、70%又は80%のDNA、更により好ましくは90%又は95%のDNAからなりうる。

【0185】

なお更なる実施形態において、領域G中の少なくとも1つのヌクレオシド単位は、-L-LNAヌクレオシド単位（例えば、少なくとも1つの-L-LNA（例えば、2、3、4、5、6、7、8又は9-L-LNAである。更なる実施形態において、領域Gは、-L-オキシ-LNAである少なくとも1つの-L-LNAを含む。更なる実施形態において、領域Gは、DNA及び-L-LNAヌクレオシド単位の組み合わせを含む。

20

【0186】

幾つかの実施形態において、領域G内のヌクレオシドは2'末端構造を有する。

【0187】

幾つかの実施形態において、領域Gは、RNアーゼHを補充する能力を有するギャップブレイカー・オリゴヌクレオチドにつながる、ギャップブレイカー・ヌクレオシドを含みうる。

【0188】

領域F'

領域Gの3'末端に付着された領域F'（3'側面又は3'ウイング）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修飾ヌクレオシドを含むか、含有するか又はそれからなる。或る実施形態において、領域F'は、1～7修飾ヌクレオシド（例えば、2～6修飾ヌクレオシド（例えば、2～4修飾ヌクレオシド（例えば、1～3修飾ヌクレオシド（例えば、1、2、3又は4修飾ヌクレオシドを含むか又はそれからなる。F'領域は、その領域の5'末端及び3'末端に少なくとも修飾ヌクレオシドを有することによって、画定される。

30

【0189】

幾つかの実施形態において、領域F'内の修飾ヌクレオシドは3'末端構造を有する。

【0190】

40

実施形態において、領域F'内の修飾ヌクレオシドのうちの1以上は、2'修飾ヌクレオシドである。一実施形態において、領域F'内の全てのヌクレオシドは2'修飾ヌクレオシドである。

【0191】

実施形態において、領域F'内の修飾ヌクレオシドのうちの1以上は、2'修飾ヌクレオシドである。

【0192】

一実施形態において、領域F'内の全てのヌクレオシドは2'修飾ヌクレオシドである。別の実施形態において、領域F'は、2'修飾ヌクレオシドに加えて、DNA又はRNAを含む。DNA及び/又はRNAを含む側面は、F'領域の5'末端（G領域に隣接す

50

る)及び3'末端内に、2'修飾ヌクレオシドを有することを特徴とする。一実施形態において、領域F'は、DNAヌクレオシド(例えば、1~3又は1~2の連続DNAヌクレオシドのような、1~4の連続DNAヌクレオシド)を含む。側面に位置するDNAヌクレオシドは、RNAアーゼHを当然補充できるものであるのが好ましい。幾つかの実施形態において、F'領域の2'修飾ヌクレオシド、ならびにDNA及び/又はRNAヌクレオシドは、1~3の2'修飾ヌクレオシド及び1~3のDNAと交互に存在する及び/又はRNAヌクレオシドであり、そのような側面は、交互の側面と呼ばれる場合がある。交互の側面を有するオリゴヌクレオチド中の3'側の側面(領域F')の長さは、4~10ヌクレオシド(例えば、4~8(例えば、4~6ヌクレオシド(例えば、4、5、6又は7修飾ヌクレオシド)でありうる。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの3'側面のみが交互になっている。10

交互ヌクレオシドを有する領域F'の具体例は、

$$\begin{array}{c} 2',_{1-2}-N',_{1-4}-2',_{1-4} \\ 2',_{1-2}-N',_{1-2}-2',_{1-2}-N',_{1-2}-2',_{1-2} \end{array}$$

である。

【0193】

式中、2'は、修飾ヌクレオシド及びN'がRNA又はDNAであることを表す。幾つかの実施形態において、交互側面内の全ての修飾ヌクレオシドはLNAであり、N'はDNAである。更なる実施形態において、領域F'内の修飾ヌクレオシドは、2' - O - アルキル - RNA単位、2' - O - メチル - RNA、2' - アミノ - DNA単位、2' - フルオロ - DNA単位、2' - アルコキシ - RNA、MOE単位、LNA単位、アラビノ核酸(ANA)単位及び2' - フルオロ - ANA単位から選択される。20

【0194】

幾つかの実施形態において、F'領域は、LNA及び2'置換修飾ヌクレオシドの両方を含む。これらは、多くの場合、混合ウイング又は混合側面オリゴヌクレオチドと呼ばれる。

【0195】

本発明の一実施形態において、全ての領域F'内の修飾ヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。更なる実施形態において、領域F'内の全ての修飾ヌクレオシドは、LNAヌクレオシドである。更なる実施形態において、領域F'内のLNAヌクレオシドが独立に、-Dもしくは-L構成又はそれらの組み合わせのいずれかに、オキシ-LNA、チオ-LNA、アミノ-LNA、cET、及び/又はENAからなる群から選択される。好ましい実施形態において、領域F'は、連続配列の3'末端に少なくとも2つの-D-オキシLNA単位を有する。30

【0196】

領域D'及びD"

領域D'及びD"は、領域Fの5'末端又は領域F'の3'末端にそれぞれ結合できる。領域D'又はD"は任意選択的である。

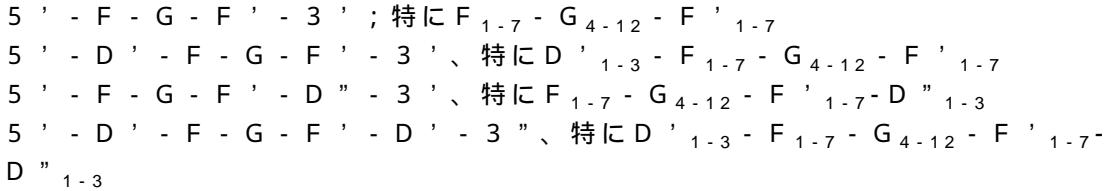
【0197】

領域D'又はD"は、標的核酸に相補的であるか又は非相補的でありうる0~5個、例えば1~5個、例えば2~4個、例えば0、1、2、3、4又は5個の追加ヌクレオチドを含みうる。これに関して、本発明のオリゴヌクレオチドは、幾つかの実施形態では、更なるヌクレオチドによって5'及び/又は3'末端に隣接する標的を調節できる連続ヌクレオチド配列を含みうる。そのような付加的なクレオチドは、ヌクレアーゼ感受性の生体開裂性リンカー(リンカーの定義を参照)として機能しうる。幾つかの実施形態において、更なる5'及び/又は3'末端ヌクレオシドは、ホスホジエステル結合と結合し、DNA又はRNAでありうる。別の実施形態において、追加の5'及び/又は3'末端ヌクレオシドは、例えば、ヌクレアーゼ安定性を高めるために、又は合成の容易さのために含まれうる修飾ヌクレオシドである。一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド配列の5'又は3'末端に、領域D'及び/又はD"を含む。更なる実4050

施形態において、D'及び/又はD"領域は、標的核酸に対して相補的ではない1~5ホスホジエステル連結DNA又はRNAヌクレオシドからなる。

【0198】

本発明のギャップマー・オリゴヌクレオチドは、次式で表すことができる。



【0199】

10

領域F、G及びF'、D'及びD"内の好ましいヌクレオシドの数及び種類は、上述されている。本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、オリゴヌクレオチドの5'又は3'末端のいずれかに共有結合した領域C、特に上に示したギャップマー・オリゴヌクレオチドを有する。

【0200】

一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、式5' - D' - F - G - F' - 3' 又は5' - F - G - F' - D'' - 3' のオリゴヌクレオチドを含み、領域F及びF'が独立に、1~7修飾ヌクレオシドを含み、GはRNAアーゼHを補充する能力を有する6~16ヌクレオシド間の領域であり、且つ領域D'又はD"が1~5ホスホジエステルの連結ヌクレオシドを含む。領域D'又はD"は、結合部分への結合が企図されるオリゴヌクレオチドの末端に存在するのが好ましい。

20

【0201】

交互側面を有するオリゴヌクレオチドの例は、次式で表すことができる。



【0202】

30

側面は、F又はF'で示され、DNAヌクレオシドなどの2'修飾ヌクレオシドのみを含む。交互領域ならびに領域F、G及びF'、D'及びD"内の好ましいヌクレオシドの数及び種類は、上述されている。

【0203】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、16、17、18、19、20、21、22ヌクレオチド長からなるギャップマーであり、各F領域及びF'領域が、独立にPD-L1標的核酸に対して相補的な1、2、3又は4修飾ヌクレオシド単位からなり、且つ領域Gが8、9、10、11、12、13、14、15、16、17ヌクレオシド単位からなり、PD-L1標的核酸と二本鎖を成す場合にヌクレアーゼを補充でき、領域D'は2つのホスホジエステル結合DNAからなる。

40

【0204】

更なる実施形態において、オリゴヌクレオチドは、各F領域及びF'領域が独立に、2' - O - メトキシエチル - リボース糖(2' - MOE)を含む3、4、5又は6修飾ヌクレオシド単位(例えば、ヌクレオシド単位、又は2' - フルオロデオキシリボース糖を含むヌクレオシド単位、及び/又はDNA単位からなり、ならびに領域Gが、8、9、10、11、12、13、14、15、16又は17ヌクレオシド単位(例えばDNA単位)、又は他のヌクレアーゼ補充ヌクレオシド(例えば-L-LNA)、又はDNAとヌクレアーゼ補充ヌクレオシドとの混合物からなる、ギャップマーとされる。

【0205】

50

更に具体的な実施形態において、オリゴスクレオチドは、各 F 領域及び F' 領域が、それぞれ 2 つの LNA 単位からなり、且つ領域 G が 12、13、14 ヌクレオシド単位、好ましくは DNA 単位からなる、ギャップマーとされる。この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、2-12-2、2-13-2 及び 2-14-2 が挙げられる。

【0206】

更に具体的な実施形態において、オリゴスクレオチドは、各 F 領域及び F' 領域が、独立に 3 つの LNA 単位からなり、且つ領域 G が 8、9、10、11、12、13 又は 14 ヌクレオシド単位、好ましくは DNA 単位からなる、ギャップマーとされる。この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、3-8-3、3-9-3、3-10-3、3-1 1-3、3-12-3、3-13-3 及び 3-14-3 が挙げられる。

10

【0207】

更に具体的な実施形態において、オリゴスクレオチドは、各 F 領域及び F' 領域がそれぞれ 4 つの LNA 単位からなり、且つ領域 G が 8、9、10、11 又は 12 ヌクレオシド単位、好ましくは DNA 単位からなる、ギャップマーとされる。この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、4-8-4、4-9-4、4-10-4、4-11-4 及び 4-12-4 が挙げられる。

【0208】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、6 ヌクレオシドを含むギャップ、及び独立にウイング内の 1 ~ 4 修飾ヌクレオシド、例えば 1-6-1、1-6-2、2-6-1、1-6-3、3-6-1、1-6-4、4-6-1、2-6-2、2-6-3、3-6-2、2-6-4、4-6-2、3-6-3、3-6-4 及び 4-6-3 ギャップマーからなる群から選択される F-G-F' デザインが挙げられる。

20

【0209】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、7 ヌクレオシドを含むギャップ、及び独立にウイング内の 1 ~ 4 修飾ヌクレオシド、例えば 1-7-1、2-7-1、1-7-2、1-7-3、3-7-1、1-7-4、4-7-1、2-7-2、2-7-3、3-7-2、2-7-4、4-7-2、3-7-3、3-7-4、4-7-3 及び 4-7-4 ギャップマーからなる群から選択される、F-G-F' デザインが挙げられる。

【0210】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、8 ヌクレオシドを有するギャップ、及びウイング内の独立に 1 ~ 4 修飾ヌクレオシド、例えば 1-8-1、1-8-2、1-8-3、3-8-1、1-8-4、4-8-1、2-8-1、2-8-2、2-8-3、3-8-2、2-8-4、4-8-2、3-8-3、3-8-4、4-8-3 及び 4-8-4 ギャップマーからなる群から選択される、F-G-F' デザインが挙げられる。

30

【0211】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、9 ヌクレオシドを含むギャップ、及び独立にウイング内の 1 ~ 4 修飾ヌクレオシド、例えば 1-9-1、2-9-1、1-9-2、1-9-3、3-9-1、1-9-4、4-9-1、2-9-2、2-9-3、3-9-2、2-9-4、4-9-2、3-9-3、3-9-4、4-9-3 及び 4-9-4 ギャップマーからなる群から選択される、F-G-F' デザインが挙げられる。

40

【0212】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、10 ヌクレオシドを含むギャップ、例えば 1-10-1、2-10-1、1-10-2、1-10-3、3-10-1、1-10-4、4-10-1、2-10-2、2-10-3、3-10-2、2-10-4、4-10-2、3-10-3、3-10-4、4-10-3 及び 4-10-4 ギャップマーからなる群から選択される F-G-F' デザインが挙げられる。

【0213】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、11 ヌクレオシドを含むギャップ、例えば 1-11-1、2-11-1、1-11-2、1-11-3、3-11-1、1-11-4、4-11-1、2-11-2、2-11-3、3-11-2、2-11-4、

50

4 - 1 1 - 2、3 - 1 1 - 3、3 - 1 1 - 4、4 - 1 1 - 3 及び 4 - 1 1 - 4 ギャップマーからなる群から選択される F - G - F' デザインが挙げられる。

【0214】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、12ヌクレオシドを含むギャップ、例えば 1 - 1 2 - 1、2 - 1 2 - 1、1 - 1 2 - 2、1 - 1 2 - 3、3 - 1 2 - 1、1 - 1 2 - 4、4 - 1 2 - 1、2 - 1 2 - 2、2 - 1 2 - 3、3 - 1 2 - 2、2 - 1 2 - 4、4 - 1 2 - 2、3 - 1 2 - 3、3 - 1 2 - 4、4 - 1 2 - 3 及び 4 - 1 2 - 4 ギャップマーからなる群から選択される F - G - F' デザインが挙げられる。

【0215】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、13ヌクレオシドを含むギャップ、10 例えば 1 - 1 3 - 1、2 - 1 3 - 1、1 - 1 3 - 2、1 - 1 3 - 3、3 - 1 3 - 1、1 - 1 3 - 4、4 - 1 3 - 1、2 - 1 3 - 2、2 - 1 3 - 3、3 - 1 3 - 2、2 - 1 3 - 4、4 - 1 3 - 2、3 - 1 3 - 3、3 - 1 3 - 4、4 - 1 3 - 3 及び 4 - 1 3 - 4 ギャップマーからなる群から選択される F - G - F' デザインが挙げられる。

【0216】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、14ヌクレオシドを含むギャップ、10 例えば 1 - 1 4 - 1、2 - 1 4 - 1、1 - 1 4 - 2、1 - 1 4 - 3、3 - 1 4 - 1、1 - 1 4 - 4、4 - 1 4 - 1、2 - 1 4 - 2、2 - 1 4 - 3、3 - 1 4 - 2、2 - 1 4 - 4、4 - 1 4 - 2、3 - 1 4 - 3、3 - 1 4 - 4、4 - 1 4 - 3 及び 4 - 1 4 - 4 ギャップマーからなる群から選択される F - G - F' デザインが挙げられる。20

【0217】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、15ヌクレオシドを含むギャップ、10 例えば 1 - 1 5 - 1、2 - 1 5 - 1、1 - 1 5 - 2、1 - 1 5 - 3、3 - 1 5 - 1、1 - 1 5 - 4、4 - 1 5 - 1、2 - 1 5 - 2、2 - 1 5 - 3、3 - 1 5 - 2、2 - 1 5 - 4、4 - 1 5 - 2 及び 3 - 1 5 - 3 ギャップマーからなる群から選択される、F - G - F' デザインが挙げられる。

【0218】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、16ヌクレオシドを含むギャップ、10 例えば 1 - 1 6 - 1、2 - 1 6 - 1、1 - 1 6 - 2、1 - 1 6 - 3、3 - 1 6 - 1、1 - 1 6 - 4、4 - 1 6 - 1、2 - 1 6 - 2、2 - 1 6 - 3、3 - 1 6 - 2、2 - 1 6 - 4、4 - 1 6 - 2 及び 3 - 1 6 - 3 ギャップマーからなる群から選択される、F - G - F' デザインが挙げられる。30

【0219】

この性質の特異的ギャップマー・デザインとしては、17ヌクレオシドを含むギャップ、10 例えば 1 - 1 7 - 1、2 - 1 7 - 1、1 - 1 7 - 2、1 - 1 7 - 3、3 - 1 7 - 1、1 - 1 7 - 4、4 - 1 7 - 1、2 - 1 7 - 2、2 - 1 7 - 3 及び 3 - 1 7 - 2 ギャップマーからなる群から選択される、F - G - F' デザインが挙げられる。

【0220】

全ての例において、F - G - F' デザインは、領域 D' 及び / 又は D'' を更に含み、領域 D' 及び / 又は D'' 、1、2 又は 3 ヌクレオシド単位（例えば、DNA 単位（例えば、2 ホスホジエステル連結 DNA 単位を有しうる。領域 F 及び F' のヌクレオシドは修飾ヌクレオシドであることが好ましく、領域 G のヌクレオチドは好ましくは未修飾ヌクレオシドである。40

【0221】

各デザインにおいて、好ましい修飾ヌクレオシドは LNA である。

【0222】

別の実施形態において、ギャップマー内のギャップ中の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート及び / 又はボラノホスフェート結合である。別の実施形態において、ギャップマー内の側面（F 及び F' 領域）中の全てのヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート及び / 又はボラノホスフェート結合である。別の好ましい実施形態において、ギ 50

ヤップマー中のD'及びD''領域における全てのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合である。

【0223】

本明細書中に開示されている特異的ギャップマーに関して、シトシン(C)部分が5-メチル-シトシンとして注釈されている場合、様々な実施形態において、オリゴヌクレオチド中に存在するCの1つ以上が、非修飾C部分でありうる。

【0224】

特定の実施形態において、ギャップマーは、参照により本明細書に援用されている国際公開第2008/113832号パンフレットに記載のいわゆるショートマーである。

【0225】

更なるギャップマーデザインは、国際公開第2004/046160号パンフレット、国際公開第2007/146511号パンフレットに開示されており、これらは、参照により援用されている。

【0226】

本発明の或る実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：5_1～743_1及び771_1のオリゴヌクレオチド化合物からなる群から選択される。

【0227】

本発明の或る実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号6_1、8_1、9_1、13_1、41_1、42_1、58_1、77_1、92_1、111_1、128_1、151_1、164_1、166_1、169_1、171_1、222_1、233_1、245_1、246_1、250_1、251_1、252_1、256_1、272_1、273_1、287_1、292_1、303_1、314_1、318_1、320_1、324_1、336_1、342_1、343_1、344_1、345_1、346_1、349_1、359_1、360_1、374_1、408_1、409_1、415_1、417_1、424_1、429_1、430_1、458_1、464_1、466_1、474_1、490_1、493_1、512_1、519_1、519_1、529_1、533_1、534_1、547_1、566_1、567_1、578_1、582_1、601_1、619_1、620_1、636_1、637_1、638_1、640_1、645_1、650_1、651_1、652_1、653_1、658_1、659_1、660_1、665_1、678_1、679_1、680_1、682_1、683_1、684_1、687_1、694_1、706_1、716_1、728_1、733_1、734_1、及び735_1であるオリゴヌクレオチド化合物からなる群から選択される。

【0228】

本発明の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：287_1である。

【0229】

本発明の別の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：342_1である。

【0230】

本発明の別の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：640_1である。

【0231】

本発明の別の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：466_1である。

【0232】

本発明の別の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CMP-ID番号：566_1である。

【0233】

本発明の更なる実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド・モチーフ及びオリゴ

10

20

30

30

40

50

スクレオチド化合物の連続スクレオチド配列は、2～4の付加的なホスホジエステルの連結スクレオシド5'末端に、連続スクレオチド配列（例えば、領域D'）を含む。一実施形態において、スクレオシドは、生体開裂性リンカー（「生体開裂性リンカー」の節を参照）としての役目を果たす。好ましい実施形態において、c a（シチジン-アデノシン）ジスクレオチドは、ホスホジエステル結合を介して連続スクレオチド配列（すなわち、表5に列挙されたモチーフ配列又はオリゴスクレオチド化合物のいずれか1つ）の5'末端に連結される。好ましい実施形態において、二本鎖スクレオチドは、連続スクレオチドのリマインダが相補的である位置にて、標的配列に相補的ではない。

【0234】

本発明の幾つかの実施形態において、オリゴスクレオチド又は連続スクレオチド配列は、配列番号：766、767、768、769及び770スクレオチドのモチーフ配列からなる群から選択される。 10

【0235】

本発明の幾つかの実施形態において、オリゴスクレオチドは、CMP-ID番号766_1、767_1、768_1、769_1及び770_1のオリゴスクレオチド化合物からなる群から選択される。

【0236】

炭水化物結合部分

炭水化物結合部分は、ガラクトース、ラクトース、n-アセチルガラクトサミン、マンノース及びマンノース-6-リン酸が挙げられるが、これらに限定されない。炭水化物コンジュゲートは、肝臓及び／もしくは筋肉のような或る範囲の組織における送達又は活性を増強するために使用できる。例えば、欧州特許第1495769号明細書、国際公開第99/65925号パンフレット、Yang et al., Bioconjug Chem (2009) 20(2): 213-21.Zatsepin & Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17を参照のこと。 20

【0237】

幾つかの実施形態において、炭水化物結合部分は多価であり、例えば、2、3もしくは4個の同一又は非同一の炭水化物部分が、任意で、リンカーよりはリンカーを介してオリゴスクレオチドに共有結合可能である。幾つかの実施形態において、本発明は、本発明のオリゴスクレオチドと炭水化物結合部分とを含む、コンジュゲートを提供するものである。 30

【0238】

幾つかの実施形態において、結合部分は、マンノースもしくはマンノース-6-リン酸であるか又はそれらを含む。これは、筋肉細胞を標的化するうえで特に有用である（例えば、米国特許出願公開第2012/122801号明細書を参照のこと）。

【0239】

アシアロ糖タンパク質受容体（ASGPr）に結合できる結合部分は、肝臓内で肝細胞を標的化するうえで特に有用である。幾つかの実施形態において、本発明は、本発明のオリゴスクレオチドとアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分とを含む、オリゴスクレオチドコンジュゲートを提供するものである。アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、ガラクトースの親和性以上の親和性でアシアロ糖タンパク質受容体（ASGPr結合炭水化物部分）に結合できる1つ以上の炭水化物部分を含む。多数のガラクトース誘導体に関して、アシアロ糖タンパク質受容体に対する親和性が研究されてきた（例えば、Jobs, S.T. 及びDrickamer, K. JB.C.1996, 271, 6686を参照）。つまり、これらの親和性は当該技術分野において典型的な方法を使用して容易に判別されている。 40

【0240】

本発明の一態様は、a) PDL1標的核酸に対して少なくとも90%の相補性を有する長さが10～30スクレオチドの連続スクレオチド配列を含むオリゴスクレオチド（領域A）と；b) a)においてオリゴスクレオチドに共有結合した少なくとも1つのアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分（領域C）と；を含む、アンチセンスオリゴスクレオチドコンジュゲートである。オリゴスクレオチド又は連続スクレオチド配列は、「本発明のオリゴスクレオチド」、「オリゴスクレオチドデザイン」及び「ギャップマーデザイ 50

ン」の節のいずれかに記載されているようにすることができる。

【0241】

幾つかの実施形態において、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、ガラクトース、ガラクトサミン、N-ホルミル-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-プロピオニル-ガラクトサミン、N-n-ブタノイル-ガラクトサミン及びN-イソブタノイルガラクトサミンからなる群から選択される少なくとも1つのASPGr結合炭水化物部分を含む。幾つかの実施形態において、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、1価、2価、3価又は4価である(すなわち、アシアロ糖タンパク質受容体に結合できる1、2、3もしくは4個の末端炭水化物部分を含む)。アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、2価、更により好ましくは3価である。好ましい実施形態において、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、1~3個のN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分(GalNAcコンジュゲートとも呼ばれる)を含む。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、3価N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分であるアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分を含む。GalNAcコンジュゲートは、ホスホジエステル、メチルホスホネート及びPNAアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、米国特許第5,994,517号明細書、及びHangeland et al., Bioconjug Chem. 1995 Nov-Dec; 6(6): 695-701, Biessen et al 1999 Biochem J. 340, 783-792、及びMaier et al 2003 Bioconjug Chem 14, 18-29)、siRNA(例えば、国際公開第2009/126933号パンフレット、国際公開第2012/089352号パンフレット、及び国際公開第2012/083046号パンフレット)、ならびにLNA及び2'-MOE修飾ヌクレオシドと併用されてきた(国際公開第2014/076196号パンフレット、国際公開第2014/207232号パンフレット、及び国際公開第2014/179620号パンフレット)。これらの文献は、本明細書中に参照により援用されている。

【0242】

アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分を生成するには、ASPGr結合性炭水化物部分(好ましくは、GalNAc)は、糖類のC-1炭素を介して分岐分子に結合している。ASPGr結合炭水化物部分は、スペーサーを介して分枝分子に連結されているのが好ましい。スペーサーとして好ましいのは、可撓性の親水性スペーサーである(U.S. Patent 5885968; Biessen et al. J. Med. Chern. 1995 Vol. 39 p. 1538-1546)。好ましい可撓性の親水性スペーサーは、PEGスペーサーである。好ましいPEGスペーサーは、PEG3スペーサー(3つのエチレン単位)である。分枝分子は、2つ又は3つの末端のASPGr結合炭水化物部分の結合を可能にし、更に分岐点のオリゴヌクレオチドへの結合を可能にする任意の小分子であります。典型的な分岐分子はジリジンである。ジリジン分子は、3つのASPGr結合炭水化物部分が結合できる3つのアミン基と、ジリシンがオリゴヌクレオチドに結合できるカルボキシル反応基と、を含む。代替的な分枝分子は、Glen Researchによって供給されるもののようなダブラー又はトレブラーであってもよい。幾つかの実施形態において、プランチャーは、1,3-ビス-[5-(4,4'-ペニチルアミド)プロピル-2-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]ホスホラミダイト(Glen Researchカタログ番号:10-1920-xx)、トリス-2,2,2-[3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルオキシメチル]エチル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Researchカタログ番号:10-1922-xx)、トリス-2,2,2-[3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルオキシメチル]メチレンオキシプロピル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト及び1-[5-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルオキシメチル]メチレンオキシプロピル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト及び1-[5-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルオキシメチル]メチレンオキシプロピル-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホラミダイト(Glen Researchカタログ番号:10-1925-xx)からなる群から選択できる。国際公開第2014/179620号パンフレット及び国際出願PCT/EPI5/073331号明細書には、様々なGal

10

20

30

40

50

N A c 結合部分の生成が記述されており、これらの文献は、本明細書中で参照により援用されている。分岐分子とオリゴヌクレオチドとの間には、1以上のリンカーが挿入される場合がある。好ましい実施形態において、リンカーは生体開裂性リンカーである。リンカーは、「リンカー」及びそのサブセクションに記載されているリンカーから選択できる。

【0243】

アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分、特にG a l N A c 結合部分は、当該技術分野において公知の方法を用いてオリゴヌクレオチドの3'又は5'末端に付着させることができる。好ましい実施形態において、アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分は、オリゴヌクレオチドの5'末端に連結されている。

【0244】

s i R N A の送達に関する薬物動態調節剤は、国際公開第2012/083046号パンフレットに記載されている（本明細書において参考により援用されている）。幾つかの実施形態において、炭水化物結合部分は、16個以上の炭素原子を有する疎水性基、16~20個の炭素原子を有する疎水性基、パルミトイール、ヘキサデカ-8-エノイル、オレイル、(9E、12E)-オクタデカ-9,12ジエノイル、ジオクタノイル及びC16-C20アシル及びコレステロールからなる群から選択される薬物動態学的調節物質を含む。好ましい実施形態において、炭水化物結合部分を含有する薬物動態学的調節物質は、G a l N A c コンジュゲートである。

【0245】

炭水化物結合部分は、1~3個の末端のA S P G r 結合炭水化物部分、好ましくはN-アセチルガラクトサミン部分を含むのが好ましい。幾つかの実施形態において、炭水化物結合部分は、スペーサーを介して分枝分子に連結された3つのA S P G r 結合炭水化物部分、好ましくはN-アセチルガラクトサミン部分を含む。スペーサー分子は、8~30原子の長さでありうる。好ましい炭水化物結合部分は、P E Gスペーサーを介してジ-リジン分枝分子に連結された3つの末端G a l N A c 部分を含む。P E Gスペーサーとして好ましいのは、3 P E Gスペーサーである。好適なアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分を、図1に示す。好ましいアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分を、図3に示す。

【0246】

他のG a l N A c 結合部分としては、例えば、T y r - G l u - G l u - (アミノヘキシリG a l N A c) 3 (Y E E (a h G a l N A c) 3)のような結合したG a l N A c 部分を有する小ペプチド；肝細胞上のアシアロ糖タクパク質受容体に結合する糖トリペプチド（例えば、Duff, et al., Methods Enzymol., 2000, 313, 297参照）；リジンベースのガラクトース集落(L3G4; Biessen, et al., Cardovasc. Med., 1999, 214)；及びコランベースのガラクトース集落（例えば、アシアロ糖タンパク質受容体の糖認識モチーフ）を挙げることができる。

【0247】

本発明の幾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コンジュゲートは、以下のCPM ID番号：766_2、767_2、768_2、769_2及び770_2からなる群から選択される。

【0248】

好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、図4に図示されている化合物に対応している。

【0249】

別の好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、図5に図示されている化合物に対応している。

【0250】

別の好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、図6に図示されている化合物に対応している。

【0251】

10

20

30

40

50

別の好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、図7に図示されている化合物に対応している。

【0252】

別の好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、図8に図示されている化合物に対応している。

【0253】

リンカー

生体開裂性リンカー（領域B）

コンジュゲートの使用は、多くの場合、薬物動態特性又は薬力学的動的特性の増強に関連する。しかし、結合部分が存在する場合は、例えば、ハイブリダイゼーション又はヌクレアーゼ補充（例えば、RNアーゼH）を防止する立体障害を介して、意図された標的オリゴヌクレオチドの活性が妨げられる可能性がある。オリゴヌクレオチド（領域A又は第1領域）と結合部分（領域C又は第3領域）との間に生理学的に易変的な結合（生体開裂性リンカー）を使用することにより結合部分の存在による特性の改善が可能となる一方、いったん標的組織において結合基がオリゴヌクレオチドの有効な活性を妨げないことが保証される。

【0254】

易変的な結合を含む分子が適切な細胞内又は細胞外環境に到達すると、生理的に易変的な結合は自発的に生じる。例えば、分子が酸性化エンドソームに進入した際には、pH易変的な結合が開裂される場合がある。したがって、pH易変的な結合は、エンドソーム開裂可能な結合であると見なすことができる。酵素開裂可能な結合は、エンドソーム又はリソソーム又は細胞質に存在する酵素などの酵素に曝露されたときに開裂される場合がある。分子が細胞質の高還元性の環境に進入すると、ジスルフィド結合が開裂される場合がある。したがって、ジスルフィドを、細胞質の開裂可能な結合であると見なすことができる。本明細書において、pH易変的な結合は、酸性条件下（pH < 7）で選択的に破壊される易変的な結合である。細胞エンドソーム及びリソソームは7未満のpHを有するので、そのような結合は、エンドソーム的に易変的な結合とも呼ばれる場合がある。

【0255】

標的化送達のための結合部分と会合した生体開裂性リンカーについては、標的組織（例えば、筋肉、肝臓、腎臓又は腫瘍）に見られる開裂速度が血清中に見られるものよりも大きいことが好ましい。S1ヌクレアーゼによる血清又は開裂に対する標的組織における開裂レベル（%）を定量するための好適な方法は、「材料と方法」の節に記載されている。幾つかの実施形態において、生体開裂性リンカー（生理学的に易変的なリンカー、又はヌクレアーゼ感受性リンカーもしくは領域Bとも呼ばれる）は、標準と比較して、少なくとも約20%、例えば少なくとも約30%、例えば少なくとも約40%、少なくとも約50%、例えば少なくとも約60%、例えば少なくとも約70%、例えば少なくとも約75%開裂されている。

【0256】

幾つかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、3つの領域：i) 標的核酸に相補的な10～25個の連続ヌクレオチドを含む第1の領域（領域A）と、ii) 生体開裂性リンカーを含む第2の領域（領域B）と、iii) アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分のような結合部分を含む第3の領域（領域C）と、を含み、第3の領域は、第1領域に共有結合された第2領域に共有結合している。

【0257】

本発明の一実施形態において、オリゴヌクレオチドコンジュゲートは、連続ヌクレオチド配列（領域A）及びアシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分（領域C）との間に、生体開裂性リンカー（領域B）を含む。

【0258】

幾つかの実施形態において、生体開裂性リンカーは、標的核酸（領域A）に相補的な隣接するヌクレオチドの5'末端及び/又は3'末端のいずれかに位置しうる。好ましい実

10

20

30

40

50

施形態において、生体開裂性リンカーは、5'末端にある。

【0259】

幾つかの実施形態において、開裂可能なリンカーは、例えば、標的細胞において発現されるうるヌクレアーゼに感受性である。幾つかの実施形態において、生体開裂性リンカーは、2~5個の連続ホスホジエステル結合で構成されている。リンカーは、ホスホジエステル結合ヌクレオシドの短い領域（例えば、リンカーの定義に詳述されているように1~10）であってもよい。幾つかの実施形態において、生体開裂性リンカー領域B中のヌクレオシドは、（任意で独立に）ヌクレアーゼの開裂を妨害しないDNA及びRNA又はその修飾物からなる群から選択される。ヌクレアーゼの開裂を妨げないDNA及びRNAヌクレオシドの修飾は、天然に存在しない核酸塩基でありうる。特定の糖修飾ヌクレオシドはまた、-L-オキシ-LNAのようなヌクレアーゼの開裂を可能にしうる。幾つかの実施形態において、領域Bの全てのヌクレオシドは、2'-OHリボース糖（RNA）又は2'-H糖（すなわち、RNA又はDNA）のいずれかを（任意で独立に）含む。¹⁰ 好ましい実施形態において、領域Bの少なくとも2つの連続ヌクレオシドは、DNA又はRNAヌクレオシド（少なくとも3もしくは4もしくは5連続DNA又はRNAヌクレオチドなど）である。更により好ましい実施形態において、領域Bのヌクレオシドは、領域Bが、1~5又は1~4の（例えば2、3、4連続ホスホジエステル連結DNAヌクレオシド）からなるDNAヌクレオシドであることが、好ましい。好ましい実施形態において、領域Bは、RNAアーゼHが補充されないほど短尺である。幾つかの実施形態において、領域Bは、3個以下もしくは4個以下の連続ホスホジエステル連結DNA及び/又はRNAヌクレオシド（例えばDNAヌクレオシド）を含む。²⁰

【0260】

領域Bがホスホジエステル結合ヌクレオシドで構成される場合、領域A及びBは一体的に領域Cに連結されたオリゴヌクレオチドを形成する場合がある。この文脈において、領域Aは領域Bと区別することができ、領域Aは少なくとも1つ、標的核酸（例えば、2'置換糖部分を有するLNA又はヌクレオシド）及び領域Aに対する結合親和性が増強された2つの修飾ヌクレオシドは、それ自体で関連細胞系統における標的核酸の発現を調節できる。そのうえ、領域AがDNA又はRNAヌクレオシドを含む場合、これらヌクレオシドは、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシド間結合、例えばホスホロチオエートもしくはボラノホスフェートと連結される。他方、領域Bは、DNA又はRNAヌクレオシド間のリン酸エステル結合を含む。幾つかの実施形態において、領域Bは、標的核酸と相補的ではないか、又は少なくとも50%のミスマッチを含む。³⁰

【0261】

幾つかの実施形態において、領域Bは、標的核酸配列に対して相補的でないか、又は領域A内の標的核酸に相補的な連結ヌクレオチドに対して相補的でない。

【0262】

幾つかの実施形態において、領域Bは、標的核酸配列と相補的である。この点で、領域A及び領域Bは一緒になって、標的配列に対して相補的な单一の連続配列を形成しうる。

【0263】

本発明の幾つかの態様において、第1の領域（領域A）と第2の領域（領域B）との間のヌクレオシド間結合は、第2の領域の一部と見なして差し支えない。⁴⁰

【0264】

幾つかの実施形態において、領域Bの塩基配列は、標的組織又は細胞又は亜細胞の区画に存在する主要なエンドヌクレアーゼの開裂酵素に基づいて、最適なエンドヌクレアーゼの開裂部位を提供するように選択される。この点に関して、標的組織及び非標的組織から細胞抽出物を単離することによって、領域Bで使用するためのエンドヌクレアーゼの開裂配列は、非標的細胞（例えば、腎臓）と比較した所望の標的細胞（例えば、肝臓/肝細胞）内での優先的な開裂活性に基づいて選択できる。これに関して、標的下方制御の化合物の効力は、所望の組織/細胞に対して最適化されうる。

【0265】

幾つかの実施形態において、領域Bは、配列A A、A T、A C、A G、T A、T T、T C、T G、C A、C T、C C、C G、G A、G T、G C又はG Gのジヌクレオチドを含み、Cは5-メチルシトシンである場合があり、且つ／あるいはTはUで置換可能であり、ヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合が好ましい。幾つかの実施形態において、領域Bは、配列A A A、A A T、A A C、A A G、A T A、A T T、A T C、A T G、A C A、A C T、A C C、A C G、A G A、A G T、A G C、A G G、T A A、T A T、T A C、T A G、T T A、T T T、T T C、T A G、T C A、T C T、T C C、T C G、T G A、T G T、T G C、T G G、C A A、C A T、C A C、C A G、C T A、C T G、C T C、C T T、C C A、C C T、C C C、C C G、C G A、C G T、C G C、C G G、G A A、G A T、G A C、C A G、G T A、G T T、G T C、G T G、G C A、G C T、G C C、G C G、G G A、G G T、G G C、及びG G Gトリヌクレオチドを含み、Cは5-メチルシトシンである場合があり、且つ／あるいはTはUで置換可能であり、ヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合であるのが好ましい。幾つかの実施形態において、領域Bは、配列A A A X、A A T X、A A C X、A A G X、A T A X、A T T X、A T C X、A T G X、A C A X、A C T X、A C C X、A C G X、A G A X、A G T X、A G C X、A G G X、T A A X、T A T X、T A C X、T A G X、T T A X、T T T X、T T C X、T A G X、T C A X、T C T X、T C C X、T C G X、T G A X、T G T X、T G C X、T G G X、C A A X、C A T X、C A C X、C A G X、C T A X、C T G X、C T C X、C T T X、C C A X、C C T X、C C C X、C C G X、C G A X、C G T X、C G C X、C G G X、G A A X、G A T X、G A C X、C A G X、G T A X、G T T X、G T C X、G T G X、G C A X、G C T X、G C C X、G C G X、G G A X、G G T X、G G C X、及びG G G Xのトリヌクレオチドを含み、Xは、A、T、U、G、C及びこれらの類縁体からなる群から選択可能であり、Cは5-メチルシトシンである場合があり、且つ／あるいはTはUで置換可能である。ヌクレオシド間結合はホスホジエステル結合であることが、好ましい。(天然起源の)核酸塩基A、T、U、G、Cに言及する場合、これらは同等の天然核酸塩基(例えば、相補的ヌクレオシドとの塩基対)として機能する核酸塩基類似体で置換可能であることが認識される。

【0266】

他のリンカー(領域Y)

リンカーは、少なくとも2つの官能性基(一方はオリゴヌクレオチドに結合し、他方は結合部分に結合する)を有する場合がある。例示的なリンカー官能基は、オリゴヌクレオチド又は結合部分上の求核性基と反応するために求電子性である場合もあれば、あるいは求電子性基と反応するための求核性である場合もある。幾つかの実施形態において、リンカー官能基としては、ホスホロチオエート、ホスフェート、ホスファイト、不飽和(例えば、二重又は三重結合)などが挙げられるが、これらに限定されない。幾つかの例示的なリンカー(領域Y)としては、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸(A D O)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S M C C)、6-アミノヘキサン酸(A H E X又はA H A)、6-アミノヘキシリオキシ、4-アミノ酪酸、4-アミノシクロヘキシリカルボン酸、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシ-(6-アミド-カプロン酸)(L C S M C C)、スクシンイミジルm-マレイミド-ベンゾイルエート(M B S)、スクシンイミジルN-e-マレイミド-カプロイル酸(E M C S)、スクシンイミジル6-(ベータ-マレイミド-プロピオニアミド)ヘキサノエート(S M P H)、スクシンイミジルN-(マレイミドアセテート)(A M A S)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(S M P B)、-アラニン(-A L A)、フェニルグリシン(P H G)、4-アミノシクロヘキサン酸(A C H C)、-(シクロプロピル)アラニン(-C Y P R)、アミノドデカン酸(A D C)、アリレンジオール、ポリエチレンリコール、アミノ酸等が挙げられる。幾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C 2-C 3 6アミノアルキル基、例えばC 6-C 1 2アミノアルキル基を含む。好ましい実施形態において、リンカー(領域Y)は、C 6アミノアルキ

10

20

30

40

50

ル基である。アミノアルキル基は、標準オリゴヌクレオチド合成の一部として、例えば保護されたアミノアルキルホスホルアミダイト等を使用して、オリゴヌクレオチド（領域A又は領域A-B）に添加できる。アミノアルキルとオリゴヌクレオチドとの間の連結基は、例えば、ホスホロチオエート又はホスホジエステル、又は本明細書中で言及される他のヌクレオシド連結基の1つでありうる。アミノアルキル基は、オリゴヌクレオチドの5'又は3'末端に共有結合している。市販のアミノアルキルリンカーは、例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端における連結のための、及びオリゴヌクレオチドの5'末端における連結のための3'-アミノ修飾試薬である5'-アミノ修飾酵素C6が利用可能である。これらの試薬は、Glen Research Corporation (Sterling, Va.) から入手可能である。これらの化合物又は類似のものは、フルオレセインをオリゴヌクレオチドの5'末端に連結することを目的に、Krieg, et al, Antisense Research and Development 1991, 1, 161によって利用された。多種多様な更なるリンカー基が当該技術分野において知られており、オリゴヌクレオチドへの結合部分の結合に有用でありうる。有用なリンカー基の多くに関する総説は、例えば、Antisense Research and Applications, S. T. Crooke and B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, p. 303-350に見出される。アクリジンのような他の化合物は、ポリメチレン結合を介してオリゴヌクレオチドの3'末端リン酸基に結合している (Asseline, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1984, 81, 3297)。上記の基は全ていずれも、単一のリンカー（領域Y）として、又は1つ以上の更なるリンカー（領域Y-Y'又は領域Y-BもしくはB-Y）と組み合わせて使用できる。

【0267】

リンカー、及びオリゴヌクレオチドのコンジュゲート調製時のリンカーの使用は、国際公開第96/11205号パンフレット、国際公開第98/52614号パンフレット、米国特許第4,948,882号明細書、同第5,525,465号明細書、同第5,541,313号明細書、同第5,545,730号明細書、同第5,552,538号明細書、同第5,580,731号明細書、同第5,486,603号明細書、同第5,608,046号明細書、同第4,587,044号明細書、同第4,667,025号明細書、同第5,254,469号明細書、同第5,245,022号明細書、同第5,112,963号明細書、同第5,391,723号明細書、同第5,510475号明細書、同第5,512,667号明細書、同第5,574,142号明細書、同第5,684,142号明細書、同第5,770,716号明細書、同第6,096,875号明細書、同第6,335,432号明細書及び同第6,335,437号明細書、ならびに国際公開第2012/083046号パンフレットにおける当該技術分野を通じて提供されており、これらの各出願はその全容が参照により援用されている。

【0268】

製造方法

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を製造する方法を提供するものであり、この製法は、ヌクレオチド単位を反応させ、それにより、そのオリゴヌクレオチド内に含有されている共有結合の連続ヌクレオチド単位を形成することを含む。この方法は、ホスホラミダイト化学を使用するものであることが、好ましい（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、本方法は、連続ヌクレオチド配列を結合部分（リガンド）と反応させることを、更に含む。更なる態様では、本発明のオリゴヌクレオチドもしくは結合オリゴヌクレオチドを、医薬的に許容される希釈剤、溶媒、担体、塩及び/又は補助剤と混合することを含む、本発明の組成物の製造方法が提供されている。

【0269】

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及び/又はオリゴヌクレオチドコンジュゲート、ならびに医薬的に許容される希釈剤、溶媒、担体、塩及び/又は補助剤のいずれかを含む、医薬組成物を提供するものである。医薬的に許容される希釈剤としては、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。医薬的に許容される塩として

10

20

30

40

50

は、限定されるものではないが、ナトリウム塩及びカリウム塩が挙げられる。幾つかの実施形態において、医薬的に許容される希釈剤は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水である。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、医薬的に許容される希釈剤中に 50 ~ 300 μM の濃度で使用される。

【0270】

本発明において用いるのに好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見出される。薬物送達方法の概略的な総説については、例えば、Langer (Science 249; 1527-1533, 1990) を参照のこと。国際公開第 2007 / 031091 号パンフレットには、医薬的に許容される希釈剤、担体、及び補助剤の更なる好適且つ好ましい例が提供されている（本明細書において参照により援用されている）。好適な投薬量、製剤、投与経路、組成物、剤形、他の治療剤との併用、プロドラッグ製剤はまた、国際公開第 2007 / 031091 号パンフレットに記載されている。10

【0271】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、医薬的に許容される活性物質、又は医薬組成物もしくは製剤の調製用の不活性物質と混合できる。医薬組成物の製剤用の組成物及び方法は、限定されないが、投与経路、疾患の程度、又は投与されるべき用量を含む多くの基準に依存する。

【0272】

これらの組成物は、従来の滅菌技術で滅菌することも、あるいは滅菌濾過することもできる。結果として得られた水溶液は、そのまま使用するためにパッケージングしてもよく、又は凍結乾燥してもよく、凍結乾燥製剤を投与前に滅菌水性担体と組み合わせてもよい。調製物の pH は、典型的には 3 ~ 11、より好ましくは 5 ~ 9 又は 6 ~ 8、最も好ましくは 7 ~ 8（例えば、7 ~ 7.5）である。固体形態で得られた組成物は、各々が錠剤又はカプセルの密封パッケージのような固定量の上記薬剤を含有する複数の単回投与単位でパッケージングできる。固体形態の組成物はまた、局所的に塗布可能なクリーム又は軟膏用に設計された絞り出しチューブ等の、柔軟量の容器中にパッケージングできる。20

【0273】

幾つかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、プロドラッグである。特に、オリゴヌクレオチドコンジュゲートに関して、プロドラッグが作用部分（例えば標的細胞）に送達されると、結合部分はオリゴヌクレオチドから開裂される。30

【0274】

用途

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、例えば、診断薬、治療薬及び予防用の研究試薬として利用できる。

【0275】

研究では、このようなオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いて、細胞（例えば、インビトロ細胞培養物）及び実験動物における P D - L 1 タンパク質の合成を特異的に調節し、それにより、治療介入の標的として標的の機能解析又はその有用性の評価を促進する。標的調節は典型的に、タンパク質を産生する m R N A を分解又は阻害し、それによりタンパク質形成を妨げるか、又はタンパク質を産生する遺伝子もしくは m R N A の調節物質を分解、又は阻害することによって達成される。40

【0276】

研究又は診断において本発明のオリゴヌクレオチドを使用する場合、標的核酸は、D N A もしくは R N A 由来の c D N A 又は合成核酸であってよい。

【0277】

本発明は、P D - L 1 を発現する標的細胞における P D - L 1 の発現を調節するためのインビオ又はインビトロ方法であって、前記方法が、有効量の本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートを前記細胞に投与することを含む方法を提供す50

るものである。

【0278】

幾つかの実施形態において、標的細胞は、哺乳動物細胞、特にヒト細胞とされる。標的細胞は、インビトロ細胞培養物としてもよいし、あるいは哺乳動物の組織の一部を形成するインビボ細胞としてもよい。好ましい実施形態において、標的細胞は肝臓に存在する。肝細胞標的細胞は、実質細胞（例えば、肝細胞）、ならびにKupffer細胞、LSECs、星状細胞（又はIto細胞）、胆管細胞、及び肝臓関連白血球（T細胞及びNK細胞を含む）等の非実質細胞から選択できる。幾つかの実施形態において、標的細胞は抗原提示細胞である。抗原提示細胞は、その表面上に、主要組織適合複合体（MHC）クラスI又はクラスIIと複合化した外来抗原を提示する。幾つかの実施形態において、抗原提示細胞は、MHCクラスII（すなわち、樹状細胞、マクロファージ及びB細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞）を発現する。10

【0279】

診断の際には、オリゴヌクレオチドを使用して、ノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション又は類似の技術により、細胞及び組織におけるPD-L1発現を検出して定量できる。

【0280】

本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲート、又はそれらの医薬組成物は、疾患もしくは障害を有する疑いのある動物又はヒトに投与することができ、その疾患もしくは障害は、PD-L1の発現を低減させることによって、特に肝臓標的細胞におけるPD-L1の発現を低減させることによって、緩和又は処置できる。20

【0281】

本発明は、治療上もしくは予防上有効な量の本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物を、疾患に罹患しているかもしくは罹患しがちな被験者に投与することを含む、疾患の治療又は防止方法を提供する。

【0282】

また、本発明は、薬品として使用するための、本発明のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物に関する。

【0283】

本発明によるオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物は、典型的に有効量で投与される。30

【0284】

本発明はまた、本明細書中で言及されている疾患又は障害を治療するための医薬品の製造に関して記載されている、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もしくは医薬組成物の使用を提供する。一実施形態において疾患は、a) HBV、HCV及びHDVなどのウイルス性肝炎感染；b) マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症及びトリパノソーマ症などの寄生虫感染；ならびにc) 肝臓癌又は肝臓における転移である。

【0285】

一実施形態において、本発明は、ウイルス感染症もしくは寄生虫感染症から選択される疾患又は障害の治療に使用するためのオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物に関する。更なる実施形態において、疾患は、a) HBV、HCV及びHDVなどのウイルス性肝炎感染；b) マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症及びトリパノソーマ症などの寄生虫感染；ならびにc) 肝臓癌又は肝臓における転移から選択される。40

【0286】

本明細書中で言及されている疾患又は障害は、免疫疲弊に関連する。特に疾患又は障害は、ウイルス特異的T細胞応答の疲弊と関連している。幾つかの実施形態において、疾患又は障害はPD-L1発現の低減によって緩和又は処置できる。

【0287】

10

20

30

40

50

本発明の方法は、免疫疲弊に関連する疾患に対する治療又は予防の目的に使用されるのが好ましい。

【0288】

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、オリゴヌクレオチドコンジュゲートもしくは医薬組成物は、肝臓癌又は肝臓の転移に対する免疫応答の回復に使用される。

【0289】

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、オリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物は、病原体に対する免疫応答の回復に使用される。幾つかの実施形態において、病原体は肝臓に見出すことができる。病原体は、ウイルス又は寄生虫、特に、本明細書に記載されるものでありうる。好ましい実施形態において、病原体はH B Vである。10

【0290】

本発明は更に、本明細書中に記載のウイルスもしくは寄生虫感染に対する免疫回復用の薬品製造を目的とした、本明細書中に定義されているオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物の使用に関する。

【0291】

本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物は、ウイルス感染、特にPD-1経路に影響を与える肝臓におけるウイルス感染の治療に使用できる（例えば、Kapoor及びKottilil 2014 Future Virol Vol. 9 pp. 565-585、ならびにSalem及びEl-Badawy 2015 World J Hepatol Vol. 7 pp. 2449-2458を参照）。ウイルス性肝炎感染は、肝炎ウイルス、特にH B V、H C V及びH D V、特にこれらの感染の慢性形態からなる群から選択できる。一実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物はH B V、特に慢性H B Vの治療を目的に使用される。慢性H B V感染の指標は、高レベルのウイルス負荷（H B V DNA）であり、循環系において（ウイルス粒子を100倍超過する）より高レベルの空H B s抗原粒子である。20

【0292】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートはまた、H I Vとの共感染症として発症するウイルス性肝炎感染の治療を目的に使用することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物で治療できる他のウイルス感染は、1 c m v（リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス）、ならびに単感染としてのH I V、H S V - 1、H S V - 2、及び他のヘルペスウイルスである。これらのウイルスは、肝栄養性ではないが、P D L 1下方制御に対する感受性がある可能性がある。

【0293】

幾つかの実施形態において、免疫もしくは免疫応答の回復は、T細胞及び/又はN K細胞応答の改善、ならびに/あるいはT細胞枯渇の緩和を含み、特に、H B V特異的T細胞応答、H C V特異的T細胞応答、ならびに/あるいはH D V特異的T細胞応答が回復する。T細胞応答の改善は、例えば、対照（処置前のレベル又はビヒクリル処置済の被験者におけるレベル等）と比較して、肝臓内でのT細胞の増加（特に、C D 8 + 及び/もしくはC D 4 + T細胞の増加）として評価できる。更なる実施形態において、ウイルス特異的C D 8 + T細胞は、対照と比較して回復又は増加し、特に、H B V特異的C D 8 + T細胞又はH C V特異的C D 8 + T細胞又はH D V特異的C D 8 + T細胞は、対照と比較して回復又は増加する。好ましい実施形態において、H B V s抗原（H B s抗原）に特異的なC D 8 + T細胞、及び/もしくはH B V e抗原（H B e抗原）に特異的なC D 8 + T細胞、及び/もしくはH B Vコア抗原（H B c A g）に特異的なC D 8 + T細胞は、（I F N - ）又は腫瘍壞死因子（T N F - ）のオリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドコンジュゲート又は医薬組成物を投与することを含む。H B V抗原特異的C D 8 + T細胞は、インターフェロン（I F N - ）又は腫瘍壞死因子（T N F - ）のような、1つ以4050

上のサイトカインを産生するのが、好ましい。上記の C D 8 + T 細胞の増加は、特に肝臓において観察される。本明細書中に記載されている増加は、対照と比較して統計的に有意であるべきである。この増加は、対照と比較して、少なくとも 20 %、例えば 25 %、例えば 50 %、例えば 75 % であるのが、好ましい。別の実施形態において、ナチュラルキラー（N K）細胞 及び / 又はナチュラルキラー-T（N K T）細胞は、本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートによって活性化される。

【 0 2 9 4 】

本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は医薬組成物は、寄生虫感染症、特に、P D - 1 経路に影響を与える寄生虫感染症の治療に使用できる（例えば、Bhadra et al. 2012 J Infect Dis vol 206 pp. 125-134 ; Bhadra et al. 2011 Proc Natl Acad Sci U S A Vol. 108 pp. 9196-9201 ; Esch et al. J Immunol vol 191 pp 5542-5550 ; Freeman及びSharpe 2012 Nat Immunol Vol 13 pp. 113-115 ; Gutierrez et al. 2011 Infect Immun Vol 79 pp. 1873-1881 ; Joshi et al. 2009 PLoS Pathog Vol 5 e1000431 ; Liang et al. 2006 Eur J Immunol Vol. 36 pp 58-64 ; Wykes et al. 2014 Front Microbiol Vol 5 pp 249 を参照のこと）。寄生虫感染症は、マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症及びトリパノソーマ症からなる群から選択できる。マラリア感染症は、熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium）属、特に、三日熱マラリア原虫（P. vivax）、P. マラリア（P. malariae）及び P. ファルシパルム（P. falciparum）種の原虫によって引き起こされる。トキソプラズマは、トキソプラズマ（Toxoplasma gondii）によって引き起こされる寄生虫性疾患である。リーシュマニア症は、リーシュマニア（Leishmania）属の原生動物寄生虫によって引き起こされる疾患である。トリパノソーマ症は、トリパノソーマ（Trypanosoma）属の原生動物によって引き起こされる。熱帯地方のチャガ病は種クルーズトリパノソーマ（Trypanosoma cruzi）によって引き起こされ、且つ睡眠病は種ブルーストリパノソーマ（Trypanosoma brucei）によって引き起こされる。

【 0 2 9 5 】

幾つかの実施形態において、免疫の回復は、寄生虫特異的 T 細胞及び N K 細胞応答、特に、熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium）特異的 T 細胞応答、トキソプラズマ（Toxoplasma gondii）特異的 T 細胞、及び N K 細胞応答、リーシュマニア（Leishmania）特異的 T 細胞、及び N K 細胞応答、クルーズトリパノソーマ（Trypanosoma cruzi）特異的 T 細胞、及び N K 細胞応答又はブルーストリパノソーマ（Trypanosoma brucei）特異的 T 細胞、及び N K 細胞応答の回復を伴う。更なる実施形態では、寄生虫特異的 C D 8 + T 細胞及び N K 細胞応答が、回復される。

【 0 2 9 6 】

投与

本発明のオリゴヌクレオチド又は医薬組成物は、局所的に（皮膚、吸入、眼もしくは耳）又は経腸（経口もしくは胃腸管など）又は非経口（静脈内、皮下、筋肉内、大脳内、脳室内もしくはクモ膜下腔内）投与できる。

【 0 2 9 7 】

好ましい実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチド又は医薬組成物は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内の注射又は注入、クモ膜下腔内もしくは頭蓋内、例えば、髄腔内もしくは頭蓋内の経路を含む非経口経路によって投与される。大脳内又は腔内、硝子体内投与が含まれる。一実施形態において、活性なオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、静脈内投与される。別の実施形態において、活性なオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、皮下投与される。

【 0 2 9 8 】

幾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又は医薬組成物は、0.1 ~ 15 mg / kg（例えば、0.1 ~ 10 mg / kg（例えば、0.2 ~ 10 mg / kg（例えば、0.25 ~ 10 mg / kg（例えば、0.1 ~ 5 mg / kg（例えば、0.2 ~ 5 mg / kg（例えば、0.25 ~ 5 mg / kg の用量で投与される。投与は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、又は1か月に

1回でありうる。

【0299】

併用療法

幾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又は医薬組成物は、他の治療剤との併用治療の用途に使用される。治療剤は、例えば、上記の疾患又は障害に対する標準ケアとすることができます。

【0300】

慢性H B V感染症の治療には、抗ウイルス薬と免疫系調節物質の併用が推奨される。H B Vに対して有効な抗ウイルス薬は、例えば、ヌクレオシド類似体である。処置のために認可された5つのヌクレオシドアナログがある。

10

【0301】

H B V、すなわちラミブジン(Epivir)、アデフォビル(Hepsera)、テノホビル(Viread)、テルビブジン(Tyzeka)、エンテカビル(Baraclude)は、ウイルス複製を抑制するのに効果的であるが、H B s抗原レベルには効果がない。他の抗ウイルス薬には、リバビリン及びH B V抗体療法(モノクローナル又はポリクローナル)が含まれる。免疫系調節物質は、例えば、インターフェロン-2a及びPEG化インターフェロン-2a(Pegasys)又はT L R 7アゴニスト(例えばGS-9620)もしくは治療用ワクチンでありうる。IFN-処置によるウイルス負荷の低減効果は極めて低いことが明らかにされているが、この処置の結果、極めて非効率ではあるが、H B s抗原が多少(48週間の処置後に10%未満)低減する。

20

【0302】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、H B Vに対して有効な他の抗ウイルス薬、例えば国際公開第2012/145697号パンフレット及び国際公開第2014/179629号パンフレットに記載されているアンチセンスオリゴヌクレオチド、又は国際公開第2005/014806号パンフレット、国際公開第2012/024170号パンフレット、国際公開第2012/2055362号、国際公開第2013/003520号パンフレット及び国際公開第2013/159109号パンフレットに記載されているs i RNA分子と併用できる。

【0303】

本発明のオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートが他の薬剤との併用療法で投与される場合、それらは逐次的にもしくは同時に個体に投与できる。あるいは、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されている医薬的に許容される賦形剤、及び当該分野において公知の別の治療剤又は予防剤と関連して、本発明のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドコンジュゲートの組み合わせから構成できる。

30

【0304】

本発明の以下の実施形態は、本明細書に記載されている他の実施形態と併用できる。

【0305】

1. P D - L 1の発現を低減できる10~30ヌクレオチド長の連続ヌクレオチド配列を含むか又はそれからなる、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

【0306】

2. 連続ヌクレオチド配列がP D - L 1標的核酸に対して少なくとも90%相補的である、実施形態1に記載のオリゴヌクレオチド。

【0307】

3. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号：1、配列番号：2及び/又は配列番号：3からなる群から選択される標的核酸に対して相補的である、実施形態1又は2に記載のオリゴヌクレオチド。

【0308】

4. 連続ヌクレオチド配列が配列番号1上の位置1及び15720内の領域に対して相補的である、実施形態1~3に記載のオリゴヌクレオチド。

【0309】

50

5 . オリゴヌクレオチドが、配列番号：1、配列番号：2及び／又は配列番号：3からなる群から選択される標的核酸にハイブリダイズできる、G°が10kcal未満である、実施形態1～4に記載のオリゴヌクレオチド。

【0310】

6 . 連続ヌクレオチド配列が標的核酸のサブ配列に対して相補的であり、サブ配列が、配列番号：1上の位置371-3068、5467-12107、15317-15720、15317-18083、15317-19511及び18881-19494からなる群から選択される、実施形態1～5に記載のオリゴヌクレオチド。

【0311】

7 . サブ配列は、配列番号：1上の位置7300-7333、8028-8072、9812-9859、11787-11873及び15690-15735からなる群から選択される、実施形態6に記載のオリゴヌクレオチド。 10

【0312】

8 . 標的核酸がRNAである、実施形態2～7に記載のオリゴヌクレオチド。

【0313】

9 . RNAがmRNAである、実施形態8に記載のオリゴヌクレオチド。

【0314】

10 . mRNAが前駆体mRNA又は成熟mRNAである、実施形態9に記載のオリゴヌクレオチド。 20

【0315】

11 . 連続ヌクレオチド配列が少なくとも14連続ヌクレオチド、特に15、16、17、18、19、20、21、22、23又は24連続ヌクレオチドを含むか又はそれからなる、実施形態1から10に記載のオリゴヌクレオチド。

【0316】

12 . 連続ヌクレオチド配列が16～20ヌクレオチドを含むか又はそれからなる、実施形態1から10に記載のオリゴヌクレオチド。

【0317】

13 . オリゴヌクレオチドが14～35ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる、実施形態1から10に記載のオリゴヌクレオチド。

【0318】

14 . オリゴヌクレオチドが18～22ヌクレオチド長を含むか又はそれからなる、実施形態13に記載のオリゴヌクレオチド。 30

【0319】

15 . オリゴヌクレオチド又は連続ヌクレオチド配列が一本鎖である、実施形態1から14に記載のオリゴヌクレオチド。

【0320】

16 . 連続ヌクレオチド配列が標的核酸のサブ配列に対して相補的であり、サブ配列がA7、A26、A43、A119、A142、A159、A160、A163、A169、A178、A179、A180、A189、A201、A202、A204、A214、A221、A224、A226、A243、A254、A258、269、A274、A350、A360、A364、A365、A370、A372、A381、A383、A386、A389、A400、A427、A435及びA438からなる群から選択される、実施形態1から15に記載のオリゴヌクレオチド。 40

【0321】

17 . サブ配列がA221、A360、A180、A160及びA269からなる群から選択される、実施形態16に記載のオリゴヌクレオチド。

【0322】

18 . オリゴヌクレオチドがsiRNAではなく、且つ自己相補的ではない、実施形態1から17に記載のオリゴヌクレオチド。

【0323】

19. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号：5～743又は771から選択される配列を含むか又はそれからなる、実施形態1から18に記載のオリゴヌクレオチド。

【0324】

20. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号：6、8、9、13、41、42、58、77、92、111、128、151、164、166、169、171、222、233、245、246、250、251、252、256、272、273、287、292、303、314、318、320、324、336、342、343、344、345、346、349、359、360、374、408、409、415、417、424、429、430、458、464、466、474、490、493、512、519、529、533、534、547、566、567、578、582、601、619、620、636、637、638、640、645、650、651、652、653、658、659、660、665、678、679、680、682、683、684、687、694、706、716、728、733、734、及び735から選択される配列を含むか又はそれからなる、実施形態1から19に記載のオリゴヌクレオチド。

【0325】

21. 連続ヌクレオチド配列が、配列番号：466、640、342、287及び566から選択される配列を含むか又はそれからなる、実施形態1から20に記載のオリゴヌクレオチド。

【0326】

22. 連続ヌクレオチド配列が標的核酸と比較して0～3個のミスマッチを有し、該連続ヌクレオチドが該標的核酸に対して相補的である、実施形態1から21に記載のオリゴヌクレオチド。

【0327】

23. 連続ヌクレオチド配列が標的核酸と比較して1つのミスマッチを有する、実施形態22に記載のオリゴヌクレオチド。

【0328】

24. 連続ヌクレオチド配列が、標的核酸と比較して2つのミスマッチを有する、実施形態22に記載のオリゴヌクレオチド。

【0329】

25. 連続ヌクレオチド配列が、標的核酸配列に対して完全に補完的である、実施形態22に記載のオリゴヌクレオチド。

【0330】

26. 1以上の修飾ヌクレオシドを含む、実施形態1から25に記載のオリゴヌクレオチド。

【0331】

27. 1以上の修飾ヌクレオシドが高親和性修飾ヌクレオシドである、実施形態26に記載のオリゴヌクレオチド。

【0332】

28. 1以上の修飾ヌクレオシドが2'糖修飾ヌクレオシドである、実施形態26又は27に記載のオリゴヌクレオチド。

【0333】

29. 1以上の2'糖修飾ヌクレオシドが独立に、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、アラビノ核酸酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、及びLNAヌクレオシドからなる群から選択される、実施形態28に記載のオリゴヌクレオチド。

【0334】

30. 1以上の修飾ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、実施形態28に記載のオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【0335】

31. 修飾LNAヌクレオシドがオキシ-LNAである、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

【0336】

32. 修飾ヌクレオシドが-D-オキシ-LNAである、実施形態31に記載のオリゴヌクレオチド。

【0337】

33. 修飾ヌクレオシドがチオLNAである、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

【0338】

34. 修飾ヌクレオシドがアミノ-LNAである、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

10

【0339】

35. 修飾ヌクレオシドがcETである、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

【0340】

36. 修飾ヌクレオシドがENAである、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

【0341】

37. 修飾LNAヌクレオシドが、-L-オキシ-LNA、-D-アミノ-LNA、-L-アミノ-LNA、-D-チオ-LNA、-L-アミノ-LNA、チオ-LNA、(S)cET、(R)cET-D-ENA及び-L-ENAから選択される、実施形態30に記載のオリゴヌクレオチド。

20

【0342】

38. 修飾LNAヌクレオシド以外に、少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシドが存在する、実施形態30から37に記載のオリゴヌクレオチド。

【0343】

39. 2'置換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(MOE)、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、2'-フルオロ-ANAからなる群から選択される、実施形態38に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【0344】

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

【0345】

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

【0346】

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

40

【0347】

43. 連続ヌクレオチド配列内の全てのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態40又は41に記載のオリゴヌクレオチド。

【0348】

44. オリゴヌクレオチドがRNアーゼHを補充する能力を有する、実施形態1から43に記載のオリゴヌクレオチド。

【0349】

45. オリゴヌクレオチドがギャップマーである、実施形態44に記載のオリゴヌクレオチド。

50

【0350】

46. オリゴヌクレオチドが式 5' - F - G - F' - 3' のギャップマーであり、領域 F 及び F' が独立に 1 ~ 7 修飾ヌクレオシドを含むか又はそれからなり、且つ G が R N アーゼ H を補充する能力を有する 6 ~ 16 ヌクレオシド間の領域であり、実施形態 4 4 又は 4 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0351】

47. ギャップマーが、式 5' - D' - F - G - F' - 3' 又は 5' - F - G - F' - D" - 3' を有し、領域 F 及び F' が独立に、1 ~ 7 修飾ヌクレオシドを含み、G が R N アーゼ H を補充する能力を有する 6 ~ 16 ヌクレオシド間の領域であり、且つ領域 D' 又は D" が 1 ~ 5 ホスホジエステルの連結ヌクレオシドを含む、実施形態 4 4 又は 4 5 に記載のオリゴヌクレオチド。 10

【0352】

48. D' 又は D" が任意選択的である、実施形態 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0353】

49. 領域 D' が 2 つのホスホジエステルの連結ヌクレオシドからなる、実施形態 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0354】

50. ホスホジエステル連結ヌクレオシドが c a (シチジン - アデノシン) である、実施形態 4 9 に記載のオリゴヌクレオチド。 20

【0355】

51. 修飾ヌクレオシドが 2' 糖修飾ヌクレオシドであり、独立に、2' - O - アルキル - R N A、2' - O - メチル - R N A、2' - アルコキシ - R N A、2' - O - メトキシエチル - R N A、2' - アミノ - D N A、2' - フルオロ - D N A、アラビノ核酸酸 (A N A)、2' - フルオロ - A N A、及び L N A ヌクレオシドからなる群から選択される、実施形態 4 6 又は 4 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0356】

52. F 領域及び F' 領域中の修飾ヌクレオシドのうちの 1 つ以上が、L N A ヌクレオシドである、実施形態 4 6 から 5 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0357】

53. F 領域及び F' 領域中の全ての修飾ヌクレオシドが、L N A ヌクレオシドである、実施形態 5 2 に記載のオリゴヌクレオチド。 30

【0358】

54. F 領域及び F' 領域が L N A ヌクレオシドからなる、実施形態 5 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0359】

55. F 領域及び F' 領域中の全ての修飾ヌクレオシドがオキシ - L N A ヌクレオシドである、実施形態 5 2 から 5 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0360】

56. 領域 F 又は F' のうちの少なくとも 1 つが、2' - O - アルキル - R N A、2' - O - メチル - R N A、2' - アルコキシ - R N A、2' - O - メトキシエチル - R N A、2' - アミノ - D N A 及び 2' - フルオロ - D N A からなる群から独立に選択された少なくとも 1 つの 2' 置換修飾ヌクレオシドを更に含む、実施形態 5 2 に記載のオリゴヌクレオチド。 40

【0361】

57. 領域 G 中の R N A - H 補充ヌクレオシドが独立に D N A、- L - L N A、C 4' アルキル化 D N A、A N A 及び 2' F - A N A 及び U N A から選択される、実施形態 4 6 から 5 6 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0362】

58. 領域 G 中のヌクレオシドが、D N A 及び / 又は - L - L N A ヌクレオシドで

ある、実施形態 5 7 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0363】

5 9 . 領域 G が少なくとも 7 5 % D N A ヌクレオシドからなる、実施形態 5 7 又は 5 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0364】

6 0 . オリゴヌクレオチドが C M P I D 番号 : 5 _ 1 ~ 7 4 3 _ 1 及び 7 7 1 _ 1 (表 5) のいずれか 1 つから選択される、実施形態 1 から 5 9 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0365】

6 1 . オリゴヌクレオチドが C M P I D 番号 : 6 _ 1 、 8 _ 1 、 9 _ 1 、 1 3 _ 1 10
 、 4 1 _ 1 、 4 2 _ 1 、 5 8 _ 1 、 7 7 _ 1 、 9 2 _ 1 、 1 1 1 _ 1 、 1 2 8 _ 1 、 1 5
 1 _ 1 、 1 6 4 _ 1 、 1 6 6 _ 1 、 1 6 9 _ 1 、 1 7 1 _ 1 、 2 2 2 _ 1 、 2 3 3 _ 1 、
 2 4 5 _ 1 、 2 4 6 _ 1 、 2 5 0 _ 1 、 2 5 1 _ 1 、 2 5 2 _ 1 、 2 5 6 _ 1 、 2 7 2 _
 1 、 2 7 3 _ 1 、 2 8 7 _ 1 、 2 9 2 _ 1 、 3 0 3 _ 1 、 3 1 4 _ 1 、 3 1 8 _ 1 、 3 2
 0 _ 1 、 3 2 4 _ 1 、 3 3 6 _ 1 、 3 4 2 _ 1 、 3 4 3 _ 1 、 3 4 4 _ 1 、 3 4 5 _ 1 、
 3 4 6 _ 1 、 3 4 9 _ 1 、 3 5 9 _ 1 、 3 6 0 _ 1 、 3 7 4 _ 1 、 4 0 8 _ 1 、 4 0 9 _
 1 、 4 1 5 _ 1 、 4 1 7 _ 1 、 4 2 4 _ 1 、 4 2 9 _ 1 、 4 3 0 _ 1 、 4 5 8 _ 1 、 4 6
 4 _ 1 、 4 6 6 _ 1 、 4 7 4 _ 1 、 4 9 0 _ 1 、 4 9 3 _ 1 、 5 1 2 _ 1 、 5 1 9 _ 1 、
 5 1 9 _ 1 、 5 2 9 _ 1 、 5 3 3 _ 1 、 5 3 4 _ 1 、 5 4 7 _ 1 、 5 6 6 _ 1 、 5 6 7 _
 1 、 5 7 8 _ 1 、 5 8 2 _ 1 、 6 0 1 _ 1 、 6 1 9 _ 1 、 6 2 0 _ 1 、 6 3 6 _ 1 、 6 3
 7 _ 1 、 6 3 8 _ 1 、 6 4 0 _ 1 、 6 4 5 _ 1 、 6 5 0 _ 1 、 6 5 1 _ 1 、 6 5 2 _ 1 、
 6 5 3 _ 1 、 6 5 8 _ 1 、 6 5 9 _ 1 、 6 6 0 _ 1 、 6 6 5 _ 1 、 6 7 8 _ 1 、 6 7 9 _
 1 、 6 8 0 _ 1 、 6 8 2 _ 1 、 6 8 3 _ 1 、 6 8 4 _ 1 、 6 8 7 _ 1 、 6 9 4 _ 1 、 7 0
 6 _ 1 、 7 1 6 _ 1 、 7 2 8 _ 1 、 7 3 3 _ 1 、 7 3 4 _ 1 、 及び 7 3 5 _ 1 からなる群
 から選択される、実施形態 1 から 6 0 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0366】

6 2 . オリゴヌクレオチドが C M P I D 番号 : 2 8 7 _ 1 、 3 4 2 _ 1 、 4 6 6 _
 1 、 6 4 0 _ 1 、 5 6 6 _ 1 、 7 6 6 _ 1 、 7 6 7 _ 1 、 7 6 8 _ 1 、 7 6 9 _ 1 及び 7
 7 0 _ 1 からなる群から選択される、実施形態 1 から 6 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【0367】

6 3 . a . 請求項 1 から 6 2 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド (領域 A)
 と ;
 b . 前記オリゴヌクレオチドに共有結合されている、少なくとも 1 つの結合部分 (領域 C)
) ;
 を含む、アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0368】

6 4 . 結合部分が、炭水化物、細胞表面受容体リガンド、薬物物質、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素、ビタミン、ウイルスタンパク質又はこれらの組み合わせから選択される、実施形態 6 3 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0369】

6 5 . 結合部分が、部分を含有する炭水化物である、実施形態 6 3 又は 6 4 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0370】

6 6 . 炭水化物結合部分が、少なくとも 1 つのアシアロ糖タンパク質受容体標的化部分を含み、請求項 1 から 6 2 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドに共有結合されている、実施形態 6 5 に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0371】

6 7 . アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分が、ガラクトース、ガラクトサミン、N - ホルミル - ガラクトサミン、N - アセチルガラクトサミン、N - プロピオニル -

10

20

20

30

40

40

50

ガラクトサミン、N-n-ブタノイル-ガラクトサミン及びN-イソブタノイルガラクトサミンからなる群から選択される少なくとも1つの炭水化物部分を含む、実施形態66に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0372】

68. アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分が、1価、2価、3価又は4価である、実施形態66又は67に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0373】

69. アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分が、2~4個の末端GalNAc部分と各GalNAc部分を分岐分子に連結するPEGスペーサーとからなる、実施形態68に記載のオリゴマーコンジュゲート。 10

【0374】

70. アシアロ糖タンパク質受容体標的化結合部分が、3価N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分である、実施形態66から69に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0375】

71. 結合部分が、図1中の3価GalNAc部分のいずれか1つから選択される、実施形態66から70に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0376】

72. 結合部分が図3の3価GalNAc部分である、実施形態71に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。 20

【0377】

73. オリゴヌクレオチド又は連続オリゴヌクレオチド配列と結合部分との間にリンカーが存在する、実施形態63から72に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0378】

74. リンカーが、生理学的に易変的なリンカー(領域B)である、実施形態73に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0379】

75. 生理学的に易変的なリンカーがヌクレアーゼ感受性リンカーである、実施形態74に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。 30

【0380】

76. 生理学的に易変的なリンカーが、2~5個の連続するホスホジエステル結合で構成される、実施形態74又は75に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0381】

77. 生理学的に易変的なリンカーが、実施形態47から50中に存在する領域D'又はD''に等しい、実施形態76に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0382】

78. オリゴヌクレオチドコンジュゲートがCMP-ID番号:766_2、767_2、768_2、769_2及び770_2から選択される、実施形態63から77のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。 40

【0383】

79. オリゴヌクレオチドコンジュゲートが図4、図5、図6、図7及び図8に表されるオリゴヌクレオチドコンジュゲートから選択される、実施形態78に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0384】

80. 非結合オリゴヌクレオチドと比較して、標的細胞におけるPD-L1の阻害の改善、又は肝臓と脾臓との間の細胞分布の改善、又はコンジュゲートオリゴヌクレオチドの肝臓への細胞への取り込みの改善を呈する、実施形態63から76に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート。

【0385】

81. 実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80 50

に記載のコンジュゲート、ならびに医薬的に許容される希釈剤、担体、塩及び／又は補助剤を含む、医薬組成物。

【0386】

82. ヌクレオチド単位を反応させ、それにより、そのオリゴヌクレオチド内に含有されている共有結合の連続ヌクレオチド単位を形成することを含む、実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチドの製造方法。

【0387】

83. 連続ヌクレオチド配列を非ヌクレオチド結合部分と反応させることを、更に含む、実施形態82に記載の方法。

【0388】

84. オリゴヌクレオチドを医薬的に許容される希釈剤、担体、塩及び／又は補助剤と混合することを含む、実施形態81に記載の組成物の製造方法。

10

【0389】

85. PD-L1を発現する標的細胞内のPD-L1の発現を調節するためのインビボ又はインビトロ方法であって、前記方法が、有効量の実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲート、又は実施形態81に記載の医薬組成物を前記細胞に投与することを含む、前記方法。

【0390】

86. 治療的もしくは予防的有効量の実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲート、又は実施形態81に記載の医薬組成物を、疾患に罹患しているか又は罹患しやすい被験者に投与することを含む、疾患の治療又は防止方法。

20

【0391】

87. 治療的もしくは予防的有効量の実施形態63から80に記載のオリゴヌクレオチドコンジュゲート、又は実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態81に記載の医薬組成物を、ウイルス又は寄生虫に感染した被験者に投与することを含む、ウイルスもしくは寄生虫に対する免疫回復法。

【0392】

88. 免疫性の回復が、対照と比較して、肝臓における1以上のHBV抗原に対して特異的なCD8+T細胞の増加である、実施形態87に記載の方法。

30

【0393】

89. 被験者における疾患の治療又は防止用の薬品として使用するための、実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲート、又は実施形態81に記載の医薬組成物。

【0394】

90. 被験者における疾患の治療又は防止用の薬品を調製するための、実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチドの使用、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲートの使用。

【0395】

91. ウイルスもしくは寄生虫に対する免疫性の回復に使用するための、実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲート、又は実施形態81に記載の医薬組成物。

40

【0396】

92. 免疫性の回復が、対照と比較して、肝臓における1以上のHBV抗原に対して特異的なCD8+T細胞の増加である、実施形態91に記載の使用。

【0397】

93. HBV抗原がHBs抗原である、実施形態92に記載の使用。

【0398】

94. 疾患がPD-L1のインビボ活性に関連するものである、実施形態86から93に記載の方法、オリゴヌクレオチド又は使用。

50

【0399】

95. 疾患が、抗原提示細胞におけるPDL1の発現の増加と関連するものである、実施形態86から94に記載の方法、オリゴヌクレオチド又は使用。

【0400】

96. PDL1が、実施形態1から62に記載のオリゴヌクレオチド、又は実施形態63から80に記載のコンジュゲート、又は実施形態81に記載の医薬組成物での治療を受けない場合の発現又はその処置前の発現と比較して少なくとも30%、又は少なくとも40%、又は少なくとも50%、又は少なくとも60%、又は少なくとも70%、又は少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%低減される、実施形態95に記載の方法、オリゴヌクレオチド又は使用。 10

【0401】

97. 疾患が、ウイルス性肝炎感染症又は寄生虫感染症から選択される、実施形態86から95に記載の方法、オリゴヌクレオチド又は使用。

【0402】

98. ウィルス感染がHBV、HCV又はHDVである、実施形態98に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【0403】

99. 疾患が慢性HBVである、実施形態86から95に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。 20

【0404】

100. 寄生虫感染症が、マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症又はトリパノソーマ症である、実施形態98に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【0405】

101. 被験者が哺乳動物である、実施形態86から100に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【0406】

102. 哺乳動物がヒトである、実施形態101に記載の方法、オリゴヌクレオチド、又は使用。

【実施例】**【0407】****材料と方法**

モチーフ配列及びオリゴヌクレオチド化合物

【0408】

30

【表5-1】

表5：ヒトPDL1転写物（配列番号1）を標的化するオリゴヌクレオチドモチーフ配列（配列番号で示される）、これらのデザイン、ならびにモチーフ配列に基づいて設計された（CMP ID番号で示される）特異的アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物のリスト。

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
5	taattggctctactgc	2-11-3	TAattggctctacTGC	5_1	236	-20
6	tcgcataagaatgact	4-10-2	TCGcataagaatgaCT	6_1	371	-19
7	tgaacacacacgtcgca	2-12-2	TGaacacacacagtcgCA	7_1	382	-19
8	ctgaacacacacagtgc	3-10-3	CTGaacacacacagtCGC	8_1	383	-22
9	tctgaacacacacagtgc	3-11-2	TCTgaacacacacagtCG	9_1	384	-19
10	ttctgaacacacacagtgc	3-11-2	TTCTgaacacacacagTC	10_1	385	-17
11	acaagtcatgttacta	2-11-3	ACaaagtcatgttaCTA	11_1	463	-16
12	acacaagtcatgttac	2-12-2	ACacaagtcatgttAC	12_1	465	-14
13	cttaacttagatgctgc	2-11-3	CTtaacttagatgcTGC	13_1	495	-20
14	acttaacttagatgctg	2-11-3	ACtttaacttagatgCTG	14_1	496	-18
15	gacttaacttagatgct	3-11-2	GACtttaacttagatgCT	15_1	497	-19
16	agacttaacttagatgc	2-11-3	AGacttaacttagaTGC	16_1	498	-18
17	gcaggaaagagacttac	3-10-3	GCAggaaagagactTAC	17_1	506	-20
18	aataaaattccgttcagg	4-9-4	AATAaaattccgttCAGG	18_1	541	-22
19	gcaaataaaattccgtt	3-10-3	GCAaataaaattccGTT	19_2	545	-18
19	gcaaataaaattccgtt	4-8-4	GCAAataaaattcCGTT	19_1	545	-20
20	agcaaataaaattccgt	4-9-3	AGCAaataaaattcCGT	20_1	546	-20
21	cagagcaaataaaattcc	4-10-3	CAGAgcaaataaaatTCC	21_1	548	-21
22	tggacagagcaaataaat	4-11-3	TGGAcagagcaaataAAT	22_1	551	-19
23	atggacagagcaaataa	4-8-4	ATGGAcagagcaATA	23_1	554	-20
24	cagaatggacagagca	2-11-3	CAgaatggacagaGCA	24_1	558	-21
25	ttctcagaatggacag	3-11-2	TTCTcagaatggacAG	25_1	562	-17
26	ctgaactttgacatag	4-8-4	CTGAactttgacATAG	26_1	663	-20
27	aagacaaaacccagactga	2-13-3	AAgacaaaacccagactG	27_1	675	-21
28	tataagacaaaacccagac	4-10-4	TATAagacaaaacccAGAC	28_1	678	-22
29	ttataagacaaaacccaga	4-10-4	TTATAagacaaaacccCAGA	29_1	679	-23
30	tgttataagacaaaaccc	4-10-3	TGTTataagacaaaCCC	30_1	682	-22
31	tagaacaatggtaactt	4-9-4	TAGAacaatggtaCTT	31_1	708	-20
32	gtagaacaatggtaact	4-10-2	GTAGAacaatggtaCT	32_1	710	-19
33	aggtagaacaatggta	3-10-3	AGGtagaacaatgGTA	33_1	712	-19
34	aagaggtagaacaatgg	4-9-4	AAGAggtagaacaATGG	34_1	714	-21
35	gcatcccacagtaaatt	2-12-2	GCatcccacagtaaaTT	35_1	749	-17
36	gaaggttatttaattc	2-11-3	GAaggttatttaattTC	36_1	773	-13
37	ctaatcgaatgcagca	4-9-3	CTAAatcgaatgcagca	37_1	805	-22
38	tacccaatctaatacga	3-10-3	TACccaatctaatacga	38_1	813	-20

【0409】

【表5-2】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
39	tagttacccaatctaa	3-10-3	TAGttacccaatcTAA	39_1	817	-19
40	catttagttacccaat	3-10-3	CATttagttacccAAT	40_1	821	-18
41	tcatttatgttacccaa	3-10-3	TCAtttagttaccCAA	41_1	822	-19
42	ttcatttatgttaccca	2-10-4	TTcatttatgttaccca	42_1	823	-22
43	gaatttaatttcatttagt	4-10-4	GAATtaatttcattTAGT	43_1	829	-19
44	cagtgaggaattaattt	4-9-4	CAGTgaggaattaATT	44_1	837	-20
45	ccaaacagtgaggaatt	4-8-4	CCAAcagtgaggAATT	45_1	842	-21
46	cccaacacgtgaggaat	3-10-3	CCCaacacgtgaggAAT	46_1	843	-22
47	tatacccaacagtgagg	2-12-3	TAtacccaaacagtgAGG	47_1	846	-21
48	ttatacccaacagtgag	2-11-4	TTatacccaacagTGAG	48_1	847	-21
49	tttatacccaacagtga	3-11-3	TTTatacccaacagTGA	49_1	848	-21
50	cctttataccacaaacag	3-10-3	CCTttataccacaaCAG	50_1	851	-23
51	taacccattatacccaa	4-8-4	TAACccattatacCCAA	51_1	854	-22
52	aataacccattataccca	3-10-4	AATaacccattataCCCA	52_1	855	-23
53	gtaaaataacccattata	3-11-2	GTAaataacccattATA	53_1	859	-14
54	actgtaaaataacccattat	4-10-4	ACTGtaaaataacccTTAT	54_1	860	-20
55	atatatatgcataatgag	3-11-2	ATATatatgcataatgAG	55_1	903	-14
56	agatatatatgcataatg	2-12-2	AGatatatatgcataatg	56_1	905	-12
57	gagatatatatgcataat	3-10-3	GAGatatatatgcataat	57_1	906	-15
58	ccagagatatatatgc	2-11-3	CCagagatatatataTGC	58_1	909	-19
59	caatattccagagatata	4-9-4	CAATattccagagATAT	59_1	915	-20
60	gcaaatattccagagata	4-10-3	GCAAtattccagagATA	60_1	916	-22
61	agcaaatattccagagat	3-11-3	AGCaatattccagagAT	61_1	917	-22
62	cagcaaatattccagag	3-9-4	CAGcaatattccAGAG	62_1	919	-22
63	aatcagcaatattccag	4-9-4	AATCagcaatattCCAG	63_1	921	-23
64	acaatcagcaatattcc	4-9-4	ACAAtcagcaataTTCC	64_1	923	-21
65	actaagttagttacacttct	2-14-3	ACTaaagttagttacactTCT	65_1	957	-20
66	ctaaggtagttacacttc	4-11-2	CTAAgttagttacactTC	66_1	958	-18
67	gactaagttagttacactt	3-12-3	GACtaagttagttacaCTT	67_1	959	-20
68	tgactaagttagttaca	3-9-4	TGActaagttagTTACA	68_1	962	-19
69	ctttgactaagttagtta	4-10-3	CTTTgactaagttagTTA	69_1	964	-19
70	ctctttgactaagtag	3-10-3	CTCtttgactaagTAG	70_1	967	-19
71	gctctttgactaagta	4-10-2	GCTCtttgactaagTA	71_1	968	-21
72	ccttaaaatactgttgc	2-11-4	CCtttaaaatactgtTGAC	72_1	1060	-20
73	cttaaaatactgttgc	2-12-2	CTttaaaatactgttgcAC	73_1	1060	-13
74	tccttaaaatactgttgc	3-10-3	TCCTttaaaatactgtTG	74_1	1062	-18
75	tcttccttaaaatactgtt	4-11-2	TCTCtttaaaatactgtTT	75_1	1063	-19
76	tatcatagtttcctt	2-10-4	TAtcatagttctCCTT	76_1	1073	-21
77	agtatcatagtttcct	3-10-3	AGTatcatagttcTCC	77_1	1075	-22

【0410】

【表 5 - 3】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
78	gagttatcatatgttctc	2-11-3	GAGttatcatatgttCTC	78_1	1076	-18
79	agagtatcatatgttct	2-10-4	AGagtatcatatgttCT	79_1	1077	-18
79	agagtatcatatgttct	3-10-3	AGAgtatcatatgtTCT	79_2	1077	-19
80	cagagtatcatatgttc	3-10-3	CAGagttatcatatgtTC	80_1	1078	-18
81	ttcagagtatcatatgt	4-10-2	TTCAGagttatcatatGT	81_1	1080	-18
82	cttcagagtatcatatgt	3-9-4	CTTcagagtatcatatGT	82_1	1081	-19
83	tttttcagagtatcatatgt	4-11-2	TTTtttcagagtatcatatTA	83_1	1082	-19
84	tttttcagagtatcatatgt	3-10-4	TTTtttcagagtatcatatTCAT	84_1	1083	-20
85	gagaaaggctaagttt	4-9-3	GAGAAaggctaagTTT	85_1	1099	-19
86	gacactcttgatcatt	2-10-4	GAcaactcttgatcATT	86_1	1213	-19
87	tgagacactcttgtaca	2-13-2	TGagacactcttgtACA	87_1	1215	-18
88	tgagacactcttgtac	2-11-3	TGagacactcttgtAC	88_1	1216	-18
89	cttttattaaactccat	2-10-4	CTtttattaaactCCAT	89_1	1266	-18
90	accaaaacttttattaaa	4-10-2	ACCAaaacttttattAA	90_1	1272	-14
91	aaacctctactaagtg	4-10-2	AAACctctactaagTG	91_1	1288	-16
92	agattaagacagttga	2-11-3	AGattaagacagtTGA	92_1	1310	-16
93	aagtaggagcaagaggc	2-12-3	AAgttaggagcaagaGGC	93_1	1475	-22
94	aaagtaggagcaagagg	4-10-3	AAAGtaggagcaagAGG	94_1	1476	-20
95	gttaagcagccaggag	2-12-2	GTtaagcagccaggAG	95_1	1806	-20
96	agggttaggatgggtag	2-12-2	AGggtaggatgggtAG	96_1	1842	-20
97	aagggttaggatgggt	3-11-2	AAGggtaggatgggTA	97_1	1843	-20
98	caagggttaggatgggt	2-12-2	CAagggttaggatggGT	98_2	1844	-20
98	caagggttaggatgggt	3-11-2	CAAagggttaggatggGT	98_1	1844	-21
99	ccaagggttaggatgg	2-12-2	CCaagggttaggatgg	99_1	1845	-22
100	tccaagggttaggatgg	2-12-2	TCcaagggttaggatgg	100_1	1846	-20
101	cttccaagggttaggat	4-10-2	CTTCCAagggttaggAT	101_1	1848	-21
102	atcttccaagggttagga	3-12-2	ATCtttccaagggttagGA	102_1	1849	-22
103	agaagtgtatggctatt	2-11-4	AGaagtgtatggctCATT	103_1	1936	-21
104	aagaagtgtatggctatt	3-10-4	AAGaagtgtatggctCAT	104_1	1937	-21
105	gaagaagtgtatggctca	3-11-3	GAAGaaagtgtatggcTCA	105_1	1938	-21
106	atgaaatgtaaaactgg	4-9-4	ATGAaatgtaaaactGGG	106_1	1955	-21
107	caatgaaatgtaaaactgg	4-10-4	CAATgaaatgtaaaactGG	107_1	1956	-20
108	gcaatgaaatgtaaaactg	4-10-4	GCAAtgaaatgtaaaACTG	108_1	1957	-20
109	agcaatgaaatgtaaaact	4-10-4	AGCAatgaaatgtaaaACT	109_1	1958	-20
110	gagcaatgaaatgtaaaac	4-10-4	GAGCaatgaaatgtAAAC	110_1	1959	-19
111	tgaattcccatatccga	2-12-3	TGaaattcccatatccCGA	111_1	1992	-22
112	agaatttatgaccat	2-11-3	AGaatttatgaccaTAT	112_1	2010	-15
113	aggtttagaaattatgacc	3-10-4	AGGtaagaattatGACC	113_1	2014	-21
114	tcaggtaagaattatgac	4-10-4	TCAGgttaagaattatGAC	114_1	2015	-22
115	cttcaggtaagaattatgt	4-10-4	CTTCaggtaagaattTATG	115_1	2017	-21

【0411】

【表 5 - 4】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID 番号	配列番号1上の開始点	dG
116	tcttcaggtaagaattt	4-9-4	TCTTcaggtaagaATTAA	116_1	2019	-20
117	cttcttcaggtaagaat	4-9-4	CTTCttcaggtaaGAAT	117_1	2021	-21
118	tcttcaggtaagaa	4-10-3	TCTTcttcaggtaaGAA	118_1	2022	-20
119	tcttcaggtaaga	3-10-3	TCTtcttcaggtaAGA	119_1	2023	-20
120	tggtctaagagaagaag	3-10-4	TGGtctaagagaAGAAG	120_1	2046	-20
121	gttggtctaagagaag	4-9-3	GTTGgtctaagagAAG	121_1	2049	-19
123	cagttggtctaagagaa	2-11-4	CAggtggtctaagAGAA	123_1	2050	-20
124	gcagttggtctaagagaa	3-13-2	GCAGgtggtctaagagAA	124_1	2050	-22
122	agtggtctaagagaa	3-9-4	AGTtggtctaagAGAA	122_1	2050	-20
126	gcagttggtctaagaga	2-13-2	GCAGgtggtctaagaGA	126_1	2051	-21
125	cagttggtctaagaga	4-10-2	CAGTtggtctaagaGA	125_1	2051	-21
127	gcagttggtctaagag	2-11-3	GCAGgtggtctaaGAG	127_1	2052	-21
128	ctcatatcagggcagt	2-10-4	CTcatatcagggCAGT	128_1	2063	-24
129	cacacatgttcttaac	4-11-2	CACACatgttcttaAC	129_1	2087	-18
130	taaatacacacatgttct	3-11-4	TAAtaacacacatgTTCT	130_1	2092	-19
131	gttaatacacacatgttc	4-11-3	GTAAatacacacatgTTC	131_1	2093	-19
132	tgttaatacacacatgtt	4-10-4	TGTAatacacacataTGTT	132_1	2094	-22
133	gatcatgttaatacacac	4-10-4	GATCatgttaatacACAC	133_1	2099	-20
134	agatcatgttaatacaca	4-10-4	AGATCatgttaataCACA	134_1	2100	-21
135	caaagatcatgttaatacac	4-12-4	CAAAGatcatgttaatACAC	135_1	2101	-19
136	acaaagatcatgttaataca	4-12-4	ACAAAGatcatgttaaTACA	136_1	2102	-20
137	gaatacaaagatcatgt	4-10-4	GAATacaagatcaTGTA	137_1	2108	-20
138	agaatacaaagatcatgt	4-10-4	AGAAtacaagatcATGT	138_1	2109	-20
139	cagaatacaaagatcatg	4-10-4	CAGAatacaaagatCATG	139_1	2110	-21
140	gcagaatacaaagatca	4-9-4	GCAGAatacaaagATCA	140_1	2112	-22
141	aggcagaatacaaagat	4-11-2	AGGCagaatacaaagAT	141_1	2114	-19
142	aaggcagaatacaaaga	4-10-3	AAGGCagaatacaaAGA	142_1	2115	-19
143	attagtggacgacgaa	3-10-3	ATTagtggacgacGAA	143_1	2132	-18
144	cattagtggacgacgaa	2-11-3	CAAttgtggacgacCGA	144_1	2133	-20
145	gagggtgtatggattag	2-11-3	GAgggtgtatggatTAG	145_1	2218	-19
146	ttaggagtaataaagg	2-10-4	TTaggagtaataAAGG	146_1	2241	-14
147	ttaatgaatttggtt	3-11-2	TTAatgaatttggatTG	147_1	2263	-13
148	cttaatgaatttgggt	2-12-2	CTttaatgaatttgGT	148_1	2265	-14
149	catggattacaactaa	4-10-2	CATGgattacaactAA	149_1	2322	-16
150	tcatggattacaacta	2-11-3	TCatggattacaactTA	150_1	2323	-16
151	gtcatggattacaact	3-11-2	GTCatggattacaCT	151_1	2324	-18
152	cattaaatctagtcat	2-10-4	CATttaaatctagtTCAT	152_1	2335	-16
153	gacattaaatctagtca	4-10-3	GACATttaaatctagTCA	153_1	2336	-19
154	aggcacattaaatcta	4-10-2	AGGGAcattaaatcTA	154_1	2340	-18
155	caaaggcattataacca	4-9-3	CAAAGcattataaCCA	155_1	2372	-18

【0412】

【表5-5】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
156	acttacttaggcagaag	2-10-4	ACttacttaggcaGAAG	156_1	2415	-19
157	cagagttaactgtaca	4-10-2	CAGAgtaactgtacA	157_1	2545	-20
158	ccagagttaactgtac	4-10-2	CCAGagttaactgtAC	158_1	2546	-20
159	gccagagttaactgtta	2-12-2	GCcagagttaactgTA	159_1	2547	-20
160	tggccagagttaact	2-12-2	TGggccagagttaACT	160_1	2550	-21
161	cacatcttatcagact	2-12-2	CAgcacatcttatcagaCT	161_1	2576	-19
162	tgaaaataaacatgaggcat	3-11-4	TGAaaaataaacatgaggTCAT	162_1	2711	-19
163	gtgaaataaacatgagtc	3-10-4	GTGaaataaacatgAGTC	163_1	2713	-19
164	tctgtttatgtcactg	4-10-2	TCTGtttatgtcacTG	164_1	2781	-20
165	gtctgtttatgtcact	4-10-2	GTCTgtttatgtcaCT	165_1	2782	-22
166	tggctgtttatgtca	2-10-4	TGgtctgtttatGTCA	166_1	2784	-21
167	ttggctgtttatgtc	4-10-2	TTGGGtctgtttatgTC	167_1	2785	-20
168	tcacccattgtttaaa	2-12-2	TCacccattgtttAA	168_1	2842	-15
169	ttcagcaaataattcg	2-10-4	TTcagcaaataatTCGT	169_1	2995	-17
170	gtgtgttcagcaaata	3-10-4	GTGtgttcagcaaATAT	170_1	2999	-21
171	tctattgttaggtatc	3-10-3	TCTattgttaggtATC	171_1	3053	-18
172	attgcccattttactg	2-12-2	ATTgcccattttactTG	172_1	3118	-19
173	tattgcccattttact	3-11-2	TATgcccattttact	173_1	3119	-21
174	aaatattgcccatttt	2-11-3	AAatattgcccattTT	174_1	3122	-17
175	ataaccttatcataca	3-11-2	ATAaccttatcataCA	175_1	3174	-16
176	tataaccttatcatac	2-11-3	TAtaaccttatcaTAC	176_1	3175	-14
177	ttataaccttatcata	3-11-2	TTAtaaccttatcaTA	177_1	3176	-14
178	tttataaccttatcat	3-10-3	TTTataaaccttatCAT	178_1	3177	-16
179	actgctattgttatct	2-11-3	ACtgctattgttatCT	179_1	3375	-19
180	aggactgctattgcta	2-11-3	AGgactgctattgCTA	180_1	3378	-21
181	gaggactgctattgct	3-11-2	GAGgactgctattgCT	181_1	3379	-22
182	acgtagaataataaca	2-12-2	ACgtagaataataaCA	182_1	3561	-11
183	ccaagtgtataatgg	2-10-4	CCaaagtgtataATGG	183_1	3613	-19
184	ttagcagaccaagtga	2-10-4	TTagcagaccaaGTGA	184_1	3621	-21
185	gtttagcagaccaagt	2-12-2	GTtttagcagaccaaGT	185_1	3623	-19
186	tgacagtgattatatt	2-12-2	TGacagtgattatATT	186_1	3856	-13
187	tgtccaagatattgac	4-10-2	TGTCcaagatattgAC	187_1	3868	-18
188	gaatatccttagattgt	3-10-3	GAAtatccttagatTGT	188_1	4066	-18
189	caaactgagaatatcc	2-11-3	CAaaactgagaataTCC	189_1	4074	-16
190	gcaaactgagaatatc	3-11-2	GCAaaactgagaataTC	190_1	4075	-16
191	tccttattacaatcgta	3-11-2	TCCtattacaatcgTA	191_1	4214	-19
192	ttccttattacaatcg	4-10-2	TTCCtattacaatCGT	192_1	4215	-19
193	actaatggggaggattt	2-12-2	ACtaatggggaggatTT	193_1	4256	-15
194	tagttcagagaataag	2-12-2	TAgttcagagaataAG	194_1	4429	-13
195	taacatatagttcaga	2-11-3	TAacatatagttcAGA	195_1	4436	-15

【0413】

【表 5 - 6】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
196	ataacatatagttcag	3-11-2	ATAAcatatagttcAG	196_1	4437	-14
197	cataacatatagttca	2-12-2	CATAacatatagttCA	197_1	4438	-13
198	tcataacatatagttc	2-12-2	TCTAAcatatagtTC	198_1	4439	-12
199	tagctcctaacaatca	4-10-2	TAGCTcctaacaatCA	199_1	4507	-22
200	ctccaatctttgtata	4-10-2	CTCCaaatctttgtATA	200_1	4602	-20
201	tctccaatctttgtat	4-10-2	TCTCaaatctttgtAT	201_1	4603	-19
202	tctatttcagccaatc	2-12-2	TCTatttcagccaatC	202_1	4708	-17
203	cggaaagttagatgaa	3-10-3	CGGaaagttagatGAA	203_1	4782	-19
204	ttaaggcatgaggaata	4-10-2	TTAAggcatgaggaATA	204_1	4798	-16
205	tgattgagcacctctt	3-10-3	TGAttgagcacctCTT	205_1	4831	-22
206	gactaatttatttcgtt	3-11-2	GACtaatttatttcgtT	206_1	4857	-15
207	tgactaatttatttcgt	3-10-3	TGActaatttatttCGT	207_1	4858	-17
208	gtgactaatttatttcg	3-10-3	GTGactaatttattTCG	208_1	4859	-17
209	ctgcttggaaatgtgac	4-10-2	CTGCTtggaaatgtgAC	209_1	4870	-20
210	cctgcttggaaatgtga	2-11-3	CCtgcTTggaaatgTGA	210_1	4871	-21
211	atcctgtttggaaatgt	2-10-4	ATcctgtttggaaATGT	211_1	4873	-20
212	attataaaatctattct	3-10-3	ATTataaaatctatTCT	212_1	5027	-13
213	gctaaataactttcatc	2-11-3	GCtaaaatactttcATC	213_1	5151	-16
214	cattgttaacatcaccta	2-10-4	CATTgttaacataCCTA	214_1	5251	-19
215	gcattgttaacatacct	2-12-2	GCattgttaacatacCT	215_1	5252	-18
216	taatattgcaccaaat	2-12-2	TAatattgcaccaaAT	216_1	5295	-13
217	gataatattgcaccaa	2-11-3	GATAatattgcacCAA	217_1	5297	-16
218	agataatattgcacca	2-12-2	AGataatattgcacCA	218_1	5298	-16
219	gccaaagaagataatat	2-10-4	GCcaagaagataATAT	219_1	5305	-17
220	cacagccacataaaact	4-10-2	CACAgccacataaaACT	220_1	5406	-21
221	ttgttaattgtggaaac	2-12-2	TTgttaattgtggAAAC	221_1	5463	-12
222	tgacttgttaattgtgg	2-11-3	TGacttgttaattgTGG	222_1	5467	-18
223	tctaactgaaatagtc	2-12-2	TCtaactgaaatagTC	223_1	5503	-13
224	gtggttcttaactgaaa	3-11-2	GTGgttcttaactgAAA	224_1	5508	-16
225	caatatggacttgggt	2-12-2	CAatatggacttggGT	225_1	5522	-18
226	atgacaatatgggact	3-11-2	ATGacaatatgggACT	226_1	5526	-17
227	tatgacaatatgggac	4-10-2	TATGacaatatgggAC	227_1	5527	-17
228	atatgacaatatggga	4-10-2	ATATgacaatatggGA	228_1	5528	-17
229	cttcacttaataatta	2-11-3	CTtcacttaataaTTA	229_1	5552	-13
230	ctgcttcaacttaataa	4-10-2	CTGCTtcaacttaatAA	230_1	5555	-18
231	aagactgcttcaactta	2-11-3	AAgactgcttcaactTA	231_1	5559	-17
232	gaatgccctaattatg	4-10-2	GAATgccctaattATG	232_1	5589	-19
233	tggaatgccctaatta	3-11-2	TGGaatgccctaattTA	233_1	5591	-19
234	gcaaatgccagtaggt	3-11-2	GCAaatgccagtagGT	234_1	5642	-23
235	ctaatggaaggatttg	3-11-2	CTAatggaaggattTG	235_1	5673	-15

【0414】

【表 5 - 7】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
236	aatatagaacctaaatg	2-12-2	AAtatagaacctaaTG	236_1	5683	-10
237	gaaagaatagaatgtt	3-10-3	GAAagaatagaatGTT	237_1	5769	-12
238	atggtaatagattat	3-11-2	ATGgtaatagattAT	238_1	5893	-15
239	gaaagagcacagggtg	2-12-2	GAAagagcacagggtG	239_1	6103	-18
240	ctacatagaggaaatg	4-10-2	CTACatagaggaaTG	240_1	6202	-18
241	gcttcctacatagagg	2-10-4	GCttcctacataGAGG	241_1	6207	-24
242	tgcttcctacatagag	4-10-2	TGCTtcctacatagAG	242_1	6208	-22
243	tgggcttcaaataatgt	2-11-3	TGggcttcaaataTGT	243_1	6417	-19
244	cattatattaaagaac	3-11-2	CATtattattnaaAG	244_1	6457	-11
245	tccgttatgttatcat	2-10-4	TCggttatgttatTCAT	245_1	6470	-19
246	caacttatctggcgg	2-10-4	CActtatctggTCGG	246_1	6482	-22
247	aaattggcacagcggt	3-10-3	AAAttggcacagcGTT	247_1	6505	-18
248	accgtgacagtaaatg	4-9-3	ACCGtgacagtaATG	248_1	6577	-20
249	tgggaaccgtgacagta	2-13-2	TGggaaaccgtgacagTA	249_1	6581	-22
250	ccacatataaggcctt	2-11-3	CCacatataaggcCTT	250_1	6597	-21
251	catattgttacccata	2-11-3	CAatttgttaccaTAC	251_1	6617	-18
252	tcatattgttacccata	3-10-3	TCAatttgttaccaATA	252_1	6618	-19
253	caatttgttacattgtt	4-8-4	CAATtgttacattTGCT	253_1	6624	-21
254	cattcaattgttacattgt	3-12-3	CATtcaattgttacataTTG	254_1	6626	-18
255	tttctactggaaatttg	4-9-4	TTTCTactggaaATTG	255_1	6644	-20
256	caatttagtgcagccag	3-10-3	CAAttagtgcagcCAG	256_1	6672	-21
257	gaataatgttcttatcc	4-10-3	GAATAatgttcttaTCC	257_1	6704	-20
258	cacaattgttacattgtt	4-13-3	CACAAattgttacattgtTCT	258_1	6709	-20
259	catgcacaattgttacat	4-11-4	CATGcacaattgttacAT	259_1	6714	-20
260	atcctgcaatttcacat	3-11-3	ATCctgcaatttcacAT	260_1	6832	-22
261	ccaccatagctgtatca	2-12-2	CCaccatagctgtatCA	261_1	6868	-22
262	accaccatagctgtatca	2-12-3	ACcaccatagctgtatCA	262_1	6868	-23
263	caccaccatagctgtatca	2-13-2	CAccaccatagctgtatCA	263_1	6869	-21
264	tagtcggcaccaccat	2-12-2	TAGtcggcaccaccAT	264_1	6877	-22
265	ctttagtcggcaccac	1-14-2	CtttagtcggcaccAC	265_1	6880	-21
266	ctttagtcggcaccac	1-13-2	CtttagtcggcaccCA	266_1	6881	-21
267	cgtttgttagtcggcaccac	2-12-2	CGctttgttagtcggcAC	267_1	6883	-21
268	tcaataaaagatcaggc	3-11-2	TCAataaaagatcagGC	268_1	6942	-17
269	tggacttacaagaatg	2-12-2	TGgacttacaagaATG	269_1	6986	-14
270	atggacttacaagaat	3-11-2	ATGgacttacaagaAT	270_1	6987	-15
271	gctcaagaaaattggat	4-10-2	GCTCaagaaaattggAT	271_1	7073	-19
272	tactgttagaacatggc	4-10-2	TACTgttagaacatgGC	272_1	7133	-21
273	gcaattcattgtatct	4-9-3	GCAAttcattgtatCT	273_1	7239	-20
274	tgaagggaggaggacac	2-14-2	TGaaagggaggaggacAC	274_1	7259	-20
275	agtggtaagggaggag	2-13-2	AGtggtaagggaggAG	275_1	7265	-21

10

20

30

40

【0415】

【表5-8】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
276	tagtggtaagggaggag	2-14-2	TAGtgtgaagggaggAG	276_1	7265	-21
277	atagtggtaagggaggag	1-16-2	AtagtggtaagggaggAG	277_1	7265	-20
278	tagtggtaagggagga	2-13-2	TAGtgtgaagggagGA	278_1	7266	-21
279	atagtggtaagggagga	2-14-2	ATagtggtaagggagGA	279_1	7266	-21
280	tagtggtaagggagg	3-11-2	TAGtgtgaagggagGG	280_1	7267	-21
281	atagtggtaagggagg	3-12-2	ATAGtgtgaagggagGG	281_1	7267	-22
282	gatagtggtaagggagg	2-14-2	GAtagtggtaagggagGG	282_1	7267	-21
283	atagtggtaagggag	4-10-2	ATAGtgtgaagggAG	283_1	7268	-20
284	gatagtggtaagggag	2-12-3	GAtagtggtaagggAG	284_1	7268	-21
285	gagatagtggtaagg	2-10-4	GAgatagtggtaAGG	285_1	7271	-20
286	catggagatagtgg	4-10-2	CATGggagatagtGT	286_1	7276	-22
287	acaaataatggttactct	4-10-4	ACAAataatggttaCTCT	287_1	7302	-20
288	acacacaaataatggtt	4-10-4	ACACacacaaataatgTTA	288_1	7306	-20
289	gagggacacacaaataat	3-11-4	GAGggacacacaaaTAAT	289_1	7311	-21
290	atatacataatggttca	4-8-4	ATATagagaggcTCAA	290_1	7390	-21
291	ttgatatacataatggct	2-10-4	TTgatatacataatGGCT	291_1	7393	-20
292	gcatttgcataatagaga	4-9-3	GCATttgcataatAGA	292_1	7397	-20
293	tttgcatttgcataatag	2-11-3	TTtgcatttgcataatAG	293_1	7400	-15
294	ctggaagaataggttc	3-11-2	CTGgaagaataggTC	294_1	7512	-17
295	actggaagaataggtt	4-10-2	ACTGgaagaataggTT	295_1	7513	-18
296	tactggaagaatagg	4-10-2	TACTggaagaataggGT	296_1	7514	-18
297	tggcttatcctgtact	4-10-2	TGGCttatcctgtact	297_1	7526	-25
298	atggcttatcctgtac	2-10-4	ATggcttatcctGTAC	298_1	7527	-22
299	tatggcttatcctgt	4-10-2	TATGgcttatcctgTA	299_1	7528	-22
300	gtatggcttatcctgt	3-10-3	GTAtggcttatcctGT	300_1	7529	-23
301	atgaatatatgccagt	2-11-4	ATgaatatatgccAGT	301_1	7547	-22
302	gatgaatatatgccca	2-10-4	GATgaatatatgCCCA	302_1	7549	-22
303	caagatgaatatatgcc	3-10-4	CAAGatgaatatatGCC	303_1	7551	-21
304	gacaacatcagttataga	4-9-4	GACAacatcagttAGA	304_1	7572	-22
305	caagacaacatcagta	4-8-4	CAAGacaacatcAGTA	305_1	7576	-20
306	cactcctagttccctt	3-10-3	CACtccctagttccTTT	306_1	7601	-22
307	aacactcctagttccct	3-10-3	AACactcctagttCCT	307_1	7603	-22
308	taacactcctagttcc	2-11-3	TAacactcctagttCC	308_1	7604	-20
309	ctaacactcctagttcc	2-12-2	CTaacactcctagttC	309_1	7605	-18
310	tgataacataactgt	2-12-2	TGataacataactTG	310_1	7637	-13
311	ctgataacataactgt	2-10-4	CTgataacataactGT	311_1	7638	-18
312	tttgaactcaagtgac	4-10-2	TTTGAactcaagtgAC	312_1	7654	-16
313	tcctttacttagctag	4-9-3	TCCTttacttagctAG	313_1	7684	-23
314	gagtttggattagctg	2-11-3	GAGtttggattagCTG	314_1	7764	-20

【0416】

【表5-9】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
315	tggatatgacaggga	2-11-3	TGggatatgacagGGA	315_1	7838	-21
316	tgtggatatgacagg	4-10-2	TGTGggatatgacaGG	316_1	7840	-22
317	atatggaagggatatc	4-10-2	ATATggaagggataTC	317_1	7875	-17
318	acaggatatggaaggg	3-10-3	ACAggatatggaaGGG	318_1	7880	-21
319	atttcaacaggatatgg	4-9-4	ATTtcaacaggatATGG	319_1	7885	-20
320	gagtaatttcaacagg	2-11-3	GAgtaatttcaacAGG	320_1	7891	-17
321	aggaggtaatttcaaca	4-9-4	AGGGGagtaatttcaACA	321_1	7893	-22
322	attagggagtaatttca	4-9-4	ATTAgggagtaatTTCA	322_1	7896	-21
323	cttactattaggagt	2-10-4	CTTactattaggGAGT	323_1	7903	-20
324	cagcttactattaggg	2-11-3	CAgcttactattaGGG	324_1	7906	-20
326	atttcagcttactattag	3-11-4	ATTtcagcttactaTTAG	326_1	7908	-20
325	tcagcttactattagg	3-10-3	TCAgcttactattAGG	325_1	7907	-20
327	ttcagcttactattag	2-10-4	TTcagcttactaTTAG	327_1	7908	-17
328	cagatttcaagttact	4-10-2	CAGATttcagcttaCT	328_1	7913	-21
329	gactacaactagaggg	3-11-2	GACTacaactagagGG	329_1	7930	-19
330	agactacaactagagg	4-10-2	AGACTacaactagaGG	330_1	7931	-19
331	aagactacaactagag	2-12-2	AAgactacaactagAG	331_1	7932	-13
332	atgatttaattctagtcaaa	4-12-4	ATGAttttaattctagtCAAA	332_1	7982	-20
333	tttaattctagtcaaa	3-10-3	TTTtaattctagtcaAA	333_1	7982	-12
334	gatttaattctagtca	4-8-4	GATTtaattctaGTCA	334_1	7984	-20
771	tgatttaattctagtca	3-10-4	TGAttttaattctaGTCA	771_1	7984	-20
335	atgatttaattctagtca	4-11-3	ATGAttttaattctagtCA	335_1	7984	-20
336	gatgatttaattctagtca	4-13-2	GATGatttaattctagtCA	336_1	7984	-20
337	gatttaattctagtca	2-10-4	GATTtaattctagtCA	337_1	7984	-18
338	gatgatttaattctagtca	4-11-3	GATGatttaattctagtCA	338_1	7985	-20
339	tgatttaattctagtca	2-12-2	TGatttaattctagtCA	339_1	7985	-13
340	gagatgatttaattctta	4-9-4	GAGATgatttaatTCTA	340_1	7988	-20
341	gagatgatttaattctt	3-10-3	GAGAtgatttaatTCT	341_1	7989	-16
342	cagattgatggtagtt	4-10-2	CAGATTgatggtagTT	342_1	8030	-19
343	ctcagattgatggtag	2-10-4	CTcagattgatggTAG	343_1	8032	-20
344	gttagccctcagattg	3-10-3	GTTagccctcagaTTG	344_1	8039	-23
345	tgtattgttagccctc	2-10-4	TGtattgttagCCCTC	345_1	8045	-24
346	acttgtattgttagcc	2-10-4	ACtgtattgttagGCC	346_1	8048	-22
347	agccagtatcagggac	3-11-2	AGCcaGtatcagggAC	347_1	8191	-23
348	ttgacaatagtggcat	2-10-4	TTgacaatagtggCAT	348_1	8213	-20
349	acaagtggtatcttct	3-10-3	ACAagtggtatctTCT	349_1	8228	-19
350	aatctactttacaagt	4-10-2	AATCTactttacaGT	350_1	8238	-16
351	cacagttagatgcgtata	2-12-4	CAcagttagatgcgtATA	351_1	8351	-24
352	gaacacagttagatgcc	2-11-3	GAacacagttagatGCC	352_1	8356	-21
353	cttggAACACAGTAGAT	4-11-2	CTTGGAACACAGTAGAT	353_1	8359	-20

【0417】

【表5-10】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
354	atatcttggAACACAG	3-10-3	ATAtcttggAACACAG	354_1	8364	-18
355	tctttaatatcttggAAC	3-11-4	TCTttaatatcttggAAC	355_1	8368	-19
356	tgatttcTTAATATCTTg	2-13-4	TGatttcTTAATATCTTg	356_1	8372	-19
357	tgtgatttcTTAAATAC	2-13-4	TGtgtgatttcTTAAATAC	357_1	8375	-18
358	aggctaagtcatgatg	3-11-2	AGGctaagtcatgatg	358_1	8389	-19
359	ttgatgaggctaaAGTC	4-10-2	TTGAAtgaggctaaAGTC	359_1	8395	-19
360	ccaggattataCTT	3-11-2	CCAggattataCTT	360_1	8439	-20
361	gccaggattataCT	2-10-4	GCcaggattataCT	361_1	8440	-23
362	ctGCCaggattataCT	3-11-2	CTGCCaggattataCT	362_1	8442	-21
363	cagaaaacttataCTTATG	4-13-2	CAGAAAacttataCTTATG	363_1	8473	-19
364	aaggcagaaaacttataCT	4-9-4	AAGCagaaaacttataCT	364_1	8478	-20
365	gaagcagaaaacttataCT	3-11-4	GAAGCagaaaacttataCT	365_1	8478	-20
366	tggaaAGCagaaaacttataCT	3-15-2	TGGaaAGCagaaaacttataCT	366_1	8478	-21
367	tggaaAGCagaaaacttataCT	3-13-3	TGGaaAGCagaaaacttataCT	367_1	8479	-20
368	aaggcagaaaacttataCT	2-11-3	AAggcagaaaacttataCT	368_1	8479	-13
369	tggaaAGCagaaaacttataCT	3-11-4	TGGaaAGCagaaaacttataCT	369_1	8480	-21
370	aagggatattatggAG	4-10-2	AAGGgatattatggAG	370_1	8587	-18
371	tgccggaaagatttccT	2-12-2	TGccggaaagatttccT	371_1	8641	-21
372	atggattgggagtaga	4-10-2	ATGGattgggagtaga	372_1	8772	-21
373	agatggattgggagta	2-12-2	AGatggattgggagta	373_1	8774	-18
374	aagatggattgggagt	3-11-2	AAGatggattgggagt	374_1	8775	-18
375	acaagatggattggga	2-10-4	ACAagatggattggga	375_1	8777	-20
375	acaagatggattggga	2-12-2	ACAagatggattggga	375_2	8777	-17
376	agaagggttcagacttt	3-9-4	AGAagggttcagacttt	376_1	8835	-20
377	gcagaagggttcagact	2-11-3	GCagaagggttcagact	377_1	8837	-21
377	gcagaagggttcagact	3-11-2	GCAGAagggttcagact	377_2	8837	-22
378	tgcagaagggttcagac	4-10-2	TGCAgagaagggttcagac	378_1	8838	-22
379	agtgcagaagggttcag	2-11-3	AGTgcagaagggttcag	379_1	8840	-20
379	agtgcagaagggttcag	4-10-2	AGTgcagaagggttcag	379_2	8840	-21
380	aagtgcagaagggttcag	4-10-2	AAGTgcagaagggttcag	380_1	8841	-20
381	taagtgcagaagggttcag	2-10-4	TAagtgcagaagggttcag	381_1	8842	-19
382	tctaagtgcagaagggttcag	2-10-4	TCTaagtgcagaAGGT	382_1	8844	-21
383	ctcaggaggttcacttc	3-12-2	CTCaggaggttcacttc	383_1	8948	-20
384	ctcaggaggttcacttt	3-10-3	CTCaggaggttcacttt	384_1	8949	-21
385	atggaggtgactcaggag	1-15-2	Atggaggtgactcaggag	385_1	8957	-20
386	atggaggtgactcaggag	2-13-2	ATggaggtgactcaggag	386_1	8958	-21
387	atggaggtgactcaggag	2-11-3	ATggaggtgactcaggag	387_1	8959	-21
388	tatggaggtgactcaggag	2-12-3	TAtggaggtgactcaggag	388_1	8959	-21
389	atatggaggtgactcaggag	2-14-2	ATatggaggtgactcaggag	389_1	8959	-21
390	tatggaggtgactcaggag	4-10-2	TATggaggtgactcaggag	390_1	8960	-21

【0418】

【表 5 - 11】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
391	atatggagggtgactcag	2-11-4	ATatggagggtgactTCAG	391_1	8960	-22
392	catatggagggtgactcag	2-14-2	CAtatggagggtgactcAG	392_1	8960	-20
393	atatggagggtgactca	3-10-3	ATAtggagggtgacTCA	393_1	8961	-20
394	catatggagggtgactca	2-12-3	CAtatggagggtgacTCA	394_1	8961	-21
395	catatggagggtgactc	2-10-4	CAtatggagggtgACTC	395_1	8962	-20
396	gcatacatggagggtgactc	2-13-2	GCatatacgagggtgacTC	396_1	8962	-21
397	tgcatacatggagggtgactc	2-14-2	TGcatatacgagggtgacTC	397_1	8962	-21
398	ttgcatacatggagggtgactc	1-16-2	TtgcatatacgagggtgacTC	398_1	8962	-20
399	tttgcatacatggagggtgactc	1-17-2	TttgcatacatggagggtgacTC	399_1	8962	-21
400	gcatacatggagggtgact	2-12-2	GCatatacgagggtgacCT	400_1	8963	-20
401	tgcatacatggagggtgact	2-13-2	TGcatatacgagggtgacCT	401_1	8963	-20
402	ttgcatacatggagggtgact	3-13-2	TTGcatatacgagggtgacCT	402_1	8963	-22
403	tttgcatacatggagggtgact	1-16-2	TttgcatacatggagggtgacCT	403_1	8963	-20
404	tgcatacatggagggtgac	3-11-2	TGCatatacgagggtgAC	404_1	8964	-20
405	ttgcatacatggagggtgac	3-11-3	TTGcatatacgagggtGAC	405_1	8964	-21
406	tttgcatacatggagggtgac	4-12-2	TTTGcatatacgagggtgAC	406_1	8964	-21
407	tttgcatacatggagggtga	4-11-2	TTTGcatatacgagggtGA	407_1	8965	-21
408	tttgcatacatggagggtg	2-10-4	TTtgcatatacgaggGTG	408_1	8966	-21
409	aagtgaagttcaacacgc	2-11-4	AAgtgaagttcaaCAGC	409_1	8997	-20
410	tgggaagtgaagttca	2-10-4	TGggaaagtgaagTTCA	410_1	9002	-20
411	atgggaagtgaagttc	2-11-3	ATgggaagtgaagTTC	411_1	9003	-17
412	gatgggaagtgaagtt	4-9-3	GATGggaaagtgaaGTT	412_1	9004	-21
413	ctgtgatgggaagtgaa	3-11-3	CTGtgatgggaagtGAA	413_1	9007	-20
414	attgagtgaatccaaa	3-10-3	ATTgagtgaatccAAA	414_1	9119	-14
415	aattgagtgaatccaa	2-10-4	AAttgagtgaatCCAA	415_1	9120	-16
416	gataattgagtgaatcc	4-10-3	GATAattgagtgaaTCC	416_1	9122	-20
417	gtgataattgagtgaa	3-10-3	GTGataattgagtGAA	417_1	9125	-16
418	aagaaaaggtgcaataa	3-10-3	AAGaaaaggtgcaaTAA	418_1	9155	-14
419	caagaaaaggtgcaata	2-10-4	CAagaaaaggtgcaATA	419_1	9156	-15
420	acaagaaaaggtgcaat	4-10-2	ACAAAGaaaaggtgcaAT	420_1	9157	-16
421	atttaaaactcacaaac	2-12-2	ATttaaaactcacaaAC	421_1	9171	-10
422	ctgttaggttcagcga	2-10-4	CTgttaggttcagCGA	422_1	9235	-24
423	tctgaatgaacatttgc	4-9-4	TCTGaatgaacatTTCG	423_1	9260	-20
424	ctcattgaagggttgc	2-10-4	CTcattgaagggtCTG	424_1	9281	-20
425	ctaattctcatttgcagg	3-11-2	CTAatctcatttgcagg	425_1	9286	-17
426	ccttaatctcatttgcagg	2-12-2	CCtaatctcatttgcagg	426_1	9287	-16
427	actttgatctttcagc	3-10-3	ACTttgatctttcAGC	427_1	9305	-20
428	actatgcaacactttgc	2-12-2	ACtatacgcaacacttTG	428_1	9315	-15
429	caaatacgctttatcg	3-10-3	CAAatcgctttatCGG	429_1	9335	-17
430	ccaaatagctttatcg	2-10-4	CCaaatagctttATCG	430_1	9336	-19

10

20

30

40

【0419】

【表 5 - 1 2】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID 番号	配列番号 1 上の開始点	dG
431	tccaaatagctttatc	4-10-2	TCCAAaatagctttTC	431_1	9337	-18
432	gatccaaatagctta	4-10-2	GATCaaaatagctTA	432_1	9339	-18
433	atgatccaaatagctt	2-10-4	ATgatccaaataGCTT	433_1	9341	-19
434	tatgatccaaatagct	4-10-2	TATGatccaaatagCT	434_1	9342	-18
435	taaacaggcgtggaat	4-9-4	TAAAacaggcgtggGAAT	435_1	9408	-22
436	acttaaaacaggcgtgg	2-10-4	ACttaaaacaggcgtgg	436_1	9412	-21
437	acacttaaaacaggcgt	2-10-4	ACacttaaaacaggcgt	437_1	9414	-22
438	gaacacttaaaacaggg	4-8-4	GAACacttaaaacAGGG	438_1	9416	-20
439	agagaacacttaaacag	4-9-4	AGAGaacaacttaaaACAG	439_1	9418	-20
440	ctacagagaacactta	4-8-4	CTACagagaacactta	440_1	9423	-20
441	atgctacagagaacact	3-10-4	ATGctacagagaacACT	441_1	9425	-22
442	ataaaatgctacagagaaca	4-11-4	ATAAatgctacagagaACA	442_1	9427	-20
443	agataaaatgctacagaga	2-12-4	AGataaaatgctacaGAGA	443_1	9430	-20
444	tagagataaaatgctaca	4-9-4	TAGAgataaaatgcTACA	444_1	9434	-21
445	tagatagagataaaatgct	4-11-3	TAGAtagagataaaatGCT	445_1	9437	-20
446	caatatacttagatagaga	4-10-4	CAATatacttagataGAGA	446_1	9445	-21
447	tacacaatatacttagatag	4-11-4	TACacaatatacttagATAG	447_1	9448	-21
448	ctacacaatatacttag	3-10-3	CTAcacaatatactAG	448_1	9452	-16
449	gctacacaatatacta	4-8-4	GCTAcacaatataCTA	449_1	9453	-21
450	atatgctacacaatatac	4-10-4	ATATgctacacaatATAC	450_1	9455	-20
451	tgatatgctacacaat	4-8-4	TGATatgctacaCAAT	451_1	9459	-20
452	atgataatgataatgctac	4-9-4	ATGAtatgataatgCTAC	452_1	9464	-21
453	gaggagagagacaataaa	4-10-4	GAGGagagagacaataAA	453_1	9495	-20
454	ctaggaggagagagaca	3-11-3	CTAaggaggagagagACA	454_1	9500	-22
455	tattctaggaggagaga	4-10-3	TATTctaggaggagAGA	455_1	9504	-21
456	ttatattctaggaggag	4-10-3	TTATattctaggagGAG	456_1	9507	-21
457	gtttatattcttaggag	3-9-4	GTTtatattcttaGGAG	457_1	9510	-20
458	tggagtttatattctagg	2-12-4	TGgagtttatattcTAGG	458_1	9512	-22
459	cgtaccaccactctgc	2-11-3	CGtaccaccactCTGC	459_1	9590	-25
460	tgaggaaatcattcattc	4-10-4	TGAGgaaatcattcATTc	460_1	9641	-22
461	tttgaggaaatcattcat	4-10-4	TTTGaggaaatcatTCAT	461_1	9643	-20
462	aggctaatacttatttg	4-10-2	AGGCTaatcctattTG	462_1	9657	-22
463	tttaggctaattcctat	4-8-4	TTTAggctaattcCTAT	463_1	9660	-22
464	tgctccagtgtaccct	3-11-2	TGCtccagtgtaccCT	464_1	9755	-27
465	tagtagtactcgatag	2-10-4	TAGtagtactcgATAG	465_1	9813	-18
466	ctaattgttagtagtactc	3-12-3	CTAattgttagtagtaCTC	466_1	9818	-20
467	tgctaattgttagtagt	2-10-4	TGctaattgttagTAGT	467_1	9822	-19
468	agtgctaattgttagta	4-10-2	AGTGctaattgttagTA	468_1	9824	-19
469	gcaagtgctaattgtta	4-10-2	GCAAgtgctaattgtTA	469_1	9827	-20
470	gaggaaatgaactaattta	4-13-2	GAGGaaaatgaactaattTA	470_1	9881	-18

【0420】

【表5-13】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
471	caggaggaaatgaacta	4-11-2	CAGGaggaaatgaacTA	471_1	9886	-19
472	ccctagagtcatTTCC	2-11-3	CCOctagagtcatTTCC	472_1	9902	-24
473	atcttacatgtatgaagc	3-11-3	ATCttacatgtatgaAGC	473_1	9925	-20
475	agacacactcagatttcag	2-15-2	AGacacactcagatttcAG	475_1	9967	-20
474	gacacactcagatttcag	3-13-2	GACacacactcagatttcAG	474_1	9967	-20
476	aagacacactcagatttcag	3-15-2	AAGacacacactcagatttcAG	476_1	9967	-21
477	agacacacactcagattca	2-13-3	AGacacacactcagattTCA	477_1	9968	-20
478	aagacacactcagatttca	3-13-3	AAGacacacactcagattTCA	478_1	9968	-21
479	aaagacacacactcagatttca	2-14-4	AAagacacacactcagatTTCA	479_1	9968	-20
480	gaaaagacacacactcagatttC	3-14-3	GAAagacacacactcagatTTC	480_1	9969	-20
481	aagacacacactcagatttC	4-11-3	AAGAcacacactcagatTTC	481_1	9969	-21
482	aaagacacacactcagatttC	4-11-4	AAAGAcacacactcagaTTTC	482_1	9969	-20
483	tgaaaagacacacactcagattt	4-14-2	TGAAagacacacactcagatTT	483_1	9970	-20
484	tgaaaagacacacactcagattt	2-13-4	TGaaaagacacacactcaGATT	484_1	9971	-21
485	tgaaaagacacacactcagat	3-12-3	TGAaagacacacactcaGAT	485_1	9972	-20
486	attgaaaagacacacactca	4-10-3	ATTGaaaagacacacactca	486_1	9975	-19
487	tcattgaaaagacacact	2-11-4	TCattgaaaagacaCACT	487_1	9977	-18
488	ttccatcattgaaaaga	3-9-4	TTCCatcattgaAAGA	488_1	9983	-18
489	ataataccacttatcat	4-9-4	ATAAtaccacttaTCAT	489_1	10010	-20
490	ttacttaatttctttgga	2-12-4	TTacttaatttctttTGGA	490_1	10055	-20
491	tttagaacttagcttatca	3-12-3	TTAgaacttagcttaTCA	491_1	10101	-20
492	gaggtacaaaatatagg	3-10-3	GAGgtacaaaatatAGG	492_1	10171	-18
493	cttatgataacaactta	3-10-3	CTTatgataacaacTTA	493_1	10384	-15
494	tcttatgataacaactt	2-11-3	TCttatgatacaaCTT	494_1	10385	-15
495	ttcttatgataacaact	3-11-2	TTCTtatgatacaaCT	495_1	10386	-15
496	cagtttctttagatac	2-11-3	CAgtttctttagatac	496_1	10390	-16
497	gcagtttctttagata	3-11-2	GCAGtttctttagata	497_1	10391	-19
498	tacaaatgtctattagtt	4-12-3	TACAAatgtctattagGTT	498_1	10457	-21
499	tgtacaaaatgtctattag	4-11-3	TGTACaaaatgtctatTAG	499_1	10460	-20
500	agcatcacaatttagta	3-11-2	AGCatcacaatttagTA	500_1	10535	-18
501	ctaattgtatgtatgtat	3-11-2	CTAatgtatgtatgtat	501_1	10548	-17
502	agctaattgtatgtatgtat	3-11-2	AGCtaattgtatgtatgtat	502_1	10550	-16
503	atgccttgacatatta	4-10-2	ATGCcttgacatatta	503_1	10565	-20
504	ctcaagattattgacac	4-9-4	CTCAagattattgACAC	504_1	10623	-20
505	acctcaagattattgtat	2-10-4	ACctcaagattattGTAT	505_2	10626	-18
505	acctcaagattattgtat	3-9-4	ACCtcaagattattGTAT	505_1	10626	-20
506	aacctcaagattattgtat	4-10-2	AACCTcaagattatTG	506_1	10627	-17
507	cacaaacctcaagattattt	4-13-2	CACAAacctcaagatttt	507_1	10628	-20
508	gtacttaatttagacct	3-9-4	GTActtaatttagACCT	508_1	10667	-21
509	agtacttaatttagacc	4-9-3	AGTActtaatttagACC	509_1	10668	-20

【0421】

【表5-14】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
510	gtatgaggtggtaaac	4-10-2	GTATgaggtggtaaAC	510_1	10688	-18
511	aggaaacacgcagaagt	2-11-4	AGgaaaacacgcagaAGTG	511_1	10723	-21
512	gcacaacccagaggaa	2-12-2	GCacaacccagaggAA	512_1	10735	-20
513	caagcacaacccagag	3-11-2	CAAgcacaacccagAG	513_1	10738	-20
514	ttcaaggcacaacccag	3-10-3	TTCaaggcacaaccCAG	514_1	10740	-21
515	aattcaaggcacaaccc	2-10-4	AAttcaaggcacaACCC	515_1	10742	-20
516	taataattcaaggcacaacc	4-13-2	TAATaattcaaggcacaACC	516_1	10743	-20
517	actaataattcaaggcac	4-9-4	ACTAataattcaaGCAC	517_1	10747	-20
518	ataatactaataattcaagc	4-12-4	ATAAtactaataattcAAGC	518_1	10749	-19
519	tagatttgtgaggtaa	2-10-4	TAGatttgtgagGTAA	519_1	11055	-18
520	agccttaattctccat	4-10-2	AGCCtttaattctccAT	520_1	11091	-24
521	aatgatctagagccta	4-9-4	AATGatctagagcCTTA	521_1	11100	-22
522	ctaatgatctagagcc	3-10-3	CTAatgatctagaGCC	522_1	11103	-22
523	actaatgatctagagc	3-9-4	ACTaatgatctaGAGC	523_1	11104	-21
524	cattaacatgttcttatt	3-11-4	CATtaacatgttctTATT	524_1	11165	-19
525	acaagtacattaacatgttc	4-12-4	ACAAgtacattaacatGTTC	525_1	11170	-22
526	ttacaagtacattaacatg	4-11-4	TTACAgtaacatcaaCATG	526_1	11173	-20
527	gctttattcatgtttat	4-9-4	GCTTtattcatgtTTAT	527_1	11195	-22
528	gctttattcatgttta	3-11-2	GCTttattcatgttTA	528_1	11196	-18
529	agagctttattcatgttt	3-13-2	AGAgctttattcatgtTT	529_1	11197	-20
530	ataagagctttattcatg	4-10-4	ATAAgagctttattCATG	530_1	11200	-21
531	cataagagctttattca	4-9-4	CATAagagcttaTTCA	531_1	11202	-21
532	agcataagagctttat	4-8-4	AGCATAagagctTTAT	532_1	11205	-22
533	tagattgttttagtgca	3-10-3	TAGattgttttagtGCA	533_1	11228	-20
534	gtagattgttttagtgc	2-10-4	GTagattgttttagtGC	534_1	11229	-21
535	gacaattctagtagatt	4-9-4	GACAattctagtaGATT	535_1	11238	-21
536	ctgacaattctagtag	3-9-4	CTGacaattctaGTAG	536_1	11241	-20
537	gctgacaattctagta	4-10-2	GCTGacaattctagTA	537_1	11242	-21
538	aggattaagatacgta	2-12-2	AGgattaaagatacgTA	538_1	11262	-15
539	caggattaagatacg	2-11-3	CAggattaagataCGT	539_1	11263	-17
540	tcaggattaagatacg	3-11-2	TCAggattaagataCG	540_1	11264	-16
541	ttcaggattaagatac	2-10-4	TTcaggattaagATAC	541_1	11265	-15
542	aggaagaaaagttgattc	4-10-4	AGGAagaaaagttgATTC	542_1	11308	-21
543	tcaaggaagaaaagttga	4-10-4	TCAAggaagaaaagtTTGA	543_1	11311	-20
544	ctcaaggaagaaaagtttg	4-10-4	CTCAAggaagaaaagTTTG	544_1	11312	-20
545	tgctcaaggaagaaaagt	3-10-4	TGCTcaaggaagaAAGT	545_1	11315	-21
546	aattatgctcaaggaaga	4-11-3	AATTatgctcaaggaAGA	546_1	11319	-20
547	taggataccacattatga	4-12-2	TAGGataccacattatGA	547_1	11389	-22
548	cataatttattccattcctc	2-15-3	CATAatttattccattcCTC	548_1	11449	-22
549	tgcataatttattccat	4-10-3	TGCATAatttattcCAT	549_1	11454	-22

【0422】

【表5-15】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
550	actgcataatttattcc	4-10-3	ACTGcataatttatTCC	550_1	11456	-21
551	ctaaaactgcataatttatt	4-11-4	CTAAactgcataattTATT	551_1	11458	-20
552	ataactaaactgcata	2-10-4	ATaactaaactgCATA	552_1	11465	-16
553	ttattaataactaaactgc	3-12-4	TTAttaataactaaaCTGC	553_1	11468	-19
554	tagtacattattaataact	4-13-2	TAGTacattattaataaCT	554_1	11475	-18
555	cataactaaggacgtt	4-10-2	CATAactaaggacgTT	555_1	11493	-17
556	tcataactaaggacgt	2-11-3	TCataactaaggacGT	556_1	11494	-16
557	cgtcataactaaggac	4-10-2	CGTCataactaaggAC	557_1	11496	-17
558	tcgtcataactaaggaa	2-12-2	TCgtcataactaaggGA	558_1	11497	-16
559	atcgtcataactaagg	2-10-4	ATcgtcataactAAGG	559_1	11498	-17
560	gttagtatcttacatt	2-11-3	GTtagtatcttacATT	560_1	11525	-15
561	ctctattgttagtac	3-10-3	CTCtattgttagtATC	561_1	11532	-17
562	agtatagagttactgt	3-10-3	AGTatagagttacTGT	562_1	11567	-19
563	ttcctggtgatacttt	4-10-2	TTCCtggtgatactTT	563_1	11644	-21
564	gttcctggtgatactt	4-10-2	GTTCctggtgatacTT	564_1	11645	-21
565	tgttcctggtgatact	2-12-2	TGttcctggtgataCT	565_1	11646	-20
566	ataaacatgaatctctcc	2-12-4	ATaaacatgaatctCTCC	566_1	11801	-20
567	ctttataaaacatgaatctc	3-12-4	CTTtataaaacatgaaTCTC	567_1	11804	-19
568	ctgtctttataaaacatg	3-10-4	CTGtctttataaaCATG	568_1	11810	-19
569	ttgttataaaatctgtott	2-12-4	TTgttataaaatctgTCTT	569_1	11820	-18
570	ttaaatttattcttgata	3-12-4	TTAaatttattcttgGATA	570_1	11849	-19
571	cttaaatttattcttgaa	2-12-4	CTtaaatttattctTGGA	571_1	11851	-19
572	cttcctaaatttattcttg	4-13-2	CTTCttaaatttattctTG	572_1	11853	-18
573	tatgtttctcagtaaag	4-9-4	TATGttctcagtaAAAG	573_1	11877	-19
574	gaattatcttaaacca	3-10-4	GAAttatcttaaacCA	574_1	11947	-18
575	cccttaaatttctaca	3-11-2	CCCttaaatttctaCA	575_1	11980	-20
576	acactgctctgtacc	4-10-2	ACACtgccttgtaCC	576_1	11995	-23
577	tgacaacactgctt	3-10-3	TGAcacaactgctCTT	577_1	12000	-21
578	tacatttattggctc	4-10-2	TACAttattgggcTC	578_1	12081	-19
579	gtacatttattggct	2-10-4	GTacatttattgGGCT	579_1	12082	-23
580	ttggtacatttattgg	3-10-3	TTGgtacatttattTGG	580_1	12085	-18
581	catgttggtacattt	4-10-3	CATGttggtacattTAT	581_1	12088	-21
582	aatcatgttggtacat	4-10-2	AATCatgttggtacAT	582_1	12092	-16
583	aaatcatgttggtaca	2-12-2	AAatcatgttggtaCA	583_1	12093	-14
584	gacaagttggattaa	3-11-2	GACaaagtggattAA	584_1	12132	-14
585	aatgttcagatgcctc	2-10-4	AAtgttcagatgCCTC	585_1	12197	-21
586	gcttaatgttcagatg	2-12-2	GCttaatgttcagaTG	586_1	12201	-17
587	cgtacatagctgtat	4-10-2	CGTAcatagcttgatG	587_1	12267	-20
588	gtgaggaatttaggata	3-11-2	GTGaggaatttaggata	588_1	12753	-17
589	gtaacaatatggttt	3-11-2	GTAacaatatggttTG	589_1	12780	-15

【0423】

【表 5 - 16】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
590	gaaatatttagacta	2-11-3	GAaatatttagaCTA	590_1	13151	-14
591	ttgaaatatttagac	3-11-2	TTGaaatatttagAC	591_1	13153	-12
592	aagtcttagtaattgc	2-10-4	AAgtcttagtaatTTGC	592_1	13217	-17
593	gtcagtagattataa	4-10-2	GCTCagtagattatAA	593_1	13259	-17
594	catacaactgtgctaa	3-10-3	CATacactgtgcTAA	594_1	13296	-19
595	atggtctcaaatcatt	3-10-3	ATGgtctcaaatcATT	595_1	13314	-17
596	caatggtctcaaatca	4-10-2	CAATggtotcaaatCA	596_1	13316	-18
597	ttcctattgattgact	4-10-2	TTCCtattgattgaCT	597_1	13568	-20
598	tttctgttcacaacac	4-10-2	TTTCtgttcacaacAC	598_1	13600	-17
599	aggAACCCactaatct	2-11-3	AGgaACCCactaaTCT	599_1	13702	-20
600	taaaatggcaggAACCC	3-11-2	TAAatggcaggAACCC	600_1	13710	-19
601	gtaaaatggcaggAACCC	4-10-2	GTAAtggcaggAACCC	601_1	13711	-20
602	ttgtaaaatggcaggaa	2-11-3	TTgtaaaatggcagGAA	602_1	13713	-16
603	ttatgagttaggcatg	2-10-4	TTatgagttaggCATG	603_1	13835	-19
604	ccaggtgaaactttaa	3-11-2	CCAggtgaaactttAA	604_1	13935	-17
605	cccttagtcagctct	3-10-3	CCCtttagtcagtcCCT	605_1	13997	-30
606	acccttagtcagctcc	2-10-4	ACcccttagtcagCTCC	606_1	13998	-27
607	cacccttagtcagctc	2-11-3	CAcccttagtcagCTC	607_1	13999	-24
608	tctttacttaggctcc	3-10-3	TCTttacttaggcTCC	608_1	14091	-24
609	cctatctgtcatcatg	2-11-3	CCtatctgtcatcATG	609_1	14178	-20
610	tcctatctgtcatcat	3-11-2	TCCTatctgtcatcAT	610_1	14179	-20
611	gagaagtgtgagaagc	3-11-2	GAGaagtgtgagaaGC	611_1	14808	-19
612	catccttgaagtttag	4-10-2	CATCttgaagttAG	612_1	14908	-19
613	taataagatggctccc	3-10-3	TAAtaagatggctCCC	613_1	15046	-21
614	caaggcataataagat	3-11-2	CAAaggcataataagAT	614_1	15053	-14
615	ccaaggcataataaga	2-10-4	CCAaggcataatAAGA	615_1	15054	-18
616	tgatccaattctcacc	2-12-2	TGatccaattctcaCC	616_1	15151	-19
617	atgatccaattctcac	3-10-3	ATGatccaattctCAC	617_1	15152	-19
618	cgccttcatcttcaccc	3-11-2	CGCttcatcttcacCC	618_1	15260	-26
619	tatgacactgcatctt	2-10-4	TATgacactgcaTCTT	619_1	15317	-19
620	gtatgacactgcatct	3-10-3	GTAtgacactgcaTCT	620_1	15318	-21
621	tgtatgacactgcatc	2-10-4	TGtatgacactgCATC	621_1	15319	-20
622	tttotcttcgtaaagtc	4-10-2	TTCTttctgttaagTC	622_1	15363	-19
623	ttctacagaggaacta	2-10-4	TTctacagaggaACTA	623_1	15467	-17
624	actacagtctacaga	3-10-3	ACTacagtctacAGA	624_1	15474	-19
625	ttccccacaggtaaatg	4-10-2	TTCCcacaggtaaaTG	625_1	15561	-21
626	attatttgaatatactcatt	4-12-4	ATTAttgaatatactCATT	626_1	15594	-20
627	tgggaggaaatttttg	4-10-3	TGGGaggaaattatTTG	627_1	15606	-20
628	tgactcatcttaatg	4-10-2	TGACTcatcttaaaTG	628_1	15621	-17
629	ctgactcatcttaat	3-11-2	CTGactcatcttaaAT	629_1	15622	-16

【0424】

【表5-17】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
630	tttactctgactcatc	3-10-3	TTTactctgactcATC	630_1	15628	-17
631	tattggaggaattatt	3-11-2	TATtggaggaattaTT	631_1	15642	-14
632	gtattggaggaattat	3-11-2	GTAttggaggaattAT	632_1	15643	-16
633	tgttatacttctctaagtat	2-15-3	TGgttatacttctctaaggTAT	633_1	15655	-22
634	gatctcttggtatact	4-10-2	GATCtcttggtataCT	634_1	15666	-20
635	cagacaactctatacc	2-12-2	CAgacaactctataCC	635_1	15689	-18
636	aacatcagacaactcta	4-9-4	AACAtcagacaactCTCA	636_1	15693	-21
637	taacatcagacaactc	4-10-2	TAACAtcagacaacTC	637_1	15695	-16
638	tttaacatcagacaactc	4-10-4	TTTAacatcagacaACTC	638_1	15695	-20
639	attnaacatcagacaa	2-12-2	ATtnaacatcagacAA	639_1	15698	-11
640	cctattnaacatcagac	2-11-4	CCtatttnaacatcAGAC	640_1	15700	-20
641	tcccttattnaacatca	3-10-3	TCCcttattnaacatC	641_1	15703	-21
642	tcaacgactattggaat	4-9-4	TCAAAGactatttGAAT	642_1	15737	-20
643	cttatattctggctat	4-9-3	CTTAtattctggcTAT	643_1	15850	-20
644	atcccttatattctggc	4-10-2	ATCCtttatattctgGC	644_1	15853	-23
645	gatccttatattctgg	2-10-4	GAtccttatattCTGG	645_1	15854	-21
646	tgatccttatattctg	3-10-3	TGAtccttatattCTG	646_1	15855	-19
647	attgaaacttgatcct	4-8-4	ATTGaaacttgatCCT	647_1	15864	-21
648	actgtcattgaaaactt	2-10-4	ACtgtcattgaaACTT	648_1	15870	-16
649	tcttactgtcattgaa	3-11-2	TCTtactgtcattgAA	649_1	15874	-16
650	aggatcttactgtcatt	2-11-4	AGgatcttactgtCATT	650_1	15877	-21
651	gcaaatacaactccatc	3-10-3	GCAaatcaactccATC	651_1	15896	-20
652	gtgcaaatacaactcca	3-10-3	GTGcaaatacaactCCA	652_1	15898	-22
653	caattatttcttgc	4-10-3	CAATtatttcttgTGC	653_1	15910	-21
654	tggcaacaattatttott	3-11-4	TGGcaacaattattTCTT	654_1	15915	-21
655	gctggcaacaattatt	3-9-4	GCTggcaacaattATT	655_1	15919	-21
656	atccatttctactgcc	4-10-2	ATCCatttctactgCC	656_1	15973	-24
657	taatatctattgatttcta	4-11-4	TAATatctattgattTCTA	657_1	15988	-20
658	tcaatagtgttagggca	2-12-2	TCAatagtgttagggCA	658_1	16093	-18
659	ttcaatagtgttagggc	3-11-2	TTCaatagtgttaggGC	659_1	16094	-19
660	aggtaatttaattcaatag	4-11-4	AGGTtaatttaattcaATAG	660_1	16102	-21
661	catttgtaatccctag	3-10-3	CATttgtaatcccTAG	661_2	16163	-20
661	catttgtaatccctag	3-9-4	CATttgtaatccCTAG	661_1	16163	-22
662	acatttgtaatcccta	3-10-3	ACAttgtaatccCTA	662_1	16164	-20
663	aacatttgtaatccct	2-10-4	AAcatttgtaatCCCT	663_2	16165	-21
663	aacatttgtaatccct	3-9-4	AAcatttgtaatCCCT	663_1	16165	-22
664	taaatttcaagttctg	2-11-3	TAaatttcaagttCTG	664_1	16184	-14
665	gtttaatttcaagttct	3-11-4	GTttaatttcaagTTCT	665_1	16185	-19
666	ccaaagtttaatttcaag	4-10-4	CCAAAGtttaatttCAAG	666_1	16189	-21
667	acccaagtttaatttc	4-9-4	ACCCaaagtttaatttTTTC	667_1	16192	-22

【0425】

【表5-18】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
668	catacagtgacccaagttt	2-14-3	CAtacagtgacccaagTTT	668_1	16199	-23
669	acatccccatacagtga	2-11-3	ACatccccatacagTGA	669_1	16208	-21
670	agcacagctctacatc	2-10-4	AGcacagctctaCATC	670_1	16219	-22
671	atatagcacagctcta	3-9-4	ATAtagcacagcTCTA	671_1	16223	-21
672	tccatatagcacagct	3-11-2	TCCatatacgacagCT	672_1	16226	-22
673	atttccatatacgaca	3-9-4	ATTtccatatacgACAA	673_1	16229	-20
674	tttattttccatatacgca	4-9-4	TTTAttccatatacgAGCA	674_1	16231	-22
675	tttattttccatatacgca	3-10-3	TTTAttccatatacgAGC	675_1	16232	-18
676	aaggagaggagattatg	4-9-4	AAGGagaggagatTATG	676_1	16409	-21
677	agttcttgtttagct	3-11-2	AGTtcttgtttagCT	677_1	16456	-21
678	gagttcttgtttagc	2-12-2	GAgttcttgtttagGC	678_1	16457	-20
679	attaatttatccatccac	3-10-4	ATTaatttatccatCCAC	679_1	16590	-21
680	atcaattaattatccatc	3-11-4	ATCaattaattatcCATC	680_1	16593	-19
681	agaatcaattaattatcc	3-12-3	AGAatcaattaattatC	681_1	16596	-18
682	tgagataccgtgcatt	2-12-2	TGagataccgtgcattG	682_1	16656	-18
683	aatgagataccgtgcatt	2-10-4	AAtgagataccgtGCAT	683_1	16658	-21
684	ctgtggtaggctaatt	3-11-2	CTGtggtaggctaAT	684_1	16834	-19
685	aagagtaagggtctgtgg	1-17-2	AagagtaagggtctgtggTT	685_1	16842	-21
686	gatgggttaagagtaa	4-9-3	GATGggtaaagagTAA	686_1	16854	-19
687	agcagatgggttaaga	3-11-2	AGCagatgggttaaGA	687_1	16858	-20
688	tgtaaacatttgttagc	2-10-4	TGttaaacatTTGTAGC	688_1	16886	-19
689	cctgcttataaatgtta	3-11-2	CCTgcttataaatgTA	689_1	16898	-19
690	tgcctgcttataat	4-10-2	TGCCctgcttataatAT	690_1	16901	-23
691	tcttcattttcaata	2-12-2	TCTtcttagttcaaaTA	691_1	16935	-15
692	tggtttcttaactacat	2-10-4	TGgtttcttaactACAT	692_1	16980	-18
693	agtttggtttcttaacta	2-12-3	AGtttggtttcttaaCTA	693_1	16983	-19
694	gaatgaaaacttgcctg	3-10-3	GAAtgaaaacttgcCTG	694_1	17047	-18
695	attatccttaoatgat	3-10-3	ATTatccttaoatGAT	695_1	17173	-17
696	gtacccaatttatcctt	2-11-3	GTacccaatttatcCTT	696_1	17180	-21
697	tgtacccaatttatcct	3-10-3	TGTacccaatttatCCT	697_1	17181	-24
698	ttgtacccaatttatcc	2-11-3	TTgtacccaattatC	698_1	17182	-20
699	tttgtacccaatttatc	3-11-2	TTTgtacccaattatTC	699_1	17183	-17
700	agcagcaggttatatt	4-10-2	AGCAgaggttatTT	700_1	17197	-22
701	tgggaagtggctgg	3-10-3	TGGgaagtggctGGG	701_1	17292	-25
702	ctggagagtgataata	3-11-2	CTGgagagtgataaTA	702_1	17322	-17
703	aatgctggattacgtc	4-10-2	AATGctggattacgTC	703_1	17354	-19
704	caatgctggattacgt	2-11-3	CAatgctggattacGT	704_1	17355	-19
705	ttgttcagaagttatcc	2-10-4	TTgttcagaagttATCC	705_1	17625	-19
706	gatgatttgctggag	2-10-4	GAAtgatttgcttGGAG	706_1	17646	-21
707	gaaatcattcacaacc	3-10-3	GAAtcattcacaACC	707_1	17860	-17

【0426】

【表5-19】

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号	配列番号1上の開始点	dG
708	ttgttaacatctactac	3-10-3	TTGtaacatctacTAC	708_1	17891	-16
709	cattaaggcagaaggtt	3-11-2	CATtaaggcagaaggTT	709_1	17923	-17
710	ttactagatgtgagca	3-11-2	TTActagatgtgagCA	710_1	17942	-18
711	tttacttagatgtgagc	2-11-3	TTtacttagatgtgAGC	711_1	17943	-18
712	gaccaaggcacccattaca	3-11-2	GACcaaggcacccattACA	712_1	17971	-22
713	agaccaaggcacccattac	3-10-3	AGAccaaggcacccTAC	713_1	17972	-22
714	atgggttaataaaagg	2-10-4	ATgggttaataaaAAGG	714_1	18052	-15
715	tcaaccagagttattaa	2-12-2	TCaaccagagttattAA	715_1	18067	-13
716	gtcaaccagagttattta	3-11-2	GTCaaccagagttATT	716_1	18068	-18
717	attgttaaagctgatata	2-11-3	ATtgtaaagctgatATA	717_1	18135	-14
718	cacataattgtaaagc	2-10-4	CAcataattgtAAAGC	718_1	18141	-16
719	gaggtctgttatattac	2-11-3	GAggctgttatTTAC	719_1	18274	-19
720	tgttagattcaatgcct	2-11-3	TGtagattcaatgCCT	720_1	18404	-20
721	cctcattatactatga	2-11-3	CCtcatatactaTGA	721_1	18456	-19
722	ccttatgttatgacac	2-12-2	CCttatgttatgacAC	722_1	18509	-18
723	tccttatgttatgaca	4-10-2	TCCTtatgttatgACA	723_1	18510	-22
724	aagatgttaagtata	3-10-3	AAGatgttaagtATA	724_1	18598	-13
725	ctgattattaagatgt	2-10-4	CTgattattaagATGT	725_1	18607	-17
726	tggaaaggatgttatatt	2-12-2	TGgaaaggatgttatTT	726_1	18808	-13
727	acttgaatggcttgg	2-12-2	ACttgaatggcttGA	727_1	18880	-18
728	aacttgaatggcttgg	3-10-3	AACTtgaatggctTGG	728_1	18881	-19
729	caatgtgttactatTT	4-10-2	CAATgtgttactatTT	729_1	19004	-16
730	acaatgtgttactatt	3-10-3	ACAatgtgttactATT	730_1	19005	-15
731	catctgttatataaga	4-10-2	CATCtgttatataAGA	731_1	19063	-18
732	cctagagcaaatactt	4-10-2	CCTAgagcaaatacTT	732_1	19223	-20
733	cagagttaataataag	3-10-3	CAGagttaataatAAG	733_1	19327	-13
734	gttcaaggcacaacgaa	4-10-2	GTTCaaggcacaacgAA	734_1	19493	-18
735	agggttcaaggcacaac	2-11-3	AGgggttcaaggcacAAC	735_1	19496	-18
736	tgttggagacactgtt	2-12-2	TGttggagacactTT	736_1	19677	-17
737	aaggaggagttaggac	3-11-2	AAAGgaggagttaggAC	737_1	19821	-18
738	ctatgccatttacgat	4-10-2	CTATgccatttacgAT	738_1	19884	-21
739	tcaaatgcagaattag	2-12-2	TCaaaatgcagaattAG	739_1	19913	-12
740	agtgacaatcaaatgc	2-10-4	AGtgacaatcaaATGC	740_1	19921	-18
741	aagtgacaatcaaatg	2-11-3	AAAtgacaatcaaATG	741_1	19922	-12
742	gtgttaccaagtaacaa	3-11-2	GTGtaccaagtaacAA	742_1	19978	-16
743	tggatgttaactga	3-10-3	TGGatgttaactTGA	743_1	20037	-20

【0427】

モチーフ配列は、オリゴヌクレオチド中に存在する核酸塩基の連続配列を表す。

【0428】

デザインは、ギャップマークデザイン F - G - F' を指す。各数字は連続した修飾ヌクレオシドの数を表す。2' 修飾ヌクレオシド（第1の数 = 5' 側面）、続いてDNAヌクレオシドの数（第2の数 = ギャップ領域）、続いて修飾ヌクレオシドの数（例えば、標的核酸に相補的である連続した配列の一部ではないDNA及びRNAの更なる反復領域が先行するか又はその後に続く、2' 修飾ヌクレオシド（第3の数 = 3' 側面）を含む。

【0429】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド化合物は、モチーフ配列の特定の設計を表す。大文字は - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドを表す。全ての L N A 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。

【 0 4 3 0 】

【表 6】

表 6：これらのマウス P D - L 1 転写物を標的化するオリゴヌクレオチド（配列番号 4）、及びモチーフ配列に基づいて設計された（C M P ID 番号で示す）特異的オリゴヌクレオチド化合物

配列番号	モチーフ配列	デザイン	オリゴヌクレオチド化合物	CMP ID 番号	配列番号4上 の開始位置	dG
744	agtttacattttctgc	3-10-3	AGTttacattttcTGC	744_1	4189	-20
745	tatgtgaagaggagag	3-10-3	TATgtgaagaggaaGAG	745_1	7797	-19
746	cacctttaaaaacccca	3-10-3	CACctttaaaaccCCA	746_1	9221	-23
747	tcctttataatcacac	3-10-3	TCCtttataatcaCAC	747_1	10386	-19
748	acggtatttcacagg	3-10-3	ACGgtatttcacAGG	748_1	12389	-21
749	gacactacaatgagga	3-10-3	GACactacaatgaGGA	749_1	15088	-20
750	tggtttttaggactgt	3-10-3	TGGtttttaggacTGT	750_1	16410	-21
751	cgacaaaattctatcct	3-10-3	CGAcaaattctatCCT	751_1	18688	-20
752	tgatataacaatgctac	3-10-3	TGAtataacaatgcTAC	752_1	18735	-16
753	tcgttggtaaattta	3-10-3	TCGttggtaaatTTA	753_1	19495	-17
754	tgctttataaatggtg	3-10-3	TGCtttataaaatgGTG	754_1	19880	-19

【 0 4 3 1 】

モチーフ配列は、オリゴヌクレオチド中に存在する核酸塩基の連続配列を表す。

【 0 4 3 2 】

デザインは、ギャップマークデザイン F - G - F' を指す。各数字は連続した修飾ヌクレオシドの数を表す。2' 修飾ヌクレオシド（第 1 の数 = 5' 側面）、続いて D N A ヌクレオシドの数（第 2 の数 = ギャップ領域）、続いて修飾ヌクレオシドの数（例えば、標的核酸に相補的である連続した配列の一部ではない D N A 及び L N A の更なる反復領域が先行するか又はその後に続く 2' 修飾ヌクレオシド（第 3 の数 = 3' 側面）を含む。

【 0 4 3 3 】

オリゴヌクレオチド化合物は、モチーフ配列の特定の設計を表す。大文字は - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドを表す。全ての L N A 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。

【 0 4 3 4 】

10

20

30

【表7】

表7：オリゴヌクレオチドモチーフ配列と、5' ca生体開裂性リンカーを有する、アンチセンス化合物

配列番号	モチーフ配列	caリンカーを有するオリゴヌクレオチド化合物	CMP ID番号
755	caagtttacattttctgc	c _o a _o AGTttacattttcTGC	755_1
756	catatgtgaagaggagag	c _o a _o TATgtgaagaggaGAG	756_1
757	caccttaaaaacccca	c _o a _o CACctttaaaaaccCCA	757_1
758	catccttataatcacac	c _o a _o TCCtttataatcaCAC	758_1
759	caacggtatTTcacagg	c _o a _o ACGgtatTTcacAGG	759_1
760	cagacactacaatgagga	c _o a _o GACactacaatgaGGA	760_1
761	catggtttttaggactgt	c _o a _o TGGtttttaggacTGT	761_1
762	cacgacaaaattctatcct	c _o a _o CGAcaaattctatCCT	762_1
763	catgatatacaatgc tac	c _o a _o TGAtatacaatgcTAC	763_1
764	catcggtggtaaattta	c _o a _o TCGttggtaaatTTA	764_1
765	catgcttataaaatggtg	c _o a _o TGCtttataaaatgGTG	765_1
766	caacaaataatggttactct	c _o a _o ACAAataatggttactCTCT	766_1
767	cacagattgtatggtagtt	c _o a _o CAGAttgtatggtagTT	767_1
768	cacctatthaacatcagac	c _o a _o CCtatttaaacatcAGAC	768_1
769	cactaattgttagtagtactc	c _o a _o CTAattgttagtagtaCTC	769_1
770	caataaacatgaatctcc	c _o a _o ATAaacatgaatctCTCC	770_1

10

20

【0435】

大文字は - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドを表す。全ての L N A C は 5 - メチルシトシンであり、添え字 o はホスホジエステルヌクレオシド間結合を表し、別段の定めがない限り、他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。

【0436】

【表8】

30

表8：G a I N A c コンジュゲートアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物

アンチセンスオリゴヌクレオチドコンジュゲート	CMP ID番号
GN2-C6 _o a _o AGTttacattttcTGC	755_2
GN2-C6 _o a _o TATgtgaagaggaGAG	756_2
GN2-C6 _o a _o CACctttaaaaaccCCA	757_2
GN2-C6 _o a _o TCCtttataatcaCAC	758_2
GN2-C6 _o a _o ACGgtatTTcacAGG	759_2
GN2-C6 _o a _o GACactacaatgaGGA	760_2
GN2-C6 _o a _o TGGtttttaggacTGT	761_2
GN2-C6 _o a _o CGAcaaattctatCCT	762_2
GN2-C6 _o a _o TGAtatacaatgcTAC	763_2
GN2-C6 _o a _o TCGttggtaaatTTA	764_2
GN2-C6 _o a _o TGCtttataaaatgGTG	765_2
GN2-C6 _o a _o ACAAataatggttactCTCT	766_2
GN2-C6 _o a _o CAGAttgtatggtagTT	767_2
GN2-C6 _o a _o CCtatttaaacatcAGAC	768_2
GN2-C6 _o a _o CTAattgttagtagtaCTC	769_2
GN2-C6 _o a _o ATAaacatgaatctCTCC	770_2

40

50

【0437】

G N 2 は、図 3 に示す 3 値の G a l N A c 集落を表し、C 6 は、6 個の炭素を有するアミノアルキル基を表し、大文字は - D - オキシ L N A ヌクレオシドを表し、小文字は D N A ヌクレオシドを表す。全ての L N A C は 5 - メチルシトシンであり、添え字 o はホスホジエステルヌクレオシド結合を表し、別段の定めがない限り、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。幾つかの分子を表す化学図面は、図 4 から図 8 に示す。

【0438】

A A V / H B V マウスモデル

パストールモデル：

10

パストール研究所 (Institut Pasteur) で、H L A - A 2 . 1 - / H L A - D R 1 - トランシジェニック H - 2 クラス I - / クラス I I - ノックアウトマウス (本明細書中では H L A - A 2 / D R 1 マウスと呼ばれる) を作成し、飼育した。これらのマウスは、マウス M H C 応答に何ら干渉することのない、ヒト免疫機能試験用のインビボ実験モデルである (Pajot et al 2004 Eur J Immunol. 34(11): 3060-9)。

【0439】

これらの研究では、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、複製能 H B V D N A ゲノムを保有する A A V 血清型 2 / 8 を使用した。A A V - H B V ベクター (バッヂGVNP # 6 1 6 3) を、 5×10^{11} v g / m L の力価に達するように滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で希釈した。この希釈溶液 1 0 0 μ L (用量 / マウス : 5×10^{10} v g) を、マウスの尾静脈に静脈内 (i . v .) 注射した。H B V - キャリアマウスの血液中に、H B V D N A を含有する完全なウイルス粒子が検出された。血中 H B V 循環タンパク質 H B e 抗原及び H B s 抗原と共に、肝臓において H B c 抗原が最大 1 年間検出された。全ての A A V 2 / 8 - H B V 形質導入マウスにおいて、血清中の H B s 抗原、H B e 抗原、及び H B V D N A が少なくとも 1 年間持続した (Dion et al 2013 J Virol 87: 5554-5563)。

20

【0440】

上海モデル：

このモデルでは、H B V ゲノム (A A V / H B V) を保有する組み換えアデノ随伴ウイルス (A A V) で感染したマウスは、30 週間を超えて安定なウイルス血症及び抗原血症を維持する (Dan Yang, et al. 2014 Cellular & Molecular Immunology 11, 71-78)。

30

【0441】

特異的な病原体を含まない雄の C 5 7 B L / 6 マウス (4 ~ 6 週齢) を、S L A C (Shanghai Laboratory Animal Center of Chinese Academy of Sciences) から購入し、動物飼育施設の個別換気ケージに収容した。WuXi IACUC (所内動物実験委員会、WUXI IACUC プロトコール番号R20131126-Mouse) に指示されている動物の飼育・利用に関するガイドラインを遵守した。マウスを 3 日間新しい環境に順応させ、実験的デザインに従って分類した。

【0442】

組み換え A A V - H B V を、P B S (注射当たり 2 0 0 μ L) で希釈した。この組み換えウイルスは、H B V ゲノム (遺伝子型 D、血清型 a y w) の 1 ~ 3 コピーを保有する。

40

【0443】

0 日目に、全てのマウスの尾静脈に、2 0 0 μ L の A A V - H B V を注射した。A A V 注射後の 6 日目、13 日目及び 20 日目に、全てのマウスを頸下で採血し (0 . 1 m l 血液 / マウス) 、血清を採取した。注射後 22 日目に、ウイルス血症が安定なマウスにおけるオリゴヌクレオリゴヌクレオチド処置の準備が整った。オリゴヌクレオチドは、非結合型又は G a l N A c 結合型とすることができます。

【0444】

D N A ワクチン

プラスミド D N A は、エンドトキシン不含で、Plasmid-Factory (Germany) で製造され

50

た。pCMV-S2.Sは、HBs抗原（遺伝子型D）のプレS2ドメイン及びSドメインをコードし、その発現はサイトメガロウイルス即時初期遺伝子プロモーターによって制御される（Michel et al 1995 Proc Natl Acad Sci U S A 92: 5307-5311）。pCMV-HBcは、肝炎コア（HBc）抗原を保有するHBVキャプシドをコードする（Dion et al 2013 J Virol 87: 5554-5563）。

【0445】

ここに記載されているように、DNAワクチンでの治療を行った。ワクチン接種の5日前に、カルジオトキシン（CaTx、Latoxan refL81-02、50μl / 筋肉）を、マウスの筋肉に注射した。CaTxは、筋肉線維を脱分極させて細胞変性を誘導し、注射後5日目には新しい筋繊維が現われ、DNAワクチンの投与によって、トランスフェクション効果を改善するものである。pCMV-S2.S ayw及びpCMVCoreをそれぞれ1mg / mlで等量で混合し、以前にMichel et al 1995 Proc Natl Acad Sci U S A 92: 5307-5311に記載されているように、麻酔（100μLの12.5mg / mLケタミン、1.25mg / mLキシラジン）下、カルジオトキシン処理した前脛骨筋への両側筋肉注射によって合計100μgを各マウスに投与した。

【0446】

抗PD-L1抗体

これは、Genetech社で内部的に產生されたマウス抗マウスPD-L1 IgG1抗体クローン6E11であり、Atezolizumabをブロックし、同様のインビトロでのブロッキング活性を有する代理抗体であり、ロッシュ（Roche）で内部的に產生されるアテゾリズマブである。抗体は、12.5μg / gの用量で腹腔内（i.p.）注射によって投与された。

【0447】

オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド合成は、当該技術分野において概ね公知である。以下は適用可能なプロトコールである。本発明のオリゴヌクレオチドは、使用される器具、支持体及び濃度の点で僅かに変化する方法によって製造されたものであってもよい。

【0448】

Oligomaker 48上でホスホルアミダイト法を使用して、ウリジンユニバーサル支持体上で、1μmolスケールでオリゴヌクレオチドを合成する。合成終了時に、オリゴヌクレオチドを、水性アンモニアを使用して60で5~16時間、固体支持体から開裂させる。オリゴヌクレオチドは、逆相HPLC（RP-HPLC）又は固相抽出によって精製され、UPLCによって特徴付けられ、分子量はESI-MSによって更に確認される。

【0449】

オリゴヌクレオチドの伸張：

5'-O-DMT保護アミダイトのアセトニトリル溶液（0.1M）、及びDCI（4,5-ジシアノイミダゾール）のアセトニトリル溶液（0.25M）を活性化剤として使用して、-シアノエチル-ホスホラミダイト（DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-メチル-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf）、又はLNA-T）のカップリングを行った。最終サイクル用に、所望の修飾を有するホスホラミダイトを使用できる。結合基を結合させるためのC6リンカー、又は結合基である。ホスホロチオエート結合の導入のためのチオール化は、水素化キサンタン（アセトニトリル/ピリジン9:1中0.01M）を使用して実施する。フォスフォジエステル結合は、THF/ピリジン/水（7:2:1）中の0.02Mヨウ素を使用して導入できる。残りの試薬は、オリゴヌクレオチドの合成に典型的に使用される試薬である。

【0450】

固相合成後の結合に備えて、市販のC6アミノリンカーホスホルアミダイトを固相合成の最後のサイクルで使用して、脱保護及び固体支持体からの開裂の後、アミノ結合脱保護オリゴヌクレオチドを単離させることができる。標準的な合成方法を使用することで、官

10

20

40

50

能基の活性化を介してコンジュゲートが導入される。

【0451】

あるいは、国際出願PCT/EP2015/073331号明細書又は欧州特許出願公開第15194811.4号明細書に記載されているように、GalNAc-もしくはGalNAc集落のホスホラミダイトを用いることにより、結合部分を依然として固体支持体上に存在させながら、オリゴヌクレオチドに添加させることが可能である。

【0452】

R P - H P L C による精製：

粗化合物を、Phenomenex Jupiter C18の $10\ \mu 150 \times 10\text{ mm}$ カラムでの分取R P - H P L C によって精製する。0.1M酢酸アンモニウムpH8及びアセトニトリルを、5 mL / 分の流速で緩衝液として使用する。収集した画分を凍結乾燥して、典型的には白色固体として精製化合物を得る。10

【0453】

略語：

D C I : 4 , 5 - ジシアノイミダゾール

D C M : ジクロロメタン

D M F : ジメチルホルムアミド

D M T : 4 , 4 ' - ジメトキシトリチル

T H F : テトラヒドロフラン

B z : ベンゾイル

I b u : イソブチリル

R P - H P L C : 逆相高速液体クロマトグラフィー

【0454】

T_m アッセイ

オリゴヌクレオチド及びRNA標的(リン酸結合、PO)二本鎖を、500mLのRNアーゼ不含水中で3mMに希釈し、500mLの $2 \times T_m$ 緩衝液(200mMのNaCl、0.2mMのEDTA、20mMのリン酸ナトリウム、pH7.0)と混合する。溶液を95度で3分間加熱し、次いで室温で30分間アニールさせる。PE Templabソフトウェア(Perkin Elmer)を用いたPeltier温度プログラマーPTP6を備えたLambda 40 UV/VIS分光光度計で、二本鎖融解温度(T_m)を測定する。温度を20から95まで上昇させ、次いで25まで下げ、260nmで吸収を記録する。一次導関数、ならびに融解及びアニーリングの両方の極大値を使用して、二本鎖 T_m を評価する。30

【0455】

組織特異的インビボリンカー開裂アッセイ

試験される生体開裂性リンカー(例えば、DNAホスホジエステルリンカー(POリンカー))を有するFAM標識オリゴヌクレオチドは、関連する組織(例えば、肝臓又は腎臓)及び血清のホモジネートを使用してインビトロで開裂される。

【0456】

組織及び血清試料を好適な動物(例えば、マウス、サル、ブタ又はラット)から収集し、ホモナイゼーション緩衝液(0.5%のIgepal CA-630、25mMのTris pH8.0、100mMのNaCl、pH8.0(1規定のNaOHで調整))。組織ホモジネート及び血清を200 $\mu\text{g}/\text{g}$ 組織の濃度までオリゴヌクレオチドでスパイクした。試料を37度で24時間インキュベートし、その後、試料をフェノール-クロロホルムで抽出する。Dionex DNAPac p-100カラム及び10mM~1Mの過塩素酸ナトリウム(pH7.5)の勾配を用い、Dionex Ultimate 3000で、この溶液のAIE HPLC分析を行う。蛍光検出器(615nm)及びUV検出器(260nm)の両方を使用して、標準物質に対する開裂及び非開裂オリゴヌクレオチドの含量を定量する。40

【0457】

S1ヌクレアーゼ感受性アッセイ

S1ヌクレアーゼ感受性リンカー(例えば、DNAリン酸ジエステルリンカー(POリ50

ンカー））を用いた F A M 標識オリゴヌクレオチドを、S 1 ヌクレアーゼ抽出物又は血清中でインビトロ開裂させる。

【 0 4 5 8 】

ヌクレアーゼ緩衝液（60 U / 100 μL）中の S 1 ヌクレアーゼで、100 μM のオリゴヌクレオチドに対してインビトロ開裂を 20 分間及び 120 分間行う。緩衝液に EDTA を加えることによって酵素活性を中断させる。Dionex DNApac p-100カラム及び 10 mM ~ 1 M の過塩素酸ナトリウム（pH 7.5）の勾配を用い、Dionex Ultimate 3000で、この溶液の AIE HPLC 分析を行う。蛍光検出器（615 nm）及び UV 検出器（260 nm）の両方を使用して、標準物質に対する開裂及び非開裂オリゴヌクレオチドの含量を定量する。

10

【 0 4 5 9 】

肝臓単核細胞の調製

Tupin et al 2006 Methods Enzymol 417: 185-201に記載されている方法に若干の修正を加えて、AAV / HBV マウス由来の肝細胞を調製した。安樂死させた後のマウスの肝臓に、G 25 ニードル付きのシリンジを使用して、門脈経由で滅菌 PBS 10 ml を灌流させた。臓器が蒼白のときは、その臓器を、ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）（GIBCO（登録商標）HBSS、24020）+ 5 % の胎児牛胎仔血清（FCS）で採取した。採取された肝臓を 100 μm 細胞ストレーナー（BD Falcon、352360）に通してゆっくりと加圧し、30 ml の HBSS + 5 % FCS 中に細胞を懸濁させた。細胞懸濁液を 5 分間 50 g で遠心分離させた後、上清を 4° にて 10 分間 289 g で遠心分離させた。遠心分離後、上清を捨て、ペレットを 35 % 等張パーコール溶液（GE Healthcare Percoll#17-0891-01、RPMI 1640（GIBCO、31870）に希釈）中で室温にて 15 ml 単位で再懸濁させ、15 ml チューブに移した。細胞を更に室温にて 25 分間 1360 g で遠心分離させた。上清を吸引により捨て、単核細胞を含有するペレットを、HBSS + 5 % FCS で 2 回洗浄した。

20

【 0 4 6 0 】

10 % の FCS（Hyclone, #SH30066、ロットAPG21570）、100 U / mL のペニシリン + 100 μg / mL のストレプトマイシン + 0.3 mg / mL の L - グルタミン（Gibco, 10378）、1 × 非必須アミノ酸（Gibco, 11140）、10 mM の Hepes（Gibco, 15630）、1 mM のピルビン酸ナトリウム（Gibco, 11360）及び 50 μM の - メルカプトエタノール（LKB, 1830））を補給した 最小必須培地（Gibco, 22571）からなる完全培地中で、細胞を培養した。

30

【 0 4 6 1 】

細胞の表面標識

細胞を U 底 96 ウェルプレート中に播種し、PBS FACS（1 % ウシ血清アルブミンと 0.01 % アジ化ナトリウムとを含有する PBS）で洗浄した。ラット抗マウス CD 16 / CD 32 抗体と生存マーカー LD フィクサブルイエロー（Thermofisher, L34959）とを含有する 5 μL の PBS FACS で、4° の暗所で細胞を 10 分間インキュベートした。次いで、NK P 46 BV 421（ラット Mab 抗マウス NK P 46、Biolegend, 137612）及び F 4 / 80（ラット Mab 抗マウス F 4 / 80 FITC、BD Biolegend, 123108）に対するモノクローナル抗体（Mab）を含有する 25 μL の PBS FACS で 4° の暗所にて細胞を 20 分間染色し、また、2 つの補足的面マーカー：PDL1（ラット Mab 抗マウス PDL1 PE、BD Biosciences, 551892）及び PDL1（ラット Mab 抗マウス PDL1 BV 711、Biolegend, 124319）を添加した。

40

【 0 4 6 2 】

細胞内サイトカイン染色（ICS）アッセイ

脾細胞及び肝臓単核細胞の両方で ICS アッセイを実施した。細胞を U 底 96 ウェルプレートに播種した。細胞を入れたプレートを、陰性対照としての完全培地単独で、又は表 9 に記載のペプチドとの併用のいずれかで、37° にて 2 μg / mL の濃度で一晩インキュベートした。インキュベーションの 1 時間後に、2 μg / mL のプレフェルジン A（Sigma, B6542）を添加した。

50

【 0 4 6 3 】

一晩培養した後の細胞を P B S F A C S で洗浄し、ラット抗マウス C D 1 6 / C D 3 2 抗体と生存マーカー L D 定着性黄色 (Thermofisher, L34959) とを含有する 5 μ L の P B S F A C S と共に、4 の暗所で 10 分間インキュベートした。次いで、4 の暗所にて、M a b を含有する P B S F A C S 2 5 μ L で細胞を 20 分間染色した。この混合物は、C D 3 (ハムスター M a b 抗マウス C D 3 - P e r C P、BD Biosciences, 553067)、C D 8 (ラット M a b 抗マウス C D 8 - A P C - H 7、BD Biosciences, 560182)、C D 4 マウス C D 4 - P E - C y 7、BD Biosciences, 552775) 及び N K 細胞 (R a t M a b 抗マウス N K P 4 6 B V 4 2 1、Biolegend, 137612) に対するモノクローナル抗体で構成されていた。細胞を数回の洗浄後に固定し、室温の暗所にて C y t o f i x / C y t o p e r m で 20 分間透過化処置してから、4 にて P e r m / W a s h 溶液 (BD Biosciences, 554714) で洗浄した。

【 0 4 6 4 】

4 の暗所で、I F N (ラット M a b 抗マウス I F N - A P C、クローン X M G 1 . 2、BD Biosciences, 554413) 及び腫瘍壊死因子 (T N F) (ラット M a b 抗マウス T N F - F I T C、クローン M P 6 - X T 2 2 ; 1 / 2 5 0 (BD Biosciences 554418) に対する抗体で、細胞内サイトカインを 30 分間染色した。MACSQuant Analyzerを使用してフローサイトメトリーで分析するに先立ち、細胞を P e r m / W a s h で洗浄し、1 % ホルムアルデヒド含有の P B S F A C S 中に再懸濁させた。

【 0 4 6 5 】

生存細胞 C D 3 + C D 8 + C D 4 - 及び C D 3 + C D 8 - C D 4 + をゲートし、ドットプロット上に提示した。各サイトカインの陽性細胞に対して 2 つの領域をゲートするよう定義した。これらゲート内の事象の検出数を親の母集団内の事象総数で除算して、T 細胞の応答率を算出した。各マウスについて、培地単独で得られたパーセンテージをバックグラウンドと見なし、これをペプチド刺激で得られたパーセンテージから減算した。

【 0 4 6 6 】

実験のバックグラウンド (すなわち、培地単独状態と 2 つの標準偏差における、群毎に得られた染色細胞の平均パーセンテージ) に従って、陽性の閾値を定義した。少なくとも 5 つの事象を表すサイトカインのパーセンテージのみを、陽性と見なした。

【 0 4 6 7 】

10

20

30

【表9】

表9：HBVコアタンパク質及びHBs抗原(S2+S)のエンベロープドメイン中に含まれるHLA-A2/DR1制限エピトープ。

タンパク質	開始位置	終了位置	配列	HLA拘束性	参考文献
コア	18	27	FLPSDFFPSV (配列ID番号:773)	A2	Bertoletti et al Gastroenterology 1997; 112: 193-199
	111	125	GRETIVLEYLVSFGVW (配列ID番号:774)	DR1	(Bertoletti et al Gastroenterology 1997; 112: 193-199)
エンベロープ (S2+S)	114	128	TTFHQTLQDPRVRGL (配列ID番号:775)	DR1	Pajot et al Microbes I nfect 2006; 8: 2783-27 90.
	179	194	QAGFFLLTRILTIPQS (配列ID番号:776)	A2 + DR1	Pajot et al Microbes I nfect 2006; 8: 2783-27 90.
	183	191	FLLTRILTI (配列ID番号:777)	A2	Sette et al J Immunol 1994; 153: 5586-5592.
	200	214	TSLNFLGGTTVCLGQ (配列ID番号:778)	A2 + DR1	Pajot et al Microbes I nfect 2006; 8: 2783-27 90.
	204	212	FLGGTTVCL (配列ID番号:779)	A2	Rehermann et al J Exp Med 1995; 181: 1047-10 58.
	335	343	WLSLLVPFV (配列ID番号:780)	A2	Nayersina et al J Immunol 1993; 150: 4659-467 1.
	337	357	SLLVPFVQWFVGLSPTVWLSV (配列ID番号:781)	A2 + DR1	Loirat et al J Immunol 2000; 165: 4748-4755
	348	357	GLSPTVWLSV (配列ID番号:782)	A2	Loirat et al J Immunol 2000; 165: 4748-4755
	370	379	SILSPFLPLL (配列ID番号:783)	A2	Mizukoshi et al J Immunol 2004; 173: 5863-58 71.

【0468】

実施例1：インビトロ有効性の試験

主として16～20merのギャップマーを使用して、ヒトPDL1転写産物全体に対して遺伝子ウォーク(gene walk)を実施した。有効性試験は、ヒト白血病単球細胞系統THP1及びヒト非ホジキンリンパ腫細胞系統(KARPAS-299)における、インビトロ実験で行った。

【0469】

細胞系統

THP1及びKarpas-299細胞系統は、当初ECACC(European Collection of Authenticated Cell Cultures)から購入し、加湿インキュベーター内で、供給者が推奨するように37℃にて5%CO₂で維持した。

【0470】

オリゴヌクレオチドの効果

THP-1細胞(RPMI-GLutamax中3.104、10%FBS、1%Pen-Stre

10

20

30

40

50

p (Thermo Fisher Scientific) をオリゴヌクレオチド (4 ~ 5 μ l) に添加し、これを 96 ウェル丸底プレートに入れ、最終容量 100 μ l / ウェルで 6 日間培養した。オリゴヌクレオチドを、単一濃度 (20 μ M) にて、及び 25 μ M ~ 0.004 μ M (1 : 3 希釈の水溶液) の用量範囲濃度にて、スクリーニングした。MagNA Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit (MagNA Pure 96 System (Roche Diagnostics)) をメーカーの指示に従って使用して、総 mRNA を抽出した。遺伝子発現解析用に、内因性対照として使用されるヒト PDL1 及び ACTB を標的化する予備設計済のTaqmanプライマー (Thermo Fisher Scientific) を用い、QuantStudioマシン (Applied Biosystems) で、TaqMan RNA-to-cDNA 1-Stepキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して RT - qPCR を行った。相対的な PDL1 の mRNA 発現レベルは、 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ 法及び対照試料 (非処置細胞) と比較した割合 (%) としての阻害パーセンテージを使用して計算された。
10

【 0471 】

Karpas-299 細胞を、RPMI 1640、2 mM グルタミン及び 20 % FBS (Sigma) 中で培養した。この細胞を 96 ウェルプレートに 10000 細胞 / ウェルで播種し、24 時間インキュベートした後、PBS 中に溶解させたオリゴヌクレオチドを添加した。オリゴヌクレオチドの最終濃度は、単回用量 5 μ M、最終培養容量にて 100 μ l / ウェル、あるいは、100 μ L 培養容量中、50 μ M、15.8 μ M、5.0 μ M、1.58 μ M、0.5 μ M、0.158 μ M、0.05 μ M、0.0158 μ M の範囲用量反応で添加した。オリゴヌクレオチド化合物を添加した後の 3 日目に細胞を採取し、PureLink Pro 20 RNA Purificationキット (Ambion) をメーカーの指示に従って使用して、RNA を抽出した。M-MLT 逆転写酵素、RETROscript、RNアーゼ阻害剤 (Ambion) 及び 100 mM の dNTP セット (Invitrogen, PCR Grade) を使用して cDNA を合成した。遺伝子発現解析用に、PDL1 (Applied Biosystems; Hs01125299_m1) 及び TBP (Applied Biosystems; 4325803) 用のTaqManプライマーアッセイを用いたデュプレックスセットアップで、TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X) (Ambion) を使用して qPCR を行った。相対的な PDL1 の mRNA 発現レベルを対照試料 (PBS 中で処置された細胞) の % として、表 10 に示す。

【 0472 】

【表10-1】

表10：THP1及びKARPAS-299細胞系における抗PD-L1化合物のインビトロ有効性（n=3回の実験の平均）。PD-L1のmRNAレベルは、KARPAS-299細胞中のTBP、又はTHP1細胞中のACTBに対して正規化され、対照（PBS処置細胞）に対する%として示される。

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
4_1	50	1	32	11	TAattggctctacTGC	236
5_1	25	5	9	6	TTCGataagaatgaCT	371
6_1	29	2	15	5	TGaacacacacgtcgCA	382
7_1	27	7	3	1	CTGaacacacacagtCGC	383
8_1	23	4	11	3	TCTgaacacacacagtCG	384
9_1	32	3	19	6	TTCTgaacacacacagTC	385
10_1	57	5	39	16	ACaaagtcatgtttaCTA	463
11_1	75	5	37	12	ACacaaggcatgttAC	465
12_1	22	2	10	3	CTtacttagatgcTGC	495
13_1	33	4	23	11	ACttacttagatgCTG	496
14_1	33	7	21	6	GACttacttagatgCT	497
15_1	41	6	18	10	AGacttacttagaTGC	498
16_1	96	14	40	7	GCAggaagagactTAC	506
17_1	22	2	9	3	AATAaattccgttCAGG	541
18_1	34	6	21	9	GCAAataaaattcCGTT	545
18_2	51	4	27	11	GCAaataaaattccGTT	545
19_1	38	5	23	7	AGCAaataaaattcCGT	546
20_1	73	8	56	15	CAGAgcaaataaaatTCC	548
21_1	83	8	65	10	TGGAcagagcaaataAAAT	551
22_1	86	6	80	8	ATGGacagagcaAATA	554
23_1	44	4	30	2	CAgaatggacacGCA	558
24_1	63	10	40	11	TTCTcagaatggacAG	562
25_1	31	1	39	5	CTGAacttgacATAG	663
26_1	60	4	56	19	AAgacaaccccagactTGA	675
27_1	36	4	34	10	TATAagacaaccccAGAC	678
28_1	40	4	28	13	TTATAagacaacaccCAGA	679
29_1	30	2	18	6	TGTTataagacaaaCCC	682
30_1	77	3	67	10	TAGAacaatggtaCTTT	708
31_1	81	17	20	14	GTAGaacaatggtaCT	710
32_1	29	5	14	8	AGGtagacaatgGTA	712
33_1	32	1	43	20	AAGAggttagacaATGG	714
34_1	70	4	35	13	GCatccacagtaaaTT	749
35_1	83	2	66	21	GAaggttatttaaTTC	773
36_1	18	2	15	5	CTAAAtcgaatgcaGCA	805

【0473】

【表10-2】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
37_1	64	7	35	10	TACccaatctaatCGA	813
38_1	69	1	49	13	TAGttacccaatcTAA	817
39_1	49	5	26	9	CATtttagttacccAAT	821
40_1	23	7	8	2	TCAAttagttaccCAA	822
41_1	24	6	12	3	TTcattttagttaCCCA	823
42_1	51	7	40	5	GAATtaatttcattTAGT	829
43_1	71	9	45	3	CAGTgaggaattaATT	837
44_1	60	5	45	17	CCAAcagtgaggAATT	842
45_1	63	1	37	15	CCCaacagtgaggAAT	843
46_1	31	3	29	12	TAtacccaaacagtgAGG	846
47_1	44	3	27	0	TTatacccaacagTGAG	847
48_1	38	3	26	6	TTTatacccaacagTGA	848
49_1	20	4	7	1	CCTtttataccaaCAG	851
50_1	22	3	6	2	TAACcttatacCCAA	854
51_1	28	1	29	16	AATAacctttataCCCA	855
52_1	80	11	48	10	GTAaataaacctttaTA	859
53_1	54	4	37	14	ACTGtaaataaacctTTAT	860
54_1	81	4	53	15	ATAtatatgcaatgAG	903
55_1	86	12	70	15	AGatatatatgcaaTG	905
56_1	56	8	27	7	GAGatatatatgcAAT	906
57_1	28	7	13	5	CCagagatataATGC	909
58_1	88	13	69	23	CAATattccagagATAT	915
59_1	29	3	14	6	GCAAtattccagagATA	916
60_1	25	3	14	3	AGCaatattccagaGAT	917
61_1	29	4	17	2	CAGcaatattccAGAG	919
62_1	27	3	14	3	AATCagcaatattCCAG	921
63_1	23	6	12	6	ACAAtcagcaataTTCC	923
64_1	53	9	43	15	ACTaagttagttacactTCT	957
65_1	32	5	14	6	CTAAgttagttacactTC	958
66_1	35	4	31	6	GACtaagttagttacactTT	959
67_1	64	10	55	14	TGActaagttagtTACA	962
68_1	62	11	57	16	CTTTgactaagttagTTA	964
69_1	42	9	59	13	CTCtttgactaagTAG	967
70_1	81	6	56	12	GCTCtttgactaagTA	968
71_1	27	3	39	9	CCttaaataactgtTGAC	1060
72_1	75	5	36	7	CTtaaataactgttgAC	1060
73_1	35	6	43	13	TCCttaaataactgTTG	1062

【0474】

【表10-3】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
74_1	57	4	79	25	TCTCcttaaatactgTT	1063
75_1	53	6	28	6	TAtcatagttctCCTT	1073
76_1	26	4	9	2	AGTatcatagttTC	1075
77_1	74	5	39	12	GAgtatcatagttCTC	1076
78_1	49	5	35	6	AGagtatcatagTTCT	1077
78_2	74	6	36	8	AGAgtatcatagttTCT	1077
79_1	19	2	19	13	CAGagtatcatagTTC	1078
80_1	23	2	26	2	TTCAgagtatcataGT	1080
81_1	35	3	36	11	CTTcagagtatcATAG	1081
82_1	24	6	20	7	TTCTtcagagtatcATA	1082
83_1	20	2	16	2	TTTcttcagagtaTCAT	1083
84_1	33	4	37	10	GAGAAaggctaagTTT	1099
85_1	42	2	35	18	GAcaactttgttaCATT	1213
86_1	50	4	54	8	TGagacactttgttacA	1215
87_1	50	8	28	8	TGagacacttttgTAC	1216
88_1	61	4	33	6	CTtttattaaactCCAT	1266
89_1	71	8	43	12	ACCAaactttattaAA	1272
90_1	62	5	42	9	AAACctctactaagTG	1288
91_1	22	3	12	5	AGattaagacagtTGA	1310
92_1	46	3	ND	ND	AAgtaggagcaagaGGC	1475
93_1	42	4	60	24	AAAGtaggagcaagAGG	1476
94_1	86	15	46	10	GTtaaggccaggAG	1806
95_1	66	6	82	27	AGggtaggatgggtAG	1842
96_1	83	19	62	36	AAGggtaggatggTA	1843
97_1	60	9	69	5	CAAagggtaggatggGT	1844
97_2	76	13	34	7	CAagggtaggatggGT	1844
98_1	65	8	76	28	CCaagggtaggatggGG	1845
99_1	61	2	75	17	TCcaagggtaggatGG	1846
100_1	83	4	82	13	CTTCcaagggtaggAT	1848
101_1	45	3	52	14	ATCttccaagggtaggGA	1849
102_1	29	2	17	7	AGaagtgtatggctCATT	1936
103_1	26	3	22	1	AAAGaagtgtatggcTCAT	1937
104_1	34	6	22	2	GAAGaagtgtatggcTCA	1938
105_1	41	5	21	5	ATGAaatgtaaaactTGGG	1955
106_1	40	8	29	6	CAATgaaatgtaaaCTGG	1956
107_1	24	3	16	4	GCAAtgaaatgtaaACTG	1957
108_1	30	4	20	6	AGCAatgaaatgtAACT	1958
109_1	44	4	34	14	GAGCaatgaaatgtAAC	1959
110_1	18	1	13	3	TGaaattcccatatcCGA	1992

【0475】

【表10-4】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
111_1	69	8	35	8	AGaattatgaccaTAT	2010
112_1	77	7	38	10	AGGtaagaattatGACC	2014
113_1	97	10	56	13	TCAGgttaagaattaTGAC	2015
114_1	69	8	54	21	CTTCaggtaagaatTATG	2017
115_1	91	7	115	42	TCTTcaggtaagaATTA	2019
116_1	88	6	104	36	CTTCttcaggtaaaGAAT	2021
117_1	85	6	118	17	TCTTcttcaggtaaaGAA	2022
118_1	105	14	102	9	TCTtcttcaggtaAGA	2023
119_1	37	2	76	18	TGGtctaagagaaGAAG	2046
120_1	46	6	81	11	GTTGgtctaagagAAG	2049
121_1	74	11	64	4	AGTtggtctaagAGAA	2050
122_1	74	9	55	21	CAggttgtctaagAGAA	2050
123_1	65	9	95	21	GCAGtttgtctaagagAA	2050
124_1	63	7	ND	ND	CAGTtggtctaagaGA	2051
125_1	65	6	ND	ND	GCagtttgtctaagagaGA	2051
126_1	67	14	104	34	GCagtttgtctaaGAG	2052
127_1	22	6	10	3	CTcatatcagggCAGT	2063
128_1	50	4	46	9	CACAcatgttcttaAC	2087
129_1	22	4	12	12	TAAtaacacacatgTTCT	2092
130_1	24	2	43	28	GTAAatcacacacatgTTC	2093
131_1	33	3	20	12	TGTAaatacacacacaTGTT	2094
132_1	73	17	57	21	GATCatgttaatacACAC	2099
133_1	47	5	28	14	AGATcatgttaataCACA	2100
134_1	35	6	26	11	CAAAGatcatgttaatACAC	2101
135_1	30	2	14	3	ACAAAGatcatgttaaTACA	2102
136_1	52	6	24	18	GAATacaagatcaTGTA	2108
137_1	33	5	20	6	AGAAAtacaagatcATGT	2109
138_1	37	1	22	15	CAGAatacaagatCATG	2110
139_1	85	6	53	8	GCAGAatacaagatATCA	2112
140_1	79	4	40	6	AGGCagaatacaaAGAT	2114
141_1	56	2	53	20	AAGGcagaatacaaAGA	2115
142_1	28	5	20	5	ATTgtgaggacGAA	2132
143_1	26	2	22	10	CAttagtgagggaCGA	2133
144_1	29	6	16	4	GAgggtgtatggatTAG	2218
145_1	45	6	22	5	TTaggagtaataAAGG	2241
146_1	65	7	44	9	TTAatgaatttggTG	2263
147_1	84	8	43	10	CTttaatgaatttGT	2265
148_1	32	0	15	3	CATGgattacaactAA	2322

【0476】

【表10-5】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
149_1	33	2	20	4	TCatggattacaaCTA	2323
150_1	29	1	11	3	GTCatggattacaaCT	2324
151_1	64	2	40	9	CAttaaatctagTCAT	2335
152_1	97	8	63	22	GACAttaaatctagTCA	2336
153_1	92	7	ND	ND	AGGGGacattaaatcTA	2340
154_1	35	4	25	15	CAAAGcattataaCCA	2372
155_1	34	3	24	6	ACttactaggcaGAAG	2415
156_1	102	6	113	18	CAGAgtaactgttCA	2545
157_1	102	10	103	15	CCAGGagtttaactgtAC	2546
158_1	88	7	95	18	GCcagagttaactgTA	2547
159_1	78	10	ND	ND	TGggccagagttaaCT	2550
160_1	59	5	26	5	CAgcatttatcagaCT	2576
161_1	78	8	42	10	TGAataaacatgagTCAT	2711
162_1	31	6	ND	ND	GTGaaataacatgAGTC	2713
163_1	18	2	11	3	TCTGtttatgtcacTG	2781
164_1	56	5	29	9	GTCTgttttatgtcaCT	2782
165_1	37	8	12	5	TGgtctgttatGTCA	2784
166_1	39	1	19	3	TTGGtctgttatgTC	2785
167_1	41	3	35	14	TCaccattgtttaAA	2842
168_1	18	3	14	4	TTcagcaaataatTCGT	2995
169_1	36	8	13	2	GTGtgttcagcaaATAT	2999
170_1	18	2	11	4	TCTattgttagtATC	3053
171_1	67	4	26	12	ATtgcccatcttactTG	3118
172_1	71	2	33	9	TATtgcccatcttaCT	3119
173_1	47	4	20	5	AAatattgccccatCTT	3122
174_1	74	4	34	7	ATAaccttacataCA	3174
175_1	98	19	44	12	TATAaccttacataTAC	3175
176_1	100	10	64	11	TTATAaccttacataTA	3176
177_1	72	38	28	5	TTTATAaccttacataCAT	3177
178_1	47	6	34	6	AActgttattgttCTT	3375
179_1	41	3	23	6	AGgactgttattgtCTA	3378
180_1	32	6	27	7	GAGgactgttattgtCT	3379
181_1	83	1	46	20	ACgtagaataataaCA	3561
182_1	94	4	52	9	CCAGGtttttttATGG	3613
183_1	49	2	16	3	TTtagcagaccaaGTGA	3621
184_1	96	3	26	5	GTtttagcagaccaaGT	3623
185_1	78	3	46	10	TGacagtgttatttTT	3856
186_1	88	5	45	21	TGTGcaagatatttAC	3868

【0477】

【表10-6】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
187_1	46	6	23	6	GAAtatccatagatTGT	4066
188_1	79	3	45	14	CAaactgagaataTCC	4074
189_1	63	5	27	8	GCAaactgagaataTC	4075
190_1	77	9	37	11	TCCtattacaatcgTA	4214
191_1	74	10	36	9	TTCCtattacaatcGT	4215
192_1	91	8	51	28	ACtaatggaggatTT	4256
193_1	95	14	67	24	TAgttcagagaataAG	4429
194_1	86	5	47	16	TAacatatagttcAGA	4436
195_1	87	4	81	20	ATAacatatagttcAG	4437

196_1	101	6	67	20	CAtaacatatgttCA	4438
197_1	91	6	60	13	TCataacatatagtTC	4439
198_1	61	3	31	10	TAGCtcctaacaatCA	4507
199_1	79	12	49	11	CTCCaatctttgtTA	4602
200_1	74	2	58	13	TCTCcaatctttgtAT	4603
201_1	53	3	33	10	TCtatttcagccaaTC	4708
202_1	25	4	30	9	CGGaagtcaagagtGAA	4782
203_1	32	5	21	7	TTAAgcatgaggaaTA	4798
204_1	34	10	26	11	TGAttgagcacctCTT	4831
205_1	81	12	62	12	GACTaattatttcgTT	4857
206_1	57	7	37	7	TGActaattattttCGT	4858
207_1	26	5	21	6	GTGactaattattTCG	4859
208_1	48	3	33	13	CTGCttgaaaatgtgAC	4870
209_1	32	1	34	13	CCtgtttgaaaatgTGA	4871
210_1	60	5	50	19	ATcctgcttggaaATGT	4873
211_1	111	8	110	26	ATTataaatcttatTCT	5027
212_1	107	1	67	12	GCTaaataactttcATC	5151
213_1	26	3	19	6	CATtgtaacataCCTA	5251
214_1	33	2	20	4	GCattgtAACACACCT	5252
215_1	89	8	53	16	TAatattgcaccaaAT	5295
216_1	25	2	29	9	GAataatattgcacCAA	5297
217_1	27	1	27	6	AGataatattgcacCA	5298
218_1	79	6	45	11	GCcaagaagataATAT	5305
219_1	159	16	68	14	CACAgccacataaaaCT	5406
220_1	90	2	72	12	TTgttaattgtggaaAC	5463
221_1	10	2	11	5	TGacttgttaatttTG	5467
222_1	82	1	67	18	TCtaactgaaatagTC	5503
223_1	30	1	32	9	GTGgttctaactgaAA	5508

【0478】

【表10-7】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
224_1	53	7	53	15	CAatatggacttgGT	5522
225_1	44	1	33	10	ATGacaatatatggaaCT	5526
226_1	49	1	41	14	TATGacaatatatggAC	5527
227_1	77	1	54	15	ATATgacaatatatggGA	5528
228_1	100	3	98	29	CTtcacttaataaTTA	5552
229_1	90	12	80	19	CTGCTtcaacttaatAA	5555
230_1	91	0	79	23	AAgactgttacacTTA	5559
231_1	49	8	77	34	GAATgccctaattaTG	5589
232_1	17	7	88	33	TGGAatgccctaattTA	5591
233_1	40	5	35	10	GCAaatgccagtagGT	5642
234_1	81	6	72	25	CTAatggaaggattTG	5673
235_1	97	17	87	25	AAtatagaacctaattTG	5683
236_1	98	4	83	21	GAAagaatagaatGTT	5769
237_1	93	2	102	26	ATGgtaatagattAT	5893
238_1	110	24	44	14	GAaagagcacagggTG	6103
239_1	66	5	36	10	CTACatagagggaaTG	6202
240_1	70	4	34	8	GCttccatataGAGG	6207
241_1	64	NA	33	6	TGCTtcctacatagAG	6208
242_1	30	NA	19	7	TGggcttgaataaTGT	6417
243_1	88	6	69	15	CATtatatttaagaAC	6457
244_1	8	2	5	2	TCggttatgttaTCAT	6470
245_1	18	9	12	4	CActttatctggTCGG	6482
246_1	37	2	19	5	AAAttggcacagcGTT	6505
247_1	46	12	29	8	ACCGtgacagtaaATG	6577
248_1	31	2	25	2	TGggaaccgtgacagTA	6581
249_1	17	2	23	9	CCacatataggtcCTT	6597
250_1	15	6	23	7	CAtattgttaccaTAC	6617
251_1	4	2	9	2	TCAatttgttaccATA	6618
252_1	65	12	85	14	CAATtgtcatatTGCT	6624
253_1	20	2	51	7	CATtcatttgttacattTG	6626
254_1	48	8	91	41	TTTCTactggaaTTTG	6644
255_1	11	5	23	8	CAAttgtgcagcCAG	6672
256_1	43	7	62	13	GAATAatgttcttaTCC	6704
257_1	28	2	36	19	CACAAattgttataatgtTCT	6709
258_1	64	4	78	22	CATGcacaattgttataAT	6714
259_1	53	8	104	73	ATCctgcaatttcaCAT	6832
260_1	54	5	59	14	CCaccatagtgtatCA	6868
261_1	42	8	52	22	ACcaccatagtgtatCA	6868

【0479】

【表10-8】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
262_1	68	5	118	66	CAccaccatagctgaTC	6869
263_1	40	2	73	20	TAgtcggcaccaccAT	6877
264_1	64	6	72	35	CttgttagtcggcaccAC	6880
265_1	56	4	82	35	CttgttagtcggcacCA	6881
266_1	41	5	46	21	CGcttgttagtcggcAC	6883
267_1	51	4	33	14	TCAataaagatcagGC	6942
268_1	61	2	49	10	TGgacttacaagaTG	6986
269_1	45	7	40	9	ATGgacttacaagaAT	6987
270_1	51	12	36	12	GCTCaagaaaattggAT	7073
271_1	17	0	14	5	TACTgtagaacatgGC	7133
272_1	15	3	11	3	GCAAttcatTTGA TCT	7239
273_1	64	11	ND	ND	TGaaaggaggaggacAC	7259
274_1	52	6	50	28	AGtggtaaaggaggAG	7265
275_1	79	7	ND	ND	TAGtggtaaaggaggAG	7265
276_1	81	6	ND	ND	AtagtggtaaaggaggAG	7265
277_1	70	9	ND	ND	TAGtggtaaaggaggGA	7266
278_1	84	9	ND	ND	ATagtggtaaaggaggGA	7266
279_1	40	6	64	53	TAGtggtaaagggaGG	7267
280_1	42	10	ND	ND	ATAGtggtaaagggaGG	7267
281_1	63	7	ND	ND	GATagtggtaaagggaGG	7267
282_1	27	7	38	11	ATAGtggtaaagggaAG	7268
283_1	60	22	ND	ND	GAtagtggtaaaggGAG	7268
284_1	23	3	97	54	GAgatagtggtaAAGG	7271
285_1	51	6	72	19	CATGggagatagtGT	7276
286_1	7	1	21	9	ACAAataatggtaCTCT	7302
287_1	66	8	48	20	ACACacaataatgTTA	7306
288_1	67	6	58	20	GAGggacacacaaaTAAT	7311
289_1	46	2	50	21	ATATagagaggcTCAA	7390
290_1	22	6	ND	ND	TTgatatacgagaGGCT	7393
291_1	11	2	17	3	GCATttgatatacAGA	7397
292_1	70	18	44	8	TTtgcatttgataTAG	7400
293_1	30	1	30	9	CTGgaagaataggTC	7512
294_1	53	5	42	10	ACTGgaagaataggTT	7513
295_1	56	2	41	15	TACTggaagaatagGT	7514
296_1	80	8	53	13	TGGCtttatcctgtAT	7526
297_1	73	6	52	14	ATggcttatcctGTAC	7527
298_1	75	7	89	25	TATGgcttatcctgTA	7528
299_1	52	5	50	11	GTAtggcttatcctGT	7529

10

20

30

40

【0480】

【表10-9】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
300_1	27	3	31	6	ATgaatatatgccCAGT	7547
301_1	41	8	33	9	GATgaatatatgCCCCA	7549
302_1	8	2	ND	ND	CAAgatgaatataTGCC	7551
303_1	32	5	37	14	GACAacatcagtaTAGA	7572
304_1	28	5	30	23	CAAGacaacatcAGTA	7576
305_1	47	5	41	9	CACtccctaggttccTTT	7601
306_1	39	6	33	7	AACactccctaggttCCT	7603
307_1	68	3	42	14	TAacactccctaggTCC	7604
308_1	115	5	69	22	CTaacactccctaggTC	7605
309_1	97	16	57	14	TGataacataactgTG	7637
310_1	36	1	23	10	CTgataacataaCTGT	7638
311_1	38	5	24	5	TTTGaactcaaggtagAC	7654
312_1	42	3	39	5	TCCTttacttagcTAG	7684
313_1	15	2	14	3	GAgtttggatttagCTG	7764
314_1	49	28	ND	ND	TGggatatgacagGGA	7838
315_1	34	6	ND	ND	TGTGggatatgacaGG	7840
316_1	47	3	37	8	ATATggaagggataTC	7875
317_1	11	3	ND	ND	ACAggatatggaaGGG	7880
318_1	48	4	ND	ND	ATTTcaacaggatATGG	7885
319_1	18	2	16	4	GAgttaattcaacAGG	7891
320_1	74	6	44	5	AGGGGagtaatttcAACAA	7893
321_1	38	5	56	28	ATTAAGggagtaatTTCA	7896
322_1	66	9	32	11	CTtactattaggGAGT	7903
323_1	13	1	15	5	CAgcttactatttaGGG	7906
324_1	26	4	20	9	TCAgcttactattAGG	7907
325_1	43	4	17	2	ATTtcagcttactaTTAG	7908
326_1	54	5	57	16	TTcagcttactaTTAG	7908
327_1	28	3	8	2	CAGAtttcagcttaCT	7913
328_1	43	4	37	16	GACtacaactagagGG	7930
329_1	45	12	36	10	AGACtacaactagaGG	7931
330_1	99	8	94	32	AAgactacaactagAG	7932
331_1	59	4	52	19	ATGAttaattctagtCAAA	7982
332_1	100	2	84	23	TTTaattctagtAAA	7982
333_1	91	9	60	19	GATTtaattctaGTCA	7984
771_1	74	6	50	5	TGAttaattctaGTCA	7984
334_1	73	5	54	12	ATGAttaattctagtTCA	7984
335_1	15	1	26	3	GATGatttaattctagtCA	7984
336_1	71	22	49	16	GAtttaattctaGTCA	7984

【0481】

【表10-10】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
337_1	43	5	30	11	GATGatttaattctaGTC	7985
338_1	98	5	90	27	TGatttaattctagTC	7985
339_1	87	21	86	2	GAGAtgatTTaatTCTA	7988
340_1	92	5	85	27	GAGatgatTTaatTCT	7989
341_1	7	1	7	1	CAGAttgatggtagTT	8030
342_1	7	2	24	11	CTcagattgtatGTAG	8032
343_1	3	1	14	9	GTTagccctcagaTTG	8039
344_1	14	5	20	7	TGtatttttagcCCTC	8045
345_1	10	2	11	5	ACttgtattttAGCC	8048
346_1	52	4	52	17	AGCcagtatcagggAC	8191
347_1	33	3	18	8	TTgacaatagtGCAT	8213
348_1	7	2	13	5	ACAagtggtatctTCT	8228
349_1	63	8	44	15	AATCtactttacaaGT	8238
350_1	36	2	ND	ND	CAcagttagatgcctGATA	8351
351_1	24	2	30	9	GAacacagttagatGCC	8356
352_1	23	4	103	14	CTTGgaacacagtagAT	8359
353_1	20	2	45	2	ATAtcttggaaacaCAG	8364
354_1	25	3	24	6	TCTttaatatcttgAAC	8368
355_1	39	2	41	10	TGatttcttaatatCTTG	8372
356_1	54	5	88	43	TGatgatttcttaatATC	8375
357_1	31	4	45	27	AGGctaagtcatgaTG	8389
358_1	18	3	43	20	TTGAtgaggctaagTC	8395
359_1	6	2	11	2	CCAggattatactcTT	8439
360_1	43	5	40	14	GCcaggattataCTCT	8440
361_1	56	8	73	13	CTGccaggattataCT	8442
362_1	23	1	33	7	CAGAAacttataacttaTG	8473
363_1	49	8	45	14	AAGCagaaaacttaTACT	8478
364_1	39	6	37	4	GAAGcagaaaacttaTACT	8478
365_1	26	4	45	13	TGGaaagcagaaaacttaCT	8478
366_1	21	4	44	5	TGGaaagcagaaaacttaTAC	8479
367_1	97	4	70	22	AAgcagaaaacttaTAC	8479
368_1	34	3	32	11	TGGaaagcagaaaactTATA	8480
369_1	71	7	46	19	AAGGgatattatggAG	8587
370_1	51	9	79	38	TGccggaagatttcCT	8641
371_1	45	6	52	25	ATGGattttgggagtaGA	8772
372_1	27	7	30	8	AGatggattttgggagTA	8774
373_1	13	3	28	6	AAAGatggattttgggagT	8775

【0482】

10

20

30

40

【表10-11】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
374_1	42	10	44	11	ACaaagatggattGGGA	8777
374_2	41	3	45	14	ACaaagatggattggGA	8777
375_1	83	9	88	32	AGAagggttcagaCTTT	8835
376_1	40	5	33	3	GCAgaaggttcagaCT	8837
376_2	28	5	20	4	GCagaaggttcagACT	8837
377_1	70	2	43	8	TGCAgaagggtttagAC	8838
378_1	23	3	55	17	AGtgcaagaagggttCAG	8840
378_2	51	6	41	8	AGTGcagaagggttAG	8840
379_1	34	6	35	7	AAGTgcagaagggttCA	8841
380_1	44	11	24	6	TAagtgcagaagGTTC	8842
381_1	37	5	45	9	TCTaagtgcagaAGGT	8844
382_1	75	5	147	26	CTCaggagttctactTC	8948
383_1	90	10	141	55	CTCaggagttctaCTT	8949
384_1	73	8	234	116	AtggaggtgactcaggAG	8957
385_1	33	4	42	7	ATggaggtgactcagGA	8958
386_1	24	3	29	14	ATggaggtgactcAGG	8959
387_1	37	2	65	15	TATggaggtgactcAGG	8959
388_1	50	10	81	19	ATatggaggtgactcaGG	8959
389_1	42	5	61	10	TATGgaggtgactcAG	8960
390_1	36	2	76	50	ATatggaggtgactTCAG	8960
391_1	52	6	64	6	CAtatggaggtgactcAG	8960
392_1	63	5	57	6	ATAtggaggtgacTCA	8961
393_1	53	7	64	12	CAtatggaggtgacTCA	8961
394_1	51	5	56	24	CAtatggaggtgACTC	8962
395_1	23	3	41	34	GCatatggaggtgacTC	8962
396_1	34	3	54	10	TGcatatggaggtgacTC	8962
397_1	54	5	71	24	TtgcatatggaggtgacTC	8962
398_1	61	11	59	13	TttgcatatggaggtgacTC	8962
399_1	25	2	30	6	GCatatggaggtgaCT	8963
400_1	34	4	25	9	TGcatatggaggtgaCT	8963
401_1	25	4	31	20	TTGcatatggaggtgact	8963
402_1	51	6	37	11	TttgcatatggaggtgaCT	8963
403_1	26	1	33	5	TGCatatggaggtgAC	8964
404_1	25	2	69	19	TTGcatatggaggtGAC	8964
405_1	26	4	24	4	TTTGcatatggaggtgAC	8964
406_1	19	3	20	7	TTTGcatatggaggtGA	8965
407_1	16	5	46	16	TTtgcatatggaaGGTG	8966

【0483】

【表10-12】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
408_1	9	2	9	6	AAgtgaagttcaaCAGC	8997
409_1	26	8	109	52	TGgaaagtgaagTTCA	9002
410_1	31	5	24	5	ATggaaagtgaagTTC	9003
411_1	49	9	19	10	GATGgaaagtgaardTT	9004
412_1	28	10	17	9	CTGtgatggagaagtGAA	9007
413_1	54	4	34	8	ATTgagtgaaatccAAA	9119
414_1	11	1	14	2	AAttgagtgaaatCCAA	9120
415_1	58	6	14	2	GATAattgagtgaaATCC	9122
416_1	5	1	16	3	GTGataattgagtgAA	9125
417_1	73	5	61	14	AAGaaagggtgcaaTAA	9155
418_1	86	6	64	13	CAagaaaagggtgcAATA	9156
419_1	75	19	64	14	ACAAAgaaagggtgcAAT	9157
420_1	75	8	50	13	ATttaaactcacaaAC	9171
421_1	21	8	23	6	CTgttaggttcAGCGA	9235
422_1	54	10	30	5	TCTGaatgaacatTTCG	9260
423_1	11	4	15	5	CTcattgaaggTCTG	9281
424_1	87	3	52	8	CTAatctcattgaaGG	9286
425_1	95	1	85	13	CCtaatctcattgaAG	9287
426_1	31	7	22	7	ACTttgatcttcAGC	9305
427_1	64	7	49	16	ACtatgcaacacttTG	9315
428_1	18	6	21	3	CAAatagotttatCGG	9335
429_1	19	6	17	4	CCaaatagctttATCG	9336
430_1	35	4	27	8	TCCAaatagcttaTC	9337
431_1	75	8	43	7	GATCcaaatacgctTA	9339
432_1	67	11	32	8	ATgatccaaataGCTT	9341
433_1	53	5	43	6	TATGatccaaataGCT	9342
434_1	97	9	66	29	TAAAacaggctggGAAT	9408
435_1	58	12	44	17	ACttaaacaggCTGG	9412
436_1	58	10	30	12	ACacttaaacagGGCT	9414
437_1	87	38	41	3	GAACacttaaacAGGG	9416
438_1	70	4	59	33	AGAGaacacttaaACAG	9418
439_1	83	17	28	9	CTACagagaacaCTTA	9423
440_1	49	12	27	4	ATGctacagagaaCACT	9425
441_1	53	10	24	13	ATAAatgctacagagAAC	9427
442_1	23	6	20	10	AGataaaatgctacaGAGA	9430
443_1	48	6	27	7	TAGAgataaaatgcTACA	9434
444_1	51	3	32	8	TAGAtagagataaaatGCT	9437

【0484】

【表10-13】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
445_1	38	5	ND	ND	CAATatactagataGAGA	9445
446_1	52	3	31	1	TACAcataatatactagATAG	9448
447_1	65	6	48	11	CTAcacaatatacTAG	9452
448_1	67	9	29	2	GCTAcacaatataACTA	9453
449_1	103	17	65	15	ATATgctacacaatATAC	9455
450_1	71	13	129	22	TGATAtgctacaCAAT	9459
451_1	19	4	9	1	ATGAtatgatatgCTAC	9464
452_1	75	10	45	21	GAGGagagagacaaTAAA	9495
453_1	68	6	43	10	CTAgaggagagagACA	9500
454_1	72	7	79	25	TATTctaggaggagAGA	9504
455_1	31	3	29	9	TTATattctaggagGAG	9507
456_1	38	5	62	17	GTtataattctaGGAG	9510
457_1	15	6	15	8	TGgagtttatattcTAGG	9512
458_1	34	3	21	3	CGtaccaccactcTGC	9590
459_1	41	5	55	22	TGAGgaatcattcATTc	9641
460_1	81	8	47	22	TTTGagggaaatcatTCAT	9643
461_1	76	8	39	5	AGGCaatcctattTG	9657
462_1	93	12	216	12	TTTAggctaattcCTAT	9660
463_1	15	6	30	9	TGCTccagtgtaccCT	9755
464_1	27	3	25	6	TAgttagtactcgATAG	9813
465_1	9	2	7	3	CTAattgttagtagtaCTC	9818
466_1	52	3	32	6	TGctaattgttagTAGT	9822
467_1	68	11	36	16	AGTGctaattgttagTA	9824
468_1	35	6	32	3	GCAAgtgctaattgTA	9827
469_1	91	9	ND	ND	GAGGaaatgaactaattTA	9881
470_1	92	5	ND	ND	CAGGagggaaatgaacTA	9886
471_1	67	5	42	6	CCcttagagtcatTC	9902
472_1	35	5	20	8	ATCttacatgatgaAGC	9925
473_1	13	1	20	5	GACacactcagatttcAG	9967
474_1	24	4	20	2	AGacacactcagatttcAG	9967
475_1	25	4	24	7	AAGacacactcagatttcAG	9967
476_1	26	6	19	4	AGacacactcagattTCA	9968
477_1	28	4	32	13	AAGacacactcagattTCA	9968
478_1	31	8	37	6	AAagacacactcagatTTCA	9968
479_1	63	7	51	26	GAAagacacactcagatTTC	9969
480_1	37	10	ND	ND	AAGAcacactcagatTTC	9969
481_1	41	4	ND	ND	AAAGacacactcagaTTTC	9969

【0485】

【表10-14】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
482_1	19	5	48	14	TGAAagacacactcagatTT	9970
483_1	60	8	68	10	TGaaagacacactcAGATT	9971
484_1	42	8	63	22	TGAagacacactcaGAT	9972
485_1	48	9	41	20	ATTGaaagacacacTCA	9975
486_1	27	6	27	12	TCattgaaagacaCACT	9977
487_1	88	13	121	33	TTCCatcattgaAAGA	9983
488_1	80	12	ND	ND	ATAAtaccacttaTCAT	10010
489_1	13	4	27	15	TTacttaatttcttTGGA	10055
490_1	32	5	60	24	TTAgaacttagctttatC	10101
491_1	58	10	55	17	GAGgtacaaaatatAGG	10171
492_1	4	1	12	3	CTTatgatacaacTTA	10384
493_1	37	6	35	5	TCTtatgatacaaCTT	10385
494_1	30	0	27	6	TTCTtatgatacaaCT	10386
495_1	27	8	18	3	CAgtttcttattgaTAC	10390
496_1	25	10	25	6	GCAGtttcttattgaTA	10391
497_1	77	6	72	29	TACAaatgtctattagGTT	10457
498_1	66	5	69	17	TGTAc当地gtctatTAG	10460
499_1	27	10	20	4	AGCatcacaatttagTA	10535
500_1	31	10	25	5	CTAatgatagtgaaGC	10548
501_1	21	7	30	8	AGCtaatgatagtgAA	10550
502_1	35	5	39	8	ATGCcttgacatata	10565
503_1	64	11	79	26	CTCAagattatttgACAC	10623
504_2	25	4	83	32	ACctcaagattttGA	10626
504_1	94	7	22	6	ACCTcaagattttGA	10626
505_1	31	6	34	10	AACCTcaagattatTG	10627
506_1	55	6	62	17	CACAAacctcaagattta	10628
507_1	66	12	40	4	GTActtaatttagACCT	10667
508_1	78	5	80	10	AGTActtaatttagACC	10668
509_1	36	5	42	15	GTATgaggtggtaaAC	10688
510_1	40	4	48	22	AGgaaacacgcagaAGTG	10723
511_1	27	7	13	6	GCacaacccagaggAA	10735
512_1	54	5	ND	ND	CAAgcacaacccagAG	10738
513_1	35	7	ND	ND	TTCaagcacaaccCAG	10740
514_1	49	6	52	15	AAttcaagcacaACCC	10742
515_1	72	4	106	49	TAATAattcaagcacaCC	10743
516_1	43	4	57	21	ACTAataattcaaGCAC	10747
517_1	37	3	60	12	ATAAtactaataattcAAGC	10749

【0486】

【表10-15】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
518_1	9	3	6	1	TAgatttgtgagGTAA	11055
519_1	59	10	31	5	AGCCtttaattctccAT	11091
520_1	41	4	34	9	AATGatcttagagcCTTA	11100
521_1	34	6	34	7	CTAatgtatctagaGCC	11103
522_1	52	6	52	17	ACTaatgtatctaGAGC	11104
523_1	60	4	54	10	CATtaacatgttctTATT	11165
524_1	57	4	55	8	ACAAgtacattaacatGTTC	11170
525_1	53	6	44	5	TTACAagtacattaaCATG	11173
526_1	54	11	49	17	GCTTtattcatgttTTAT	11195
527_1	34	7	17	5	GCTttattcatgttTA	11196
528_1	11	2	21	4	AGAgcttattcatgtTT	11197
529_1	22	4	33	7	ATAAagagctttattCATG	11200
530_1	30	5	32	15	CATAagagcttaTTCA	11202
531_1	77	8	24	4	AGCAtaagagctTTAT	11205
532_1	8	3	15	6	TAGattgttttagtGCA	11228
533_1	4	2	10	2	GTagattgtttaGTGC	11229
534_1	41	6	33	11	GACAattcttagtaGATT	11238
535_1	50	1	37	7	CTGacaattctaGTAG	11241
536_1	49	7	36	6	GCTGacaattcttagTA	11242
537_1	59	2	42	11	AGgattaagatacgTA	11262
538_1	28	11	28	4	CAggattaagataCGT	11263
539_1	96	5	20	6	TCAAggattaagataCG	11264
540_1	70	11	59	11	TTcaggattaagATAC	11265
541_1	53	5	28	4	AGGAagaaaagtttgATT	11308
542_1	92	13	59	12	TCAAggaagaaaagtTTGA	11311
543_1	44	3	67	7	CTCAaggaagaaaagTTG	11312
544_1	43	4	32	4	TGCtcaaggaagaAAGT	11315
545_1	41	7	44	20	AATTatgtcaaggaAGA	11319
546_1	11	4	26	8	TAGGataaccacatttatGA	11389
547_1	25	4	26	12	CAtaatttattccatttcCTC	11449
548_1	64	6	ND	ND	TGCAtaatttatttcCAT	11454
549_1	48	17	49	7	ACTGcataatttatC	11456
550_1	91	10	92	15	CTAAactgcataattTATT	11458
551_1	85	8	38	9	ATaactaaactgCATA	11465
552_1	86	4	ND	ND	TTAttaataactaaaCTGC	11468
553_1	91	13	92	21	TAGTacattattaataaaCT	11475
554_1	50	4	37	7	CATAactaaggacgTT	11493

【0487】

【表10-16】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
555_1	41	5	30	7	TCTataactaaggacGT	11494
556_1	80	7	55	13	CGTCataactaaggAC	11496
557_1	86	3	59	11	TGgtcataactaaggGA	11497
558_1	51	9	33	12	ATcgtcataactAAGG	11498
559_1	91	6	65	26	GTtagtatcttacATT	11525
560_1	30	3	41	8	CTCtattgttagtATC	11532
561_1	59	8	18	6	AGTatagagttactTGT	11567
562_1	65	11	41	11	TTCCtggtgataactTT	11644
563_1	57	13	45	13	GTTCctggtgataactTT	11645
564_1	57	15	30	7	TGttcctggtgataCT	11646
565_1	17	4	35	4	ATaaacatgaatctCTCC	11801
566_1	16	3	30	4	CTTtataaacatgaaTCTC	11804
567_1	60	5	45	11	CTGtctttataaaaCATG	11810
568_1	20	2	19	5	TTgttataaaatctgTCTT	11820
569_1	68	9	44	4	TTAaatttattcttgGATA	11849
570_1	76	8	48	12	CTtaaatttatttctTGGA	11851
571_1	62	5	66	5	CTTCttaaatttatttctTG	11853
572_1	28	4	44	10	TATGtttctcagtAAAG	11877
573_1	29	6	36	11	GAAttatctttaaACCA	11947
574_1	74	6	34	7	CCCTtaaatttctaCA	11980
575_1	37	8	30	9	ACACTgctcttgtaCC	11995
576_1	45	14	27	6	TGACAacactgtCTT	12000
577_1	2	1	12	5	TACAttatttgggcTC	12081
578_1	65	14	39	9	GTacatttatttggCT	12082
579_1	34	4	53	12	TTGgtacatttatTGG	12085
580_1	41	7	35	6	CATGttggcacattTAT	12088
581_1	11	4	12	5	AATCatgttggcacAT	12092
582_1	96	16	48	9	AAatcatgttggcaCA	12093
583_1	71	15	42	13	GACaaaggattggAA	12132
584_1	46	34	39	6	AATgttccatgttggCCTC	12197
585_1	37	26	28	12	GCttaatgttcagaTG	12201
586_1	75	8	43	12	CGTAcatagcttgaTG	12267
587_1	41	10	28	5	GTGaggaatttaggaTA	12753
588_1	41	5	27	9	GTAAacaatatggTTG	12780
589_1	67	10	37	7	GAaatattgtttagaCTA	13151
590_1	97	10	80	12	TTGaaatattgttagAC	13153
591_1	64	10	47	9	AAgtcttagtaatTTGC	13217

【0488】

【表10-17】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
592_1	84	7	60	9	GCTCaggtagattatAA	13259
593_1	42	8	32	9	CATacactgttgcTAA	13296
594_1	101	6	79	17	ATGgtctcaaattcATT	13314
595_1	53	14	46	7	CAATggctctcaaattCA	13316
596_1	47	6	36	6	TTCCtattgattgaCT	13568
597_1	97	12	41	6	TTTCtgttcacaacAC	13600
598_1	85	1	49	11	AGgaaccactaaTCT	13702
599_1	56	3	34	7	TAAtggcaggaacCC	13710
600_1	15	4	24	8	GTAAAtggcaggaaCC	13711
601_1	40	6	26	8	TTgttaatggcagGAA	13713
602_1	59	12	26	6	TTatgaggtaggCATG	13835
603_1	62	2	42	10	CCAggtgaaactttAA	13935
604_1	77	9	55	18	CCCtttagtcagctCCT	13997
605_1	82	13	42	11	ACccttagtcagCTCC	13998
606_1	74	1	39	10	CAcccttagtcagCTC	13999
607_1	76	9	30	8	TCTcttactaggcTCC	14091
608_1	82	5	50	13	CCtatctgtcatcATG	14178
609_1	82	1	48	12	TCCtatctgtcatcAT	14179
610_1	41	6	50	13	GAGaagtgtgagaaGC	14808
611_1	70	5	84	19	CATCcttgaagttAG	14908
612_1	64	14	61	16	TAAtaagatggctCCC	15046
613_1	85	2	51	14	CAAggcataataagAT	15053
614_1	47	1	35	10	CCaaggcataatAAGA	15054
615_1	74	8	53	11	TGatccaattctcaCC	15151
616_1	63	4	41	11	ATGatccaattctCAC	15152
617_1	46	7	42	9	CGCttcatcttcacCC	15260
618_1	104	4	15	4	TATgacactgcaTCTT	15317
619_1	8	3	8	5	GTAtgacactgcaTCT	15318
620_1	21	3	27	10	TGtatgacactgCATC	15319
621_1	37	7	38	11	TTCTcttctgttaagTC	15363
622_1	49	7	36	11	TTctacagaggaACTA	15467
623_1	47	1	32	10	ACTacaggttctacAGA	15474
624_1	78	8	69	6	TTCCcacaggtaaaTG	15561
625_1	70	7	ND	ND	ATTAttgaatatactCATT	15594
626_1	73	7	49	25	TGGGagggaaattatTTG	15606
627_1	80	5	64	11	TGACtcatcttaaaTG	15621
628_1	71	6	66	19	CTGactcatcttaaAT	15622

10

20

30

40

【0489】

【表10-18】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
629_1	31	6	41	6	TTTactctgactcATC	15628
630_1	88	2	68	18	TATTggaggaatttATT	15642
631_1	53	2	27	6	GTAAttggaggaattAT	15643
632_1	23	3	39	7	TGgtataacttctctaagTAT	15655
633_1	42	9	33	3	GATCtcttggtataCT	15666
634_1	38	1	30	16	CAgacaactctataCC	15689
635_1	10	2	19	3	AACAtcagacaacTCTA	15693
636_1	13	1	11	3	TAACatcagacaactTC	15695
637_1	14	2	27	2	TTTAacatcagacaACTC	15695
638_1	101	14	81	16	ATttaacatcagacAA	15698
639_1	14	1	17	1	CCtatttaaacatcAGAC	15700
640_1	65	2	ND	ND	TCCctatttaacaTC	15703
641_1	41	6	42	12	TCAAcgactattgGAAT	15737
642_1	37	2	29	5	CTTAtattctggcTAT	15850
643_1	31	7	35	4	ATCCtttatattctgGC	15853
644_1	13	3	8	1	GAtccttatattCTGG	15854
645_1	25	5	20	4	TGAtccttatattCTG	15855
646_1	33	6	54	10	ATTGaaacttgaTCCT	15864
647_1	43	3	27	6	ACtgtcattgaaACTT	15870
648_1	54	7	32	12	TCTtactgtcattgAA	15874
649_1	12	1	25	2	AGgatcttactgtCATT	15877
650_1	13	4	11	3	GCAaatcaactccATC	15896
651_1	10	5	16	3	GTGcaaataactCCA	15898
652_1	7	0	36	18	CAATtattctttgTGC	15910
653_1	21	3	31	7	TGGcaacaatttattTCTT	15915
654_1	75	9	73	24	GCTggcaacaatTATT	15919
655_1	21	6	39	6	ATCCatttctactgCC	15973
656_1	25	3	38	8	TAATatctattgattCTA	15988
657_1	14	2	11	5	TCaatagtgttagggCA	16093
658_1	11	4	10	3	TTCaatagtgttaggGC	16094
659_1	18	1	32	12	AGGTtaattaattcaATAG	16102
660_1	33	7	25	10	CATttgtaatccCTAG	16163
660_2	64	14	31	8	CATttgtaatcccTAG	16163
661_1	48	6	34	6	ACAtttgtaatccCTA	16164
662_2	29	6	23	5	AAcatttgtaatCCCT	16165
662_1	30	6	18	6	AACatttgtaatCCCT	16165
663_1	49	1	26	6	TAaatttcaagttCTG	16184

【0490】

【表10-19】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
664_1	17	3	30	10	GTTtaaatttcaagTTCT	16185
665_1	22	7	40	9	CCAAgtttaaaatttCAAG	16189
666_1	89	11	ND	ND	ACCCaaggtttaaaTTTC	16192
667_1	60	16	87	8	CAtacagtgacccaagTTT	16199
668_1	65	9	50	12	ACatccatacagTGA	16208
669_1	83	8	103	4	AGcacagctctaCATC	16219
670_1	80	9	150	36	ATAtagcacagcTCTA	16223
671_1	57	14	ND	ND	TCCatatacgacagCT	16226
672_1	53	10	106	8	ATTtccatatagCACA	16229
673_1	78	3	96	14	TTTAttccatatAGCA	16231
674_1	77	9	31	7	TTTatttccatatAGC	16232
675_1	32	6	ND	ND	AAGGagaggagatTATG	16409
676_1	32	5	24	6	AGTtcttgtgttagCT	16456
677_1	19	4	17	4	GAgttcttgtgttaGC	16457
678_1	14	3	25	3	ATTAatttatccatCCAC	16590
679_1	11	2	20	6	ATCaattaattatcCATC	16593
680_1	31	5	40	11	AGAatcaattaattatC	16596
681_1	8	3	30	10	TGagataccgtgcATG	16656
682_1	11	3	ND	ND	AAtgagataccgTGCA	16658
683_1	15	3	33	10	CTGtggttaggctaAT	16834
684_1	45	7	38	7	AagagtaagggtctgtggTT	16842
685_1	24	5	ND	ND	GATGggtaagagTAA	16854
686_1	11	2	ND	ND	AGCagatgggttaaGA	16858
687_1	ND	ND	51	7	TGtaaacatttTAGC	16886
688_1	83	1	54	11	CCTgcctataaatTA	16898
689_1	103	4	73	14	TGCCctgcctataaAT	16901
690_1	104	2	64	22	TCTtcttagttcaaTA	16935
691_1	ND	ND	60	9	TGgttcttaactACAT	16980
692_1	ND	ND	94	22	AGtttgggttctaaCTA	16983
693_1	8	2	17	5	GAAtgaaacitgcCTG	17047
694_1	98	6	51	9	ATTatccttacatGAT	17173
695_1	48	4	18	4	GTacccaattatcCTT	17180
696_1	94	2	48	9	TGTacccaattatCCT	17181
697_1	31	5	42	13	TTgtacccaattatC	17182
698_1	41	4	39	6	TTTgtacccaattatTC	17183
699_1	63	0	28	12	AGCAgcatgttataTT	17197
700_1	99	6	43	12	TGGgaagtggctGGG	17292

10

20

30

40

【表 10 - 20】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
701_1	103	2	28	5	CTGagagtgataaTA	17322
702_1	52	6	27	9	AATGctggattacgTC	17354
703_1	67	3	37	7	CAatgctggattaCGT	17355
704_1	36	10	80	12	TTgttcagaagtATCC	17625
705_1	19	9	47	9	GAtgatttgcttGGAG	17646
706_1	44	NA	60	9	GAAatcattcacaACC	17860
707_1	46	9	32	9	TTGtaacatctacTAC	17891
708_1	56	0	79	17	CATtaaggcagcaagTT	17923
709_1	30	9	46	7	TTActagatgtgagCA	17942
710_1	29	4	36	6	TTtactagatgtgAGC	17943
711_1	41	13	41	6	GACcaaggcacctaCA	17971
712_1	36	19	49	11	AGAccaaggcacctTAC	17972
713_1	30	6	34	7	ATgggttaataAAGG	18052
714_1	70	2	24	8	TCaaccagagtattAA	18067
715_1	11	4	26	8	GTCaaccagagtatTA	18068
716_1	126	56	26	6	ATtgtaaagctgaTAT	18135
717_1	73	1	42	10	CAcataattgtAAAGC	18141
718_1	23	9	55	18	GAgttctgctattTAC	18274
719_1	50	1	42	11	TGtagattcaatgCCT	18404
720_1	79	3	39	10	CCtatttttttttTGA	18456
721_1	27	6	30	8	CCtttatgttatgtacAC	18509
722_1	26	7	50	13	TCCTtatgttatgtatCA	18510
723_1	59	1	48	12	AAGatgttaagtATA	18598
724_1	54	2	50	13	CTgattattaaagATGT	18607
725_1	92	10	84	19	TGgaaaggatgtatTT	18808
726_1	24	8	61	16	ACttgaatggcttgGA	18880
727_1	8	4	51	14	AACttgaatggctTG	18881
728_1	35	4	35	10	CAATgtgttactatTT	19004
729_1	36	9	53	11	ACAatgtgttactATT	19005
730_1	70	2	41	11	CATCtgctatataaGA	19063
731_1	38	NA	42	9	CCTAgagcaaatacTT	19223
732_1	102	15	15	4	CAGagttataaatAAG	19327

10

20

30

【表 10 - 21】

CMP ID 番号	KARPAS-299細胞 5 μM CMP		THP1細胞 20 μM CMP		化合物(CMP)	配列番号1上 の開始位置
	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差	対照に対する mRNA率(%)	標準 偏差		
733_1	37	10	8	5	GTTCaagcacaacgAA	19493
734_1	13	1	38	11	AGggttcaaggcacAAC	19496
735_1	49	NA	36	11	TGttggagacactgTT	19677
736_1	48	NA	32	10	AAGgaggagtttaggAC	19821
737_1	36	NA	64	11	CTATgccatttacgAT	19884
738_1	105	19	66	19	TCaaatgcagaattAG	19913
739_1	44	NA	41	6	AGtgacaatcaaATGC	19921
740_1	107	NA	68	18	AAgtgacaatcaaATG	19922
741_1	102	4	27	6	GTGtaccaagtaacAA	19978
742_1	110	10	30	16	TGGatgttaaacTGA	20037

【0491】

実施例2 - 用量応答曲線におけるインビトロ有効性の試験

表10から選択されたオリゴヌクレオチドを、K A R P A S - 2 9 9 細胞にて、半対数(half-log)連続希釈P B S 溶液(5 0 μ M、1 5 . 8 μ M、5 . 0 μ M、1 . 5 8 μ M、0 . 5 μ M、0 . 1 5 8 μ M、μ M、0 . 0 5 μ M、0 . 0 1 5 8 μ Mのオリゴヌクレオチド)を用いて試験し、実施例1に記載のインビトロ有効性アッセイにおいて評価した。I C 5 0 及び最大の阻害(残渣% P D - L 1 発現量)オリゴヌクレオチドについて評価した。

【0492】

GraphPad Prism6で、E C 5 0 の計算を行った。表11に、I C 5 0 及び最大P D - L 1 ノックダウンレベルを、対照(P B S)処置済細胞の%として示す。

【0493】

【表 1 1 - 1】

表 1 1 : 生理食塩水%としての最大の阻害、及び K A R P A S - 2 9 9 細胞系統中の E C
5 0

CMP ID番号	最大の阻害 (残渣PD-L1発現量%: 生理食塩水処置済%)		EC50(μM)		化合物CMP	配列番号1上 の開始位置
	平均	SD	平均	SD		
6_1	11	3.3	0.69	0.11	TCGCataagaatgaCT	371
8_1	29	1.7	0.06	0.01	CTGaacacacagtCGC	383
9_1	19	1.7	0.23	0.02	TCTgaacacacagtCG	384
13_1	14	4.7	0.45	0.12	CTtacttagatgcTGC	495
41_1	10	1.8	0.19	0.02	TCAtttagttaccCAA	822
42_1	17	1.3	0.19	0.02	TTcatttagtaCCCA	823
58_1	23	1.5	0.17	0.01	CCagagatatataTGC	909
77_1	24	2.4	0.16	0.02	AGTatcatagttcTCC	1075
92_1	12	2.4	0.25	0.03	AGattaagacagtTGA	1310
111_1	3	2.0	0.27	0.03	TGaaattcccatatcCGA	1992
128_1	11	1.8	0.25	0.03	CTcatatcagggCAGT	2063
151_1	16	2.7	0.28	0.05	GTCatggattacaCT	2324
164_1	19	1.6	0.15	0.01	TCTGtttatgtcacTG	2781
166_1	36	1.7	0.11	0.02	TGgtctgtttatGTCA	2784
169_1	10	1.6	0.22	0.02	TTcagcaaataatTCGT	2995
171_1	12	2.0	0.21	0.02	TCTattgttaggtATC	3053
222_1	1	2.0	0.21	0.02	TGacttgtaattgTGG	5467
233_1	1	4.3	0.89	0.17	TGGAatgccctaattTA	5591
245_1	4	2.0	0.17	0.02	TCggttatgttaTCAT	6470
246_1	7	2.1	0.25	0.03	CActttatctggTCGG	6482
250_1	0	2.5	0.23	0.03	CCacatataggtcCTT	6597
251_1	0	2.8	0.75	0.10	CAtattgttaccaTAC	6617
252_1	3	2.2	0.19	0.02	TCAatattgttaccATA	6618
256_1	5	2.2	0.32	0.03	CAAattgtgcagcCAG	6672
272_1	1	3.2	0.69	0.10	TACTgttagaacatgGC	7133
273_1	3	2.8	0.28	0.04	GCAAttccatttgaTCT	7239
287_1	1	1.4	0.13	0.01	ACAAataatggttaCTCT	7302
292_1	2	2.1	0.21	0.02	GCATttgatataAGA	7397
303_1	0	1.2	0.21	0.01	CAAgatgaatataTGCC	7551
314_1	3	2.1	0.39	0.04	GAgtttggattagCTG	7764
318_1	3	1.4	0.14	0.01	ACAggatatggaaGGG	7880
320_1	2	2.4	0.22	0.03	GAgttaatttcaacAGG	7891
324_1	0	2.4	0.44	0.05	CAgttactattatGGG	7906
336_1	0	2.5	0.21	0.03	GATGatttaattctagtCA	7984

【 0 4 9 4 】

【表 1 1 - 2】

CMP ID番号	最大の阻害 (残渣PD-L1発現量%: 生理食塩水処置済%)	EC50(μM)		化合物CMP	配列番号1上 の開始位置	
342_1	1	2.2	0.12	0.01	CAGAttgatggtagTT	8030
343_1	4	1.8	0.11	0.01	CTcagattgatgGTAG	8032
344_1	0	0.9	0.12	0.01	GTTaggccctcagaTTG	8039
345_1	0	2.3	0.36	0.04	TGtattgttagcCCTC	8045
346_1	1	2.1	0.22	0.02	ACttgtattgttAGCC	8048
349_1	4	2.9	0.21	0.03	ACAagtggtatctTCT	8228
359_1	6	2.9	0.39	0.05	TTGAtgaggctaagTC	8395
360_1	0	1.7	0.18	0.02	CCAggattatactcTT	8439
374_1	5	1.7	0.33	0.03	AAGatggattgggaGT	8775
408_1	3	1.8	0.21	0.02	TTtgcatatggaGGTG	8966
409_1	0	1.8	0.21	0.02	AAgtgaagttcaaCAGC	8997
415_1	0	1.4	0.23	0.02	AAttgagtgaatCCAA	9120
417_1	7	0.9	0.15	0.01	GTGataattgagtGAA	9125
424_1	6	3.2	0.19	0.03	CTcattgaaggtTCTG	9281
429_1	5	2.5	0.48	0.05	CAAatagctttatCGG	9335
430_1	1	2.7	0.68	0.09	CCaaatagctttATCG	9336
458_1	0	4.1	0.35	0.07	TGgagtttatattcTAGG	9512
464_1	0	4.1	0.56	0.10	TGCtccagtgtaccCT	9755
466_1	1	2.1	0.21	0.02	CTAattgttagtagtaCTC	9818
474_1	0	2.4	0.27	0.03	GACacactcagatttcAG	9967
490_1	0	1.9	0.29	0.03	TTacttaatttcttTGGA	10055
493_1	3	1.8	0.20	0.02	CTTatgataacaacTTA	10384
512_1	0	3.3	0.63	0.10	GCacaacccagaggAA	10735
519_1	5	1.5	0.15	0.01	TAgatttgtgagGTAA	11055
529_1	0	2.7	0.24	0.03	AGAgctttattcatgtTT	11197
533_1	6	1.5	0.14	0.01	TAGattgttttagtGCA	11228
534_1	5	0.9	0.06	0.00	GTagattgttaGTGC	11229
547_1	1	1.6	0.26	0.02	TAGGataccacattatGA	11389
566_1	0	3.0	0.40	0.06	ATaaaacatgaatctCTCC	11801
567_1	2	2.5	0.34	0.04	CTTtataaacatgaaTCTC	11804
578_1	2	1.3	0.09	0.01	TACAtttattgggcTC	12081
582_1	1	1.6	0.20	0.02	AATCatgttgttacAT	12092
601_1	1	2.1	0.47	0.05	GTAAatggcaggaaCC	13711
619_1	4	3.4	0.44	0.08	TAtgacactgcaTCTT	15317
620_1	1	1.2	0.12	0.01	GTAtgacactgcaTCT	15318
636_1	0	1.3	0.19	0.01	AACAtcagacaacTCTA	15693
638_1	0	2.2	0.36	0.04	TAACatcagacaacTC	15695

【0495】

【表 1 1 - 3】

CMP ID番号	最大の阻害 (残渣PD-L1発現量%: 生理食塩水処置済%)	EC50(μM)		化合物CMP	配列番号1上 の開始位置
637_1	0	2.1	0.21	TTTAacatcagacaACTC	15695
640_1	2	3.3	0.42	CCtatttaacatcAGAC	15700
645_1	1	2.9	0.34	GAtccttatattCTGG	15854
650_1	0	2.4	0.24	AGgatcttactgtCATT	15877
651_1	4	3.4	0.33	GCAaatcaactccATC	15896
652_1	0	1.3	0.16	GTGcaaatcaactCCA	15898
653_1	4	2.0	0.09	CAATtatttctttgTGC	15910
658_1	3	1.6	0.32	TCaatagtgttagggCA	16093
659_1	5	1.4	0.20	TTCaatagtgttagggGC	16094
660_1	4	2.1	0.22	AGGTtaatttaattcaATAG	16102
665_1	3	1.8	0.18	GTttaatttcaaggTTCT	16185
678_1	3	2.1	0.43	GAgttcttggttagGC	16457
679_1	0	3.5	0.31	ATTaatttatccatCCAC	16590
680_1	4	1.6	0.12	ATCaattaatttatcCATC	16593
682_1	3	2.4	0.27	TGagataccgtgcATG	16656
683_1	0	3.2	0.16	AAtgagataccgTGCA	16658
684_1	2	2.3	0.25	CTGtggttaggctaAT	16834
687_1	5	1.3	0.13	AGCagatgggttaaGA	16858
694_1	0	1.7	0.16	GAAtgaaacttgcCTG	17047
706_1	15	3.6	0.27	GAtgatttgcttGGAG	17646
716_1	10	2.1	0.15	GTCaaccagagttTA	18068
728_1	5	1.2	0.09	AACTtgaatggctTGG	18881
733_1	0	12.7	8.01	CAGagttataaatAAG	19327
734_1	0L	14.6	3.49	GTTCaagcacaacgAA	19493
735_1	0	2.5	0.30	AGggttcaaggcacAAC	19496

【0496】

表6から選択されたオリゴヌクレオチドを、実施例1に記載のインピトロ有効性アッセイにおいて、水2.5 μM～0.004 μMでの1：3連続希釈を用い、THP-1細胞における試験を行った。IC50及び最大の阻害（残存PD-L1発現率）をオリゴヌクレオチドについて評価した。

【0497】

GraphPad Prism6で、EC50の計算を行った。IC50及び最大PD-L1ノックダウンレベルは、対照（PBS）の処置済み細胞の%として表12に示してある。

【0498】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 2 : T H P 1 細胞系における最大の阻害 (生理食塩水%及びEC50)

CMP ID番号	最大の阻害 (残渣PD-L1発現量%: 生理食塩水%)		EC50(μM)		化合物CMP	配列番号1上 の開始位置
	平均	SD	平均	SD		
6_1	12	11.5	0.73	0.38	TCGCataagaatgaCT	371
8_1	6	5.6	0.11	0.04	CTGaacacacacagtCGC	383
9_1	1	14.3	0.36	0.27	TCTgaacacacacagtCG	384
13_1	2	12.4	0.49	0.31	CTtacttagatgcTGC	495
41_1	14	14.6	0.38	0.27	TCAttttagttaccCAA	822
42_1	21	10.4	0.22	0.10	TTcattttagttaCCCA	823
58_1	6	19.8	0.97	0.81	CCagagatatatataTGC	909
77_1	5	4.8	0.14	0.04	AGTatcatagttcTCC	1075
92_1	0	12.9	0.57	0.39	AGattaagacagtTGA	1310
128_1	15	10.1	0.23	0.13	CTcatatcagggCAGT	2063
151_1	9	14.4	0.18	0.15	GTCatggattacaaCT	2324
164_1	16	22.0	0.57	0.60	TCTGtttatgtcacTG	2781
166_1	13	11.9	0.17	0.11	TGgtctgtttatGTCA	2784
169_1	0	9.3	0.22	0.11	TTcagcaaatatTCGT	2995
171_1	11	12.9	0.28	0.20	TCTattgttaggtATC	3053
222_1	16	19.7	0.68	0.64	TGacttgttaattgTGG	5467
245_1	14	6.1	0.26	0.08	TCggttatgttaTCAT	6470
246_1	28	7.3	0.10	0.20	CActttatctggTCGG	6482
252_1	19	8.0	0.29	0.12	TCAatttgttaccATA	6618
272_1	3	9.7	0.25	0.14	TACTgttagaacatgGC	7133
314_1	13	9.6	0.31	0.15	GAgtttggattagCTG	7764
344_1	11	8.0	0.14	0.06	GTTagcccttcagaTTG	8039
349_1	12	12.5	0.18	0.14	ACAagtggtatctTCT	8228
415_1	11	9.6	0.26	0.12	AAttgagtgaatCCAA	9120
493_1	15	16.5	0.48	0.34	CTTatgatacaacTTA	10384
512_1	43	14.1	0.31	0.68	GCacaacccagaggAA	10735
519_1	9	12.2	0.45	0.26	TAgatttgtagGTAA	11055
533_1	11	13.6	0.29	0.21	TAAGattgttttagtGCA	11228
534_1	9	6.5	0.09	0.03	GTagattgtttaGTGC	11229
582_1	0	12.3	0.33	0.23	AATCatgttgttacAT	12092
619_1	8	10.4	0.32	0.18	TATgacactgcaTCTT	15317
620_1	12	24.6	1.10	1.08	GTAtgacactgcaTCT	15318
638_1	2	5.4	0.00	0.00	TAACatcagacaacTC	15695
645_1	20	29.6	1.10	1.50	GAtccttatattCTGG	15854
651_1	0	11.2	0.14	0.09	GCAaatcaactccATC	15896
658_1	11	13.8	0.48	0.32	TCaatagtgttagggCA	16093
659_1	0	8.2	0.11	0.06	TTCAatagtgttaggGC	16094
733_1	0	69.6	11.03	26.95	CAGagttaataatAAG	19327
734_1	36	16.8	2.84	2.12	GTTCaagcacaacgAA	19493

【0499】

表 7 及び表 8 の結果はまた、配列番号：1 の P D - L 1 P r e m R N A を標的化するそれらの位置に関しても図 2 に示してある。

【0500】

このことから、ほとんど全ての化合物では、E C 5 0 値が 1 μ M 未満であり、且つ標的ノックダウンが対照細胞（生理食塩水で処置されたもの）において P D - L 1 発現レベルの 2 5 % を下回っていることが分かる。

10

20

30

40

50

【0501】

実施例3 - 裸型の、及びG a l N A c 結合型のP D - L 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用した、ポリ(I : C)誘導マウスにおける、インビトロ効力及び有効性ならびにインビボ P D - L 1 低減

有効性及び効能試験は、表6のオリゴヌクレオチドを使用して、M C P - 1 1 細胞における用量応答研究におけるインビトロ実験を行った。同じオリゴヌクレオチド、ならびにG a l N A c 結合型バージョン(表8のC M P I D番号7 5 5 _ 2 ~ 7 6 5 _ 2)が、ポリ(I : C)誘発C 5 7 B L / 6 J 雌マウスにおけるP D - L 1 のm R N A 及びタンパク質の発現を低減させる能力を、インビボで試験した。

【0502】

10

インビトロアッセイ

1 0 % ウマ血清、2 m M のL - グルタミン、0 . 0 2 5 m g / m l ゲンタマイシン及び1 m M のピルビン酸ナトリウムを補給したD M E M (Sigmaカタログ番号D 0 8 1 9) 中に懸濁させたM C P - 1 1 細胞(当初ATCCから購入)を、9 6 ウェル丸底プレート中のオリゴヌクレオチド(1 0 μ l)に8 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で加えて、5 % C O₂を含む3 7 の加湿インキュベーター内で2 0 0 μ l / ウェルの最終容量で3日間培養した。オリゴヌクレオチドを用量範囲濃度(5 0 μ M、1 5 . 8 μ M、5 . 0 μ M、1 . 5 8 μ M、0 . 5 μ M、0 . 1 5 8 μ M、0 . 0 5 μ M及び0 . 0 1 5 8 μ M)でスクリーニングした。

【0503】

20

PureLink Pro 96 RNA精製キット(Ambion)をメーカーの指示に従って使用して、総m R N A を抽出し、M - M L T 逆転写酵素、ランダムデカマーR E T R O s c r i p t、R N アーゼ阻害剤(Ambion)及び1 0 0 m M d N T P セット(Invitrogen, PCR Grade)をメーカーの指示に従って使用して、c D N A を合成した。遺伝子発現解析用に、P D - L 1 (Thermo Fisher Scientific; FAM - MGB Mm00452054-m1)及びGusb(Thermo Fisher Scientific; VIC - MGB - PL Mm01197698-m1)のTaqManプライマーアッセイを用いたデュプレックスセットアップで、TaqMan Fast Advanced Master Mix(2X)(Ambion)を使用してq P C Rを行った。表9に、相対的P D - L 1 のm R N A 発現レベルを、P B S 対照試料の% (P B S 処置済細胞)中の残渣P D - L 1 発現量の%として示す。GraphPad Prism 6で、E C 5 0 の計算を行った。表13に、E C 5 0 及び最大P D - L 1 ノックダウンレベルを、対照(P B S)細胞の%として示す。

30

【0504】インビボアッセイ

マウスP D - L 1 に対する5 m g / k g の非結合オリゴヌクレオチド、又はマウスP D - L 1 に対する2 . 8 m g / k g のG a l N A c 結合型オリゴヌクレオチドを、C 5 7 B L / 6 J 雌マウス(2 0 ~ 2 3 g ; 1群当たり5匹のマウス)に皮下注射した。3日後、1 0 m g / k g ポリ(I : C)(LWM、Invivogen)を、マウスに静脈内注射した。ポリ(I : C)注射後5時間目にマウスを屠殺し、肝臓試料をR N A 抽出用のRNAlater(Thermo Fisher Scientific)に入れるか、又はタンパク質抽出に備えてドライアイスで凍結させた。

40

【0505】

PureLink Pro 96 RNA Purificationキット(Ambion)をメーカーの指示に従って使用して、ホモジナイズされた肝臓試験から総m R N A を抽出した。M - M L T 逆転写酵素、ランダムデカマーRETROscript、R N アーゼ阻害剤(Ambion)及び1 0 0 m M のd N T P セット(Invitrogen, PCR Grade)をメーカーの指示に従って使用して、c D N A を合成した。遺伝子発現解析用に、P D - L 1 のm R N A (Thermo Fisher Scientific; FAM-MGB Mm00452054-m1)及びTBP(Thermo Fisher Scientific; VIC-MGB-PL Mm00446971_m1)用のTaqManプライマーアッセイを用いたデュプレックスセットアップで、TaqMan(登録商標)Fast Advanced Master Mix TaqMan Fast Advanced Master Mix(2X)(Ambion)を使用してq P C Rを行った。表13に、P D - L 1 のm R N A の相対的な発現レベルを、生理食

50

塩水及びポリ(I : C)を注射されたマウス由来の対照試料の%として示す。

【 0 5 0 6 】

1 × 停止プロテアーゼインヒビタークテル、 E D T A 不含 (Thermo Fisher Scientific) と混合した 1 0 0 m g の組織T-PER (登録商標) 組織タンパク質抽出試薬 (Thermo Fisher Scientific) 当たり 2 m l の肝臓試料をホモジナイズして、肝臓ホモジネートを調製した。クーマシープラス (Bradford) アッセイ試薬 (Thermo Scientific) をメーカーの指示に従って使用して、肝臓ホモジネート中のタンパク質濃度を測定した。 iBLOT乾式プロッティングシステム (Thermo Fisher Scientific) をメーカーの指示に従って使用して、 1 × M O P S 泳動緩衝液中、 4 ~ 1 2 % の Bis-Tris Plus ポリアクリルアミドゲル (Thermo Fisher Scientific) 上で、肝臓ホモジネート (タンパク質 4 0 μ g) を分離させ、これをニトロセルロース膜に移した。各プロットを、 6 4 k D a のバンドにて水平に 2 つの部分に切断した。膜を 5 % スキムミルクと 0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 とを含有する T B S 中でブロッキングした後、 1 : 1 0 0 0 0 希釀したウサギモノクローナル抗ビンキュリン (Abcam カタログ番号 a b 1 2 9 0 0 2) (上側の膜) 、又は 5 % スキムミルクと 0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 とを含有する T B S 中で 1 : 1 0 0 0 に希釀したヤギポリクローナル抗 m P D - L 1 (R&D Systems カタログ番号 A F 1 0 1 9) (下側の膜) と共に、 4 で一晩インキュベートした。膜を 0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 を含有する T B S 中で洗浄してから、 1 : 3 0 0 0 に希釀された H R P 結合ブタ抗ウサギ I g G (DAKO) 、又は 5 % スキムミルクと 0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 とを含有する T B S 中で 1 : 2 0 0 0 に希釀された H R P 結合ウサギ抗ヤギ I g G (DAKO) に、室温で 1 時間曝露させた。膜を洗浄した後、 ECL Select (Amersham GE Healthcare) を使用して反応性を検出した。オリゴヌクレオチドで処置された群毎に、ビンキュリンバンドに対する P D - L 1 バンドの強度を、生理食塩水及びポリ(I : C) (対照) を注射されたマウスの P D - L 1 / ビンキュリンバンド強度と比較して評価した。結果を表 1 3 に示し、裸型オリゴヌクレオチド及び結合オリゴヌクレオチドの対を使用したウェスタンプロットを図 9 A ~ 図 9 E に示す。

【 0 5 0 7 】

【表13】

表13：マウスPD-L1に対するオリゴヌクレオチドのインビトロ及びインビボ有効性

CMP ID 番号	化合物CMP	最大の阻害 (PBS%)	EC50 (μM)	PD-L1 mRNA (対照%)	PD-L1タンパク質 (対照に対して 相対的)
744_1	AGTttacattttcTGC	9.1	0.56	86	++
746_1	CACctttaaaaccCCA	5.0	0.46	181	nd
747_1	TCCtttataatcaCAC	4.4	0.52	104	++
748_1	ACGgtattttcacAGG	1.8	0.26	102	+++
749_1	GACactacaatgaGGA	7.6	1.21	104	nd
750_1	TGGtttttaggacTGT	12.4	0.74	84	nd
751_1	CGAcaaattctatCCT	9.9	0.69	112	nd
752_1	TGAtataacaatgcTAC	10.5	1.11	142	+++
753_1	TCGttgggttaaatTTA	5.7	0.53	116	+++
754_1	TGCtttataaaatgGTG	5.2	0.35	98	nd
755_2	5'-GN2-C6-caAGTttacattttcTGC	nd	nd	58	+
757_2	5'-GN2-C6-caCACctttaaaaccCCA	nd	nd	62	nd
758_2	5'-GN2-C6-caTCCtttataatcaCAC	nd	nd	53	+
759_2	5'-GN2-C6-caACGgtattttcacAGG	nd	nd	66	+
760_2	5'-GN2-C6-caGACactacaatgaGGA	nd	nd	101	nd
761_2	5'-GN2-C6-caTGGtttttaggacTGT	nd	nd	99	nd
762_2	5'-GN2-C6-caCGAcaaattctatCCT	nd	nd	84	nd
763_2	5'-GN2-C6-caTGAtataacaatgcTAC	nd	nd	93	+++
764_2	5'-GN2-C6-caTCGttgggttaaatTTA	nd	nd	53	+
765_2	5'-GN2-C6-caTGCtttataaaatgGTG	nd	nd	106	nd

+++ : 対照のPD-L1 / ビンキュリンバンド強度に類似 ; ++ : 対照のPD-L1 / ビンキュリンバンド強度よりも弱い ; + : PD-L1 / ビンキュリンバンド対照よりもはるかに弱い ; nd = 未検。

【0508】

表13のデータから分かるように、オリゴヌクレオチドのGalNAc結合によってインビボPD-L1の低減が改善されることが明らかである。mRNAの低減は概ね、PD-L1タンパク質の低減と相關する。CMP ID番号：754_1を除き、インビトロでのEC50値が低いことは、いったんオリゴヌクレオチドがGalNAcに結合された後に、インビボPD-L1 mRNAの低減が良好であることが概ね反映されている。

【0509】

実施例4 - ポリ(I:C)誘導マウス由来の選別された肝細胞及び非実質細胞におけるインビボPK/PD

ポリ(I:C)誘導マウスから単離された肝細胞及び非実質細胞における、裸型オリゴヌクレオチド及びGalNAc結合型オリゴヌクレオチドの分布、及びPD-L1 mRNAの低減を調べた。

【0510】

マウスPD-L1のmRNAを標的化する5mg/kgの非結合オリゴヌクレオチド(748_1)又は7mg/kgのGalNAc結合型オリゴヌクレオチド(759_2)を、C57BL/6J雌マウスに皮下注射した(1群当たりn=3)。2日後、15mg/kgポリ(I:C)(LWM、InvivoGen)を、マウスに腹腔内注射した。マウスをポリ(I:C)注射後18~20時間麻酔し、肝臓を15mMのHepesと0.38mMのEGTAを含有するハンクス平衡塩類溶液を使用して、毎分7mlの流速で5分間灌流させた。続いて、0.17mg/mlコラゲナーゼ2型(Worthington 4176)、0.03%B

10

20

30

40

50

S A、3.2 mMのCaCl₂及び1.6 g / l のNaHCO₃を含むコラゲナーゼ溶液(ハンクス平衡塩類溶液)で12分間洗浄した。灌流後、肝臓を摘出し、肝臓嚢を開き、ウィリアムズE培地を使用して肝臓懸濁液を70 μmの細胞濾過器で濾過し、以後の分析に備えて細胞懸濁液(=混合肝細胞)のアリコートを摘出した。残りの細胞懸濁液を、50 × gで3分間遠心分離した。後で非実質細胞を精製するため、上清を回収した。ペレットを25 mlのウィリアムズE培地(Sigmaカタログ番号W1878 : 1 × Pen / Stre p、2 mMのL-グルタミン及び10% FBS(ATCC #30-2030)を補給したもの)中に再懸濁させ、90%パーコールと肝細胞とを含有する25 mlのウィリアムズE培地と混合し、50 × gで10分間遠心分離して肝細胞を沈殿させた。ウィリアムズE培地で2回洗浄した後、沈殿した肝細胞をウィリアムズE培地中に再懸濁させた。非実体細胞を含有する上清を500 × gで7分間遠心分離し、細胞をRPMI培地4 ml中に再懸濁させて、2つのパーコール層(25%及び50%パーコール)に通して30分間1800 × gで遠心分離した。2つのパーコール層間の非実体細胞が回収された後、細胞を洗浄し、RPMI培地中に再懸濁した。

【0511】

PureLink Pro 96 RNA Purificationキット(Ambion)をメーカーの指示に従って使用して、精製肝細胞、非実質細胞、及び総肝臓懸濁液(非分画肝細胞)から総mRNAを抽出した。MLTリバーストランスクリプターゼ、ランダムデカマーRETROscript、RNアーゼ阻害剤(Ambion)、及び100 mMのdNTPセット(Invitrogen, PCR Grade)を、メーカーの指示に従って使用して、cDNAを合成した。遺伝子発現解析用に、PD-L1(Thermo Fisher Scientific; FAM-MGB Mm00452054-m1)及びTBP(Thermo Fisher Scientific; VIC-MGB-PL Mm00446971_m1)のTaqManプライマーアッセイを用いたデュプレックスセットアップで、TaqMan Fast Advanced Master Mix(2X)(Ambion)を使用してqPCRを行った。表10に、PD-L1のmRNAの相対的な発現レベルを、生理食塩水及びポリ(I:C)を注射されたマウス由来の対照試料の%として示す。

【0512】

配列5' - T A C C G T - s - B i o - 3'を有するビオチン化捕捉プローブ、及び配列5' - D I G - C 1 2 - S 1 - C C T G T G - 3'を有するジゴキシゲニン結合検出プローブを用いたELISAを使用して、オリゴヌクレオチド内容物の分析を行った。プローブは、ホスホジエステル骨格を有するDNAのみからなっていた。5 mm径ステンレススチールビーズ1個を含む2 mLエッペンドルフチューブ中のMgNa純粋溶解緩衝液(Rocheカタログ番号03604721001)1.4 mL中で、肝臓試料(約50 mg)をホモジナイズした。均一な溶解物が得られるまで、Retsch MM400ホモジナイザー(Merck Eurolab)で試料をホモジナイズした。試料を室温で30分間インキュベートした。規定濃度の非結合アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物(CMP ID番号748_1)を未処置の肝臓試料中にスパイクし、これらを試料として処置することにより、標準物質(Standards)を生成した。スパイクイン濃度を、予期される試料オリゴ含量(約10倍以内)に一致するように選択する。

【0513】

ホモジナイズした試料を5×SSCT緩衝液(750 mMのNaCl、及び75 mMのクエン酸ナトリウム、0.05%(v/v)Tween-20(pH 7.0)含有)中で最小10倍に希釈し、捕捉-検出溶液(35 nM捕捉プローブ及び5×SSCT緩衝液中35 nM検出プローブ)を使用して、段階希釈で6×2倍希釈を行い、室温で30分間インキュベートした。試料を96ウェルの streptavidin-coated plate(Nuncカタログ番号436014)にウェル当たり100 μLで移した。プレートを穏やかに搅拌しながら室温で1時間インキュベートした。2×SSCT緩衝液で3回洗浄し、新たに作製された0.05%(v/v)Tween-20(pH 7.2)を含有するPBST(リン酸緩衝生理食塩水)で1:4000に希釈されたDIG-AP Fabフラグメント(Roche Applied Science、カタログ番号11093274910)100 μLを各ウェルに加えて、穏やかに搅拌しながら室温で1時間インキュベートした。2×SSCT緩衝液で3

10

20

30

40

50

回洗浄し、 $100 \mu L$ のアルカリホスファターゼ (AP) 基質溶液 (ブルーフォス (Blue Phos) 基質、KPL製品コード 50 - 88 - 00、新たに調製されたもの) を添加する。穏やかに攪拌しながら 30 分間インキュベートした後、色の強度を 615 nm で分光光度的に測定した。未加工データを、リーダー (Gen5 2.0ソフトウェア) からエクセル形式にエクスポートし、Excel で更に分析した。GraphPad Prism 6ソフトウェア及びロジスティック 4 PL 回帰モデルを使用して、検量線を生成した。

【0514】

【表 14】

表 14：非結合型及び GalNAc 結合型オリゴヌクレオチドで処置されたポリ (I : C) マウス由来の全肝臓懸濁液、肝細胞、及び非実質細胞における PD-L1 発現ならびにオリゴ含量 ($n=3$)。

細胞型	CMP ID番号	PD-L1発現量 (生理食塩水-ポリ(I:C)%)		オリゴ含有量 (ng/ 10^5 細胞)	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差
総肝臓	748_1	31	12.4	2.3	0.3
	759_2	28	5.3	8.3	1.1
肝細胞	748_1	33	8.0	5.1	3.7
	759_2	7	1.0	43.8	18.9
非実質細胞	748_1	31	10.1	2.2	0.7
	759_2	66	1.6	1.7	0.9

【0515】

結果から明らかなように、裸型 (CMP ID番号: 748_1) 及び結合 (CMP ID番号: 759_2) オリゴヌクレオチドは、総肝細胞内で PD-L1 mRNA を同様に良好に低減させる。単離された肝細胞において、結合オリゴヌクレオチドの効果は裸型オリゴヌクレオチドの効果よりも約 5 倍強力で、裸型オリゴヌクレオチドは非実質細胞の GalNAc 結合オリゴヌクレオチドよりも 2 倍強力な効果を呈した。肝細胞及び非実質細胞において、PD-L1 の mRNA 発現の低下は、これらの細胞型におけるオリゴヌクレオチド含量と或る程度相関する。

【0516】

実施例 5 - 裸型 PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチド及び GalNAc 結合 PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用した、AAV/HBV マウスにおける、インビボ PD-L1 ノックダウン

本研究では、AAV/HBV マウスを裸型又は GalNAc 結合型 PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、肝臓における PD-L1 の mRNA 発現量及び HBV 遺伝子発現を評価した。

【0517】

第 1 週目に、5 ~ 8 週齢の雌 HLA-A2 / DR1 マウス (1 群当たり動物 5 匹) を、ビヒクル (生理食塩水)、裸型 PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチド (CMP ID 番号 752_1 (5 mg / kg sc))、及び GalNAc (5 mg / kg sc) PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチド (7 mg / kg 皮下での CMP ID 番号 763_2) で予備処置した。これらの用量はオリゴヌクレオチドの等モル濃度に対応する。マウスを 0 週目に 5×10^{10} vg の AAV-HBV により形質導入した。詳細については、「材料と方法」の節の AAV/HBV マウスモデルの説明を参照のこと。AAV-HBV 形質導入後の第 1 週目から第 4 週目まで 1 週間間隔で、PD-L1 オリゴヌクレオチド又はビヒクル (生理食塩水) を更に 4 回皮下注射でマウスに投与した。

【0518】

形質導入の 1 週間前及び各注射の 1 週間後に血液試料を採取した。

【0519】

10

20

30

40

50

最後の注射の2週間後にマウスを屠殺し、その肝臓をPBS灌流後に除去した。肝臓をより小さな断片に切断して、直接凍結した。

【0520】

HBV遺伝子の発現を測定するに際して、QIAamp One-For-All Nucleic Acidキット、カタログ番号965672を使用してQiagen Biorobotで血清からDNAを抽出し、血清をPBS中で1:20希釈にて希釈して、合計100μlを200μlの緩衝液AL中に溶出させてから、本キットからDNAを100μl単位で溶出させた。

【0521】

リアルタイムqPCR用に、TaqMan Gene Expression Master Mix(カタログ番号4369016、Applied Biosystems)を、以下のプライマーF3_core、R3_core、P3_core(1Integrated DNA Technologies)それぞれ100μMを1:1:0.5で加えたプライマーハイブリッドと共に使用した。
10

フォワード(F3_core): C T G T G C C T T G G G T G G C T T T (配列番号: 784)

リバース(R3_core): A A G G A A A G A A G T C A G A A G G C A A A A (配列番号: 785)

プローブ(P3_core): 5'6-FAM-A G C T C C A A A / ZEN/TTC T T T A T A A G G G T C G A T G T C C A T G - 3 I A B k F Q (配列番号: 786)

【0522】

HBVプラスミド(遺伝子型D、GTD)を用いた検量線を、初回の 1×10^9 コピー/μlから1コピー/μlまで、10倍希釈を用いて調製して、1反応当たり5μlで使用した。

【0523】

反応毎に、10μlの遺伝子発現マスターミックス、4.5μlの水、0.5μlのプライマーミックス、及び5μlの試料又は標準液を加えて、qPCRを行った。

【0524】

分析用に、検量線を使用して、コピー数/ml/ウェルを計算した。結果を表15に示す。

【0525】

PD-L1のmRNA発現量をqPCRで測定した。

【0526】

凍結した肝臓片からmRNAを抽出し、これをセラミックビーズ(Lysing Matrix D tubes、116913500、mpbio)とTrizol 1mlとを含有する2mlチューブに加えた。

【0527】

プリセリーズ(Precellys)製の組織破碎装置(Tissue Disruptor)を使用して肝臓片をホモジナイズした。200μlのクロロホルムをホモジネートに添加し、ボルテックスして、4にて10000rpmで20分間遠心分離した。清澄な相(約500μl)を含有するRNAを新しいチューブに移し、同じ容量の70%EtOHを添加した。よく混合した後、溶液をRNeasyスピンカラムに移し、RNeasy KitのマニュアルRNeasy Mini Kit、カタログ番号74104、Qiagen(RNA消化RNアーゼ不含DNアーゼセット、カタログ番号79254を含む)に従って、RNAを更に抽出した。50μlのH₂O中での溶出最終RNA濃度を測定し、全ての試料について100ng/μlに調整した。

【0528】

Taqman RNA-to-ct 1-step Kit(カタログ番号4392938、Thermo Fisher)をメーカーの指示に従って使用して、7.5μlのRNAに対してqPCRを行った。混合して使用されたprimerは、PD-L1_1-3(プライマー番号Mm00452054_m1、Mm03048247_m1及びMm03048248_m1)、ならびに内因性対照(ATCB Mm00607939_s1、CANX Mm00500330_

20

30

40

50

m 1、Y W H A Z M m 0 3 9 5 0 1 2 6 _ s 1 及び G U S B M m 0 1 1 9 7 6 9 8 _ m 1) が含有されていた。

【 0 5 2 9 】

2 ^ - d d c t 法を使用して、データを分析した。4つの内在性対照全ての平均を用い、d c t 値を計算した。内因性対照の平均に対する P D - L 1 発現量、及び生理食塩水(%)

【 0 5 3 0 】

【表 15】

表 15 : 非結合型及び G a l N A c 結合型オリゴヌクレオチド (n = 5) で処置された
AAV / HBV マウスにおける、P D - L 1 の mRNA 発現量ならびに HBV DNA。

10

CMP ID番号		PD-L1 mRNA発現量 (生理食塩水%)		HBV DNA発現量 (生理食塩水%)	
		平均	標準偏差	平均	標準偏差
裸型	752_1	55	35	72	16
G a l N A c 結合型	763_2	34	3	79	9

【 0 5 3 1 】

これらの結果から、裸型及び G a l N A c 結合型オリゴヌクレオチドは両方とも、 A A V / HBV マウスの肝臓における P D - L 1 の mRNA の発現量を低減させることができ、 G a l N A c 結合オリゴヌクレオチドの方が幾分良好であることが分かる。また、両方のオリゴヌクレオチドによって、血清中の HBV DNA が若干低減された。

20

【 0 5 3 2 】

実施例 6 - A A V / HBV マウスにおける T 細胞応答に対するインビボ効果

本研究では、パストール (Pasteur) から入手された A A V / HBV マウスを、 P D - L 1 を標的化する抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、裸型又は G a l N A c 結合型のいずれかであった。処置中に、抗原提示細胞による効率的な T 細胞プライミングを確実にするために、 H B s 抗原及び H B c 抗原に抗する DNA ワクチンで動物を免疫した (「材料と方法」の節を参照のこと) 。この処置が肝臓内及び脾臓内の細胞母集団ならびにこれらの母集団における P D - L 1 発現 30 に対してどのように影響するか、また HBV 特異的 T 細胞応答を同定できるかどうかを評価した。

30

【 0 5 3 3 】

処置プロトコール :

雌の H L A - A 2 / D R 1 マウスを以下のプロトコールに従って処置した。本研究は、下の表 16 及び表 17 に示すような投与レジメンにおいて若干異なる 2 つの別個のサブ研究で実施された。

【 0 5 3 4 】

「材料と方法」の節に記載されているように、DNA ワクチン及び抗 P D - L 1 抗体を投与した。使用されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、皮下注射 (s . c .) として投与された場合に、 5 m g / k g の C M P I D 番号 7 4 8 _ 1 (裸型) 、及び 7 m g / k g の C M P I D 番号 : 7 5 9 _ 2 (G a l N A c 結合型) であった。

40

【 0 5 3 5 】

【表16】

表16：DNAワクチン及びDNAワクチン+抗PDL-1抗体を用いたAAV/HBVマウス処置プロトコール（各群マウス6匹）

経過日数	ピヒクル (第10群)	DNAワクチン (第11群)	DNAワクチン+抗PDL-1抗体 (第13群)
0	AAV/HBV		
29*	動物の無作為化		
34	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
41	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
48	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
50	-	CaTx	CaTx
55*	PBS+アイソタイプ	DNA	DNA+Ab
62	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
69	PBS+アイソタイプ	DNA	DNA+Ab
76*	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
83	生理食塩水+アイソタイプ	-	Ab
97*	屠殺		

アイソタイプ=マウス IgG対照抗体、CaTx=カルジオトキシン、DNA=DNAワクチン、Ab=抗PDL-1抗体、及び*=血清収集

【0536】

【表17】

表17：DNAワクチン及びDNAワクチン+裸型又は結合型PDL-1オリゴヌクレオチド(ASO)を用いたAAV/HBVマウス処置プロトコール(各群マウス7匹)

経過日数	ビヒクル (第1群)	DNAワクチン (第2群)	DNAワクチン+ PDL-1 ASO (第7群)	DNAワクチン+ GN-PDL-1 ASO (第8群)
0	AAV/HBV			
29*	動物の無作為化			
39	生理食塩水	生理食塩水		
41		生理食塩水	ASO	GN-ASO
46	生理食塩水	生理食塩水		
49		生理食塩水	ASO	GN-ASO
53	生理食塩水	生理食塩水		
55	CaTx	CaTx	CaTx	CaTx
56		生理食塩水	ASO	GN-ASO
59	PBS+ 生理食塩水	DNA+PBS	DNA	DNA
62*		生理食塩水	ASO	GN-ASO
67	生理食塩水	生理食塩水		
70		生理食塩水	ASO	GN-ASO
74	PBS+ 生理食塩水	DNA+PBS	DNA	DNA
77		生理食塩水	ASO	GN-ASO
81	生理食塩水	生理食塩水		
84*		生理食塩水	ASO	GN-ASO
88	生理食塩水	生理食塩水		
91		生理食塩水	ASO	GN-ASO
102	屠殺			

DNA=DNAワクチン、CaTx=カルジオトキシン、Ab=抗PDL-1抗体、ASO=裸型PDL-1オリゴヌクレオチド、GN-ASO=GalNAc-PDL-1オリゴヌクレオチド、及び*=血清収集

10

20

30

【0537】

屠殺時に各群からの各マウスの脾臓及び肝臓の単核細胞を採取し、赤血球細胞を枯渇させた(Lysing Buffer, BD biosciences, 555899)。「材料と方法」の節に記載されているように、肝単核細胞に特定の調製物が必要とされた。

【0538】

細胞母集団：

サイトメトリーを使用して肝臓単核細胞(「材料と方法」を参照)の表面標識によって、肝臓における細胞集団を分析した。

【0539】

対照群(すなわちビヒクル群及びDNA免疫群)と比較して、処置マウスの脾臓及び肝臓におけるNK細胞の頻度には、有意な変化が全く認められなかった。表18に示すように、肝臓において、裸型PDL-1オリゴヌクレオチド(CMP-ID番号:748_1)及びGalNAc結合型PDL-1オリゴヌクレオチド(CMP-ID番号:759_2)で処置された群は、いずれかの対照群(すなわち、ビヒクル及びDNAで免疫化された群)と比較してT細胞数が有意に増加した。これは、図10Aにも同様に示されている。この増加は、CD4+及びCD8+T細胞母集団の両方の増加に起因するものであった(それぞれ表18、図10B及び図10C)。

【0540】

40

【表18】

表18：処置後の肝臓におけるT細胞（細胞数：百万単位）

	T細胞(百万単位)		CD4+ T細胞(百万単位)		CD8+ T細胞(百万単位)	
	平均	標準	平均	標準	平均	標準
ビヒクル(第1群)	0.77	0.44	0.51	0.35	0.11	0.05
DNAワクチン(第2群)	0.90	0.24	0.58	0.16	0.16	0.08
DNAワクチン+ 抗PD-L1抗体(第13群)	1.98	0.90	1.40	0.81	0.41	0.23
ビヒクル(第10群)	1.73	0.87	1.13	0.55	0.40	0.25
DNAワクチン(第11群)	1.27	0.97	0.79	0.58	0.32	0.32
DNAワクチン+ PD-L1 ASO(第7群)	3.78	1.31	2.46	0.72	0.79	0.39
DNAワクチン+ GN-PD-L1 ASO(第8群)	3.33	0.66	2.18	0.40	0.67	0.17

【0541】

P D - L 1 発現量：

屠殺の時点での、脾臓及び肝臓由来のマクロファージ、B細胞及びT細胞におけるP D - L 1 タンパク質の発現を評価した。表面標識抗体混合物中にP D - L 1 抗体を存在させることによって（「材料と方法」を参照）、サイトメトリーを用い、P D - L 1 発現細胞の定量が可能となった。

【0542】

脾臓における、マクロファージ内、B細胞内及びC D 4 + T細胞内でのP D - L 1 発現率（%）に処置間の有意差は観察されなかった。P D - L 1 を発現するC D 8 + T細胞の%は、他の処置と比較して、裸型P D - L 1 オリゴヌクレオチド（C M P I D番号748_1）及びG a l N A c 結合型P D - L 1 オリゴヌクレオチド（C M P I D番号759_2）で処置したマウスでは低かった（データ非公開）。

【0543】

肝臓において、P D - L 1 は主としてC D 8 + T細胞上で発現した。対照群（それぞれビヒクル接種群及びDNAワクチン接種群の2つを組み合わせた図11A）では、平均頻度が32%及び41%であった。裸型P D - L 1 オリゴヌクレオチド又はG a l N A c P D - L 1 オリゴヌクレオチドでの治療によって、P D - L 1 を発現するC D 8 + T細胞の頻度が減少した（表19及び図11Aを参照）。これらの細胞型は、C D 8 + T細胞よりもP D - L 1 の発現率が有意に少ないが、A S O 処置後のB細胞及びC D 4 + T細胞ではまた、P D - L 1 を発現する細胞の割合（%）における有意な差が認められた（表19、図11B及び図11Cを参照）。また、全ての細胞型において、抗P D - L 1 抗体での処置によるP D - L 1 の発現低減は明らかであった。しかしながら、この低減は、治療に使用される抗P D - L 1 抗体を介してP D - L 1 エピトープが部分的に遮断されたことに起因するものであり、その結果、表面標識抗体混合物中のP D - L 1 検出抗体がP D - L 1 に結合するのが妨げされることになる。したがって、処置に使用された抗P D - L 1 抗体を介したP D - L 1 下方制御のようなものと見られるのは、処置抗体と検出抗体との間でエピトープの競合が発生した結果でありうる。

【0544】

10

20

30

40

【表19】

表19：PD-L1発現を有する肝臓細胞母集団の割合(%)

	CD8+ T細胞の割合		CD4+ T細胞の割合		B細胞の割合	
	平均	標準	平均	標準	平均	標準
ビヒクル(第10群)	35.5	4.7	0.75	0.52	5.9	1.5
DNAワクチン (第11群)	36.8	7.7	0.61	0.08	5.5	1.1
DNAワクチン+ 抗PD-L1抗体 (第13群)	18.6	12.3	0.33	0.10	2.9	1.7
ビヒクル (第1群)	28.5	11.5	0.64	0.21	5.9	1.7
DNAワクチン (第2群)	44.9	14.4	1.43	0.69	8.7	3.1
DNAワクチン+ PD-L1 ASO (第7群)	9.6	2.4	0.37	0.21	2.9	0.8
DNAワクチン+ GN-PD-L1 ASO Group 8)	14.6	3.3	0.31	0.11	2.8	0.8

10

20

【0545】

H B V特異的T細胞応答：

I F N 及びT N F 産生を検出する細胞内サイトカイン染色アッセイ（「材料と方法」の節を参照）を使用して、炎症性サイトカインを産生するN K細胞、C D 4 + T細胞、及びC D 8 + T細胞を検出した。

【0546】

屠殺時に、脾臓内でN K細胞、I F N - 及びT N F 分泌C D 4 + T細胞は検出されなかった（頻度<0.1%）。裸型P D - L 1オリゴヌクレオチド又はG a l N A c P D - L 1オリゴヌクレオチド、ならびにDNAワクチンのみを受けた本研究のマウス（データ非公開）で処置したマウスにおいて、2つのH B V抗原を標的化するI F N 産生C D 8 + T細胞が検出された。

30

【0547】

屠殺時に、DNA免疫化H B Vキャリアマウスの肝臓内では、I F N 産生N K細胞は検出されなかった一方、幾つかのDNA免疫化マウスの肝臓内は、I F N 分泌C D 4 + T細胞がコア(Core)又はS 2 + Sに特異的であった(<0.4%、データ非公開)。大部分のDNA免疫マウスにおいて、I F N を産生するH B V S 2 + S特異的C D 8 + T細胞が検出された。DNAワクチンと裸型P D - L 1オリゴヌクレオチド又はG a l N A c P D - L 1オリゴヌクレオチドとの組み合わせで処置したマウスにおいては、I F N 分泌C D 8 + T細胞の頻度が増加したのに対して、抗P D - L 1抗体で処置した場合には、DNAワクチン接種に対する明白な付加的効果が認められなかった（図12）。エンベロープ及びコア抗原を標的化するI F N 産生C D 8 + T細胞が、ほとんどのDNA免疫化群（抗P D - L 1抗体を除く）で検出された（図12B）。ほとんどのS 2 - S特異的T細胞では、I F N 及びT N F の両方が産生された（図12C）。また、結果を表20に示す。

40

【0548】

【表20】

表20：総IFN γ 又はIFN γ +TNF α 細胞集団由来のHBV抗原(S2-S又はコア)特異的CD8+T細胞の割合(%)

	PreS2-S特異的T細胞 (IFN γ 細胞の割合)	コア特異的T細胞 (IFN γ 細胞の割合)	S2-S特異的T細胞 (IFN γ +TNF α の割合)			
	平均	標準	平均	標準	平均	標準
ビヒクル (第10群)	0.15	0.37	0.18	0.43	0.00	0.00
DNAワクチン (第11群)	1.48	1.10	0.47	0.53	0.42	1.02
DNAワクチン+ 抗PDL-1抗体	1.18	0.95	0	0	0.38	0.49
Vehicle (第1群)	0.17	0.45	0.11	0.28	0.00	0.00
DNAワクチン (第2群)	1.70	1.02	0.27	0.51	0.98	0.90
DNAワクチン+ PDL-1 ASO	2.56	1.60	0.78	0.80	1.44	1.55
DNAワクチン+ GN-PDL-1 ASO	3.83	2.18	0.68	1.16	2.62	1.62

【0549】

実施例7 - AA V / HB V マウス血清中のHB V 抗原及びHB V DNAに対するインビオ効果

本研究では、上海から入手されたAA V / HB V マウス（「材料と方法」の節を参照）を、GalNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドCMP ID番号759_2で処置した。

【0550】

血清中のHB e 及びHB s 抗原ならびにHB V DNA レベルに対して処置が与えた影響を、ビヒクル処置動物と比較して評価した。

【0551】

処置プロトコール：

「材料と方法」の節で上海モデルに記載されているように、本研究では、HB Vゲノムを保有する組み換えアデノ随伴ウイルス(AA V)(AA V / HB V)を感染させた雄のC57BL / 6マウスを使用した。5mg / kg又は媒体(生理食塩水)のアンチセンスオリゴヌクレオチドCMP ID番号：759_2の両方を、8週間にわたって週1回マウス(1群当たりマウス6匹)に注射した。この注射は、皮下注射(s.c.)として投与された。処置中は毎週、処置後6週間に血液試料を採取した。以下に記載するように、HB V DNA、HB s 抗原及びHB e 抗原レベルを血清試験で測定した。最初の10週間分の結果を、表21及び図13に示す。出願の時点で依然として調査が進行中であったので、残りの4週間分のデータは得られていない。

【0552】

HB s 抗原及びHB e 抗原の検出：

HB s 抗原・化学発光イムノアッセイ(CLIA)及びHB e 抗原CLIAキット(それぞれAutobio diagnostics Co. Ltd., Zhengzhou, China、カタログ番号CL0310-2及びCL0312-2)を使用して、製造業者のプロトコールに従い、感染AA V-HB Vマウス血清中の血清HB s 抗原及びHB e 抗原レベルを測定した。概略説明すると、50μlの血清をそれぞれの抗体被覆マイクロタイパープレートに移し、50μlの酵素結合試薬を加えた。プレートを室温にて振盪機上で60分間インキュベートした後、自動

10

20

30

40

50

洗浄機を使用して全てのウェルを洗浄緩衝液で6回洗浄した。25μlの基質A、次いで25μlの基質Bを、各ウェルに加えた。プレートを室温で10分間インキュベートした後、Envisionルミネセンスリーダーを使用して発光を測定した。1ngのHBs抗原=1.14IUとした場合、HBs抗原は単位IU/mlで与えられる。HBe抗原は、単位NCU/ml血清で与えられる。

【0553】

HBV DNAの抽出及びqPCR:

最初に、マウス血清をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で10倍(1:10)に希釈した。MagNA Pure 96(Roche)ロボットを使用して、DNAを抽出した。希釈された血清50μlを処置カートリッジ中で200μlのMagNA Pure 96外部溶解緩衝液(Roche、カタログ番号06374913001)と混合し、10分間インキュベートした。次いで、「MagNA Pure 96 DNA and Viral Nucleic Acid Small Volume Kit」(Roche、カタログ番号06543588001)及び「Viral NA Plasma SV external lysis 2.0」プロトコールを使用して、DNAを抽出した。DNA溶出容量は50μlであった。

【0554】

抽出されたHBV DNAの定量は、Taqman qPCRマシン(ViiA7、Life technologies)を使用して行った。各DNA試料をPCRで二重に試験した。384ウェルプレート中TaqMan Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems、カタログ番号4369016)10μlと、PrimeTime XL qPCR Primer/Probe(IDT)0.5μlと、蒸留水4.5μlとを含有するPCRマスターMix 15μlに、DNA試料5μlを加えて、PCRを行った。その際に使用した設定は以下のとおり: UDGインキュベーション(2分、50)、酵素活性化(10分、95)及びPCR 40サイクル分(95にて15秒間変性;ならびに60にて1分間アニーリング及び伸長)。DNAコピー数は、ViiA7ソフトウェアによるHBVプラスミドDNA検定線に基づいて、C_t値から計算した。

【0555】

TaqManプライマーの配列及びプローブ(IDT):

フォワードコアプライマー(F3_core): C T G T G C C T T G G G T G G
C T T T (配列番号: 784)

リバースプライマー(R3_core): A A G G A A A G A A G T C A G A A G
G C A A A A (配列番号: 785)

Taqmanプローブ(P3_core): 56 - F A M / A G C T C C A A A / Z E N / T
T C T T T A T A A G G G T C G A T G T C C A T G / 3 I A B k F Q
(配列番号: 786)。

【0556】

【表21】

表21：GalNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置後のAV/HBVマウス由来の血清中のHBV-DNA、HBs抗原及びHBc抗原レベル。

経過日数	生理食塩水						CMP ID番号:759_2(5mg/kg)					
	HBV-DNA		HBs抗原		HBe抗原		HBV-DNA		HBs抗原		HBe抗原	
	平均	標準	平均	標準	平均	標準	平均	標準	平均	標準	平均	標準
0	7.46	0.35	3.96	0.48	3.23	0.14	7.44	0.29	3.87	0.40	3.17	0.13
7	7.53	0.23	4.17	0.45	3.35	0.10	7.53	0.20	3.91	0.42	3.19	0.18
14	7.57	0.24	4.12	0.49	3.19	0.11	7.45	0.22	3.90	0.50	2.99	0.27
21	7.47	0.27	3.93	0.51	3.12	0.05	7.33	0.47	3.71	0.76	2.78	0.26
28	7.68	0.26	3.88	0.67	3.18	0.13	7.45	0.46	3.65	0.93	2.67	0.38
35	7.69	0.21	4.03	0.54	2.95	0.08	7.13	0.75	2.98	1.05	2.04	0.38
42	7.58	0.23	3.89	0.65	3.34	0.10	6.69	0.89	2.60	1.05	1.98	0.45
49	7.77	0.17	3.54	1.06	3.08	0.26	6.56	1.26	2.19	0.70	1.47	0.37
56	7.71	0.24	3.99	0.86	3.28	0.05	6.21	1.48	2.28	0.84	1.38	0.30
63	7.59	0.28	3.67	1.07	3.25	0.13	6.08	1.39	2.08	0.71	1.35	0.30

【0557】

本研究から分かるように、GalNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドCMP番号759_2が、6週間の処置後のHBV-DNA、HBs抗原及びHBc抗原レベルの低下に対する有意な効果と、処置後少なくとも2週間にわたって持続する効果と、を有する。

【0558】

実施例8 - GalNAc結合型PD-L1オリゴヌクレオチドを使用した、ヒト初代肝細胞におけるインビボPD-L1ノックダウン

初代ヒト肝細胞におけるPD-L1転写産物を減少させるGalNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物の能力を、ゲノミクスを用いて調べた。

【0559】

細胞培養

凍結保存されたヒト肝細胞を、10%ウシ胎児血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)及びL-グルタミン(0.292mg/ml)を補給したWME中で 5×10^6 細胞/mlに希釈し、 2×10^5 細胞/ウェルの密度でコラーゲン被覆24ウェルプレート(Becton Dickinson AG, Allschwil, Switzerland)中に播種した。細胞を4時間前培養し、細胞培養プレートに付着させてから、最終濃度100μMのオリゴヌクレオチドでの処置を開始した。使用されたオリゴヌクレオチドは、表21及び表8に示すとおりであり、ビヒクリルはPBSとされた。播種培地を、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(0.1mg/ml)及びL-グルタミン(0.292mg/ml)を補給した315μlの無血清WMEで置き換えて、1mMのPBS中のオリゴヌクレオチドストック溶液35μlを細胞培養物に添加し、これを細胞上に24時間又は66時間放置した。

【0560】

ライプラリの調製

Stranded mRNAケミストリーを使用し、 2×51 bp対末端リード及び30M/試料(Q-squared EA)の配列決定ストラテジーを用いて、転写物発現プロファイリングを行った。ウェル中にQiagen RLT緩衝液350μlを添加して、細胞を溶解させ、無作為化スクームで受託した。

【0561】

QiagenRNeasy Mini Kitを使用して、mRNAを精製した。mRNAを定量し、Agilent

10

20

30

40

50

Bioanalyzerを使用して完全性を評価した。単離されたRNAを初期品質評価した際、全ての試料がRINスコア>7.0で、100ngの入力品質メトリックを満たしていることが観察された。

【0562】

100ngの全RNAから開始して、Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Preparationを使用して、全ての試料について配列決定ライプラリを作成した。最終のcDNAライプラリをサイズ分布及びAgilent Bioanalyzer(DNA 1000キット)を用いて分析し、qPCR(KAPA Library Quant Kit)で定量し、配列決定の準備に際して2nMに標準化した。Standard Cluster Generation Kit v5を使用して、cDNAライプラリをフローセル表面に結合させ、cBotを等温的に付着させて、付着されたcDNA構築物をそれぞれ約1000コピーのクローン集落まで増幅した。TruSeq SBSキットを用いた合成による配列決定技術によって、DNA配列を決定した。10

【0563】

データ処理

GSNAPショートリードアライメントプログラムを使用して、長さ $2 \times 51\text{ bp}$ のIlluminaペアエンド・シーケンシング・リード(paired-end sequencing reads)を、ヒト参照ゲノムhg19上にマッピングした。SAMTOOLSプログラムを使用して、SAMフォーマットアライメントを、ソートアライメントBAMフォーマットファイルに変換した。hg19に対応するGTFファイルで指定されたNCBI RefSeqからのエキソンアノテーションに基づいて、PD-L1の遺伝子読み取りカウントを推定した。各試料の異なるライプラリサイズを考慮した正規化工程が、DESeq2Rパッケージを使用して適用された。20

【0564】

GaNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチド化合物とのインキュベーション後のPD-L1転写物の減少を、表22に示す。

【0565】

【表 22 - 1】

表22: GalNAc結合型オリゴヌクレオチド($n=4$)で処置後のヒト初代肝細胞におけるPD-L1転写物の減少

化合物	PD-L1発現レベル24h (ライブラリサイズ調整カウント)	PD-L1発現レベル66h (ライブラリサイズ調整カウント)
ビヒクル	259	156
	159	168
	192	136
	202	211
767_2	7	7
	11	14
	22	9
	28	15
766_2	16	13
	15	10
	17	11
	29	13
769_2	15	21
	18	18
	25	18
	26	25
768_2	41	25
	27	48
	31	25
	34	22
770_2	21	16
	44	62
	67	51
	38	63

【0566】

ビヒクルで処理した試料と比較して、5つのGalNAc結合型アンチセンス化合物は全て24時間及び66時間のインキュベーション後に有意なPD-L1転写物の減少を示した。

【0567】

実施例9 - HBV感染ASGPR-HepaRG細胞における結合及び裸型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドのEC50

HBVに感染したASGPR-HepaRG細胞における2つの裸型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチド及び同等のGalNAc結合型PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドの効力を比較した。

【0568】

細胞系統

HepaRG細胞(Biopredic International, Saint-Gregoire, France)を、ウイリアムE培地(10% HepaRG増殖サプリメント(Biopredic)を添加したもの)で培養した。レンチウイルス法を使用して、この細胞系統から、ヒトASGPR1及びASGPR2を安定に過剰発現するHepaRG細胞系統を生成した。CMVプロモーター及びピューロマイシン耐性遺伝子の制御下でヒトASGPR1及び2をコードするSirion biotech(CLV-CMV-ASGPR1-T2a_ASGPR2-IRES-Puro)が必要に応じて産生したレンチウイルスを、増殖用HepaRG細胞に、感染多重度(MOI)を300として形質導入した。形質

10

20

30

40

50

導入細胞を $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ ピューロマイシンで 11 日間選択し、次いで、確実に導入遺伝子が安定して発現するように、同濃度の抗生物質中で維持した。ASGPR1 / 2 過剰発現を、RT-qPCR (ASGPR1：非形質導入対 8560 倍、ASGPR2：非形質導入対 2389 倍) による mRNA レベル及びフローサイトメトリー分析によるタンパク質レベルの両方で確認した。

【0569】

感染前の少なくとも 2 週間、1.8% DMSO を使用して細胞を分化させた。HepG2.2.15 細胞培養上清から HBV 遺伝子型 D を取り出し、PEG 沈殿を用いて濃縮した。試験化合物の HBV に対する活性を評価するため、96 ウェルプレート中の分化した ASGPR - HepaRG 細胞の感染多重度 (MOI) を 20 ~ 30 として HBV を 20 時間にわたって感染させ、その後、細胞を PBS で 4 回洗浄して、HBV 接種物を除去した。

10

【0570】

オリゴヌクレオチドの有効性

以下のオリゴヌクレオチド

【0571】

【表 22-2】

裸型PD-L1 ASO	同等のGalNAc結合型PD-L1 ASO
CPM ID番号: 640_1	CPM ID番号: 768_2
CPM ID番号: 466_1	CPM ID番号: 769_2

20

【0572】

を、 $25 \mu\text{M}$ から 0.4nM (1 : 4 希釀 PBS 溶液) の連続希釀を使用して、感染後 7 日目及び 10 日目に HBV 感染 ASGPR - HepaRG 細胞に添加した。感染後 13 日目に、細胞を収穫した。

【0573】

MagNA Pure 96 Cellular RNA Large Volume Kit (MagNA Pure 96 System (Roche Diagnostics)) をメーカーの指示に従って使用して、総 mRNA を抽出した。実施例 5 に記載されているように、遺伝子発現分析用の RT-qPCR を行った。

30

【0574】

2^-ddct 法を使用して、データを分析した。アクチン B を内因性対照として使用して、ddct 値を計算した。PD-L1 発現量は、内因性対照及び生理食塩水ビヒクリに関連する。

【0575】

GraphPad Prism6 で EC50 の計算を行った。これを、表 23 に示す。

【0576】

【表 23】

表 23 : ASGPR-HepaRG HBV 感染細胞における EC50 (n=4)。

40

CPM ID番号	EC50 (μM)
640_1	2.25
768_2	0.10
466_1	5.82
769_2	0.13

【0577】

これらのデータから明らかに分かるように、PD-L1 アンチセンスオリゴヌクレオチドの GalNAc 結合型は、EC50 値を有意に改善する。

【0578】

50

実施例 10 - 慢性 H B V 患者由来の P B M C における刺激 T 細胞機能

末梢血単核細胞（P B M C）のエクスピボでのH B V 抗原刺激後に、裸型 P D - L 1 アンチセンス化合物が、慢性的に感染したH B V（C H B）患者のT 細胞機能を増強させうるかどうかを調べた。

【0579】

慢性H B V 感染患者3例から採取されたP B M C 凍結物を解凍し、100 μ l の培地（R P M I 1 6 4 0 + G l u t a M a x + 8 % ヒト血清 + 2 5 m M のH e p e s + 1 % P e n S t r e p ）中200,000細胞 / ウエルの密度で播種した。翌日、100 pg / m l のI L - 1 2 と5 ng / m l のI L - 7 とを含有する100 μ l の培地中に、5 μ M のC M P I D番号：4 6 6 _ 1 又はC M P I D番号：6 4 0 _ 1 を含めた又は含めない、1 μ M のP e p M i x H B V ラージエンベロープタンパク質又は1 μ M のP e p M i x H B V コアタンパク質で、細胞を刺激した（表9参照）。8日目にのみ、コンカナバリン刺激を適用した。4日後に、P D - L 1 アンチセンスオリゴヌクレオチド処置を、50 I U のI L - 2 を含有する培地で更新した。最初の刺激後8日目に、P e p M i x 又は5 μ g / m l のコンカナバリンA + P D - L 1 アンチセンスオリゴヌクレオチドで、細胞を24時間再刺激した。ここ5時間にわたって刺激が得られるように、0.1 μ l のブレフェルジンA（Brefeldin A）、0.1 μ l のモネンシン（Monensin）、及び3 μ l の抗ヒトC D - 1 0 7 (APC) を添加した。

【0580】

24時間後、細胞を染色緩衝液（P B S + 1 % B S A + 0.09 % アジ化ナトリウム + E D T A ）で洗浄し、表面染色 [抗ヒトC D 3 (BV605)、抗ヒトC D 4 (F I T C) 抗ヒトC D 8 (BV711)、抗ヒトP D L 1 (BV421)、抗ヒトP D 1 (PerCP-Cy5.5) 、ならびに、生存及び死滅染色 (BV510) (BD Biosciences)] を4 で30分間適用した。細胞を4 のB D 固定緩衝液中で15分間固定した。翌朝、4 で細胞をB D Perm/Wash Bufferで15分間透過処理し、4 で細胞内染色 [抗ヒトI N F (PE)] を30分間行った。Perm/Wash Bufferで洗浄後、細胞を250 μ l の染色緩衝液中に溶解した。

【0581】

BD Fortessa (BD Biosciences) で、FACS測定を行った。分析用、全細胞母集団を、最初に生細胞（生存及び死亡染色、BV510）で、次いでC D 3 + (BV605) 細胞でゲーティングした。続いて、C D 3 + 細胞をC D 1 0 7 a + (APC) 対I F N + (PE) としてグラフ化した。

【0582】

結果を表24に示す。

【0583】

【表 24】

表 24：慢性HBV感染患者3例から単離されたPBMC由来のCD3+T細胞に対するPD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)処置の効果。

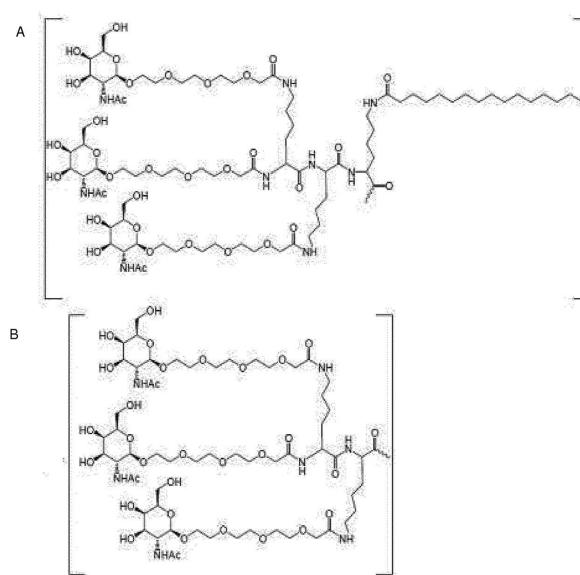
	抗原刺激なし			エンベロープ抗原			コア抗原		
	生理 食塩水	CMP 466_1	CMP 640_1	生理 食塩水	CMP 466_1	CMP 640_1	生理 食塩水	CMP 466_1	CMP 640_1
INF-/ CD107+	1.16	4.95	4.81	4.7	9.12	8.62	3.84	9.66	7.31
	2.7	3.59	2.74	2.57	3.69	3.2	3.25	3.34	2.92
	3	3.87	3.98	4.59	12.5	10.9	9.23	6.11	6.88
INF+/ CD107+	0.12	1.03	1.15	3.19	17.3	18.9	2.38	15.1	5.75
	0.49	3.12	1.75	2.73	7	5.34	1.63	2.35	1.9
	0.24	1.13	1.5	1.6	8.16	3.06	1.68	1.9	1.91
INF+/ CD107-	0.33	1.43	1.08	5.11	7.74	9.47	3.14	7.76	2.83
	0.61	2.9	2.26	7.84	5.79	5.78	2.33	2.82	2.95
	0.17	1.57	1.72	1.22	2.58	0.99	0.1	0.61	1.04

【0584】

これらのデータから分かるように、CHB患者のPBMCにおいて、抗原刺激はそれ自体で、T細胞活性化(INF及び/又はCD107aを発現するCD3+細胞%の増加)を誘導できる(n=3)。PD-L1アンチセンスオリゴヌクレオチドCMP-466_1又は640_1を添加すると、CD3+T細胞応答が更に増加した。この増加が主に観察されたのは、HBVエンベロープ刺激群であった。

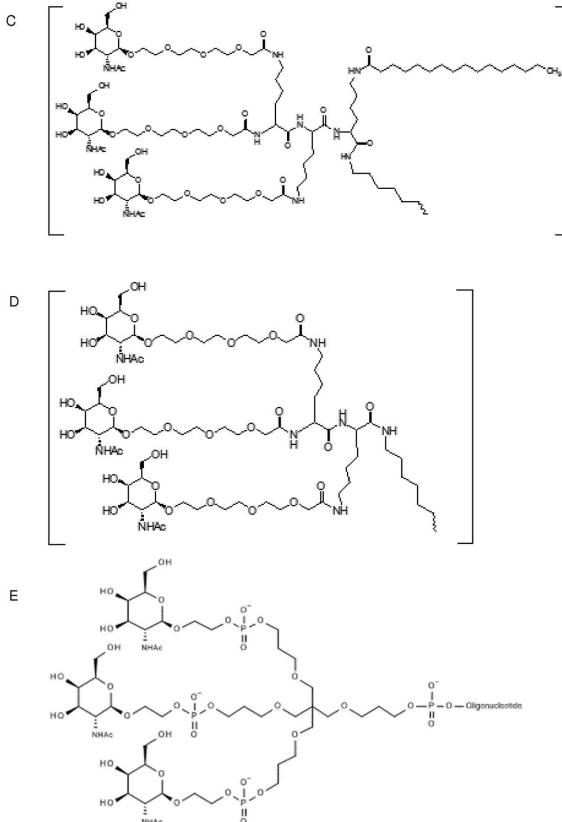
【図1A-B】

Figure 1



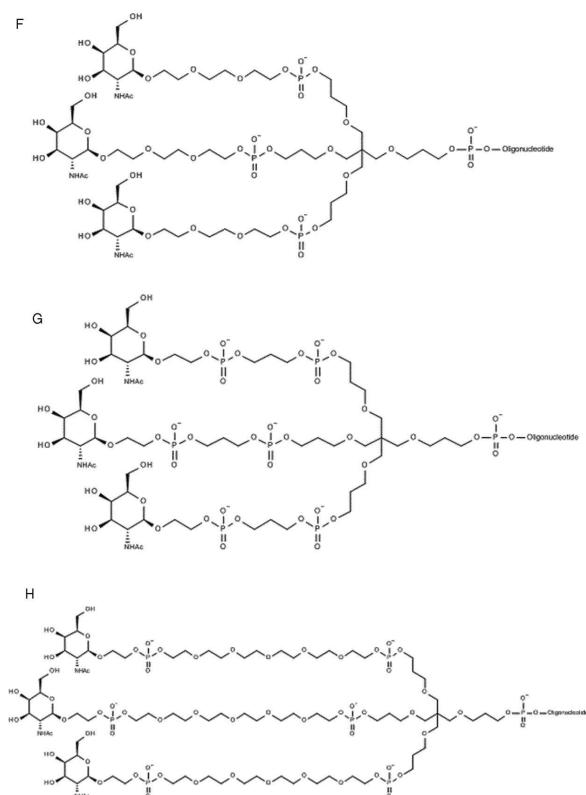
【図1C-E】

Figure 1 続き



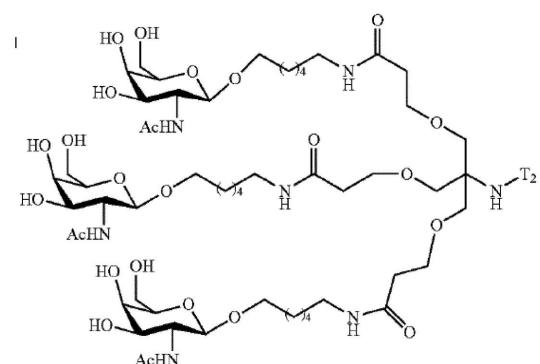
【図1F-H】

Figure 1 続き



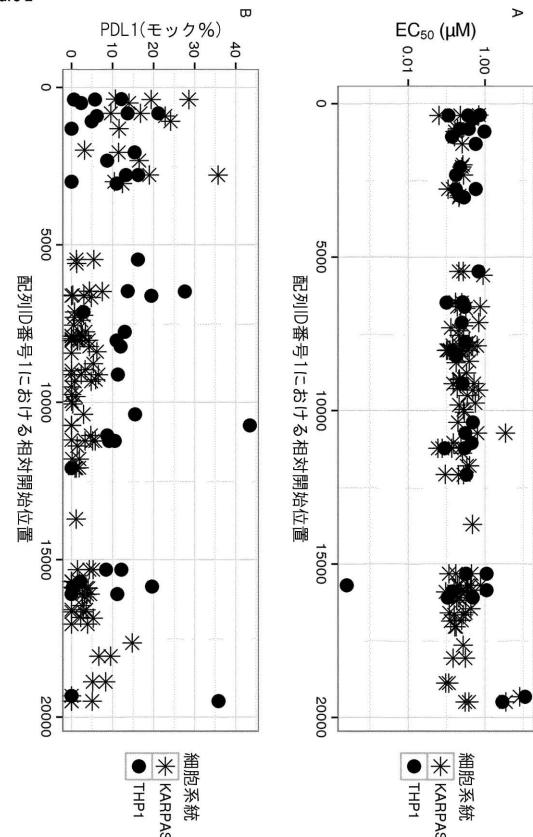
【図1I】

Figure 1 続き



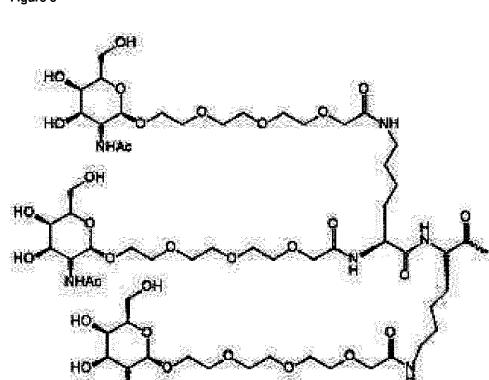
【図2】

Figure 2



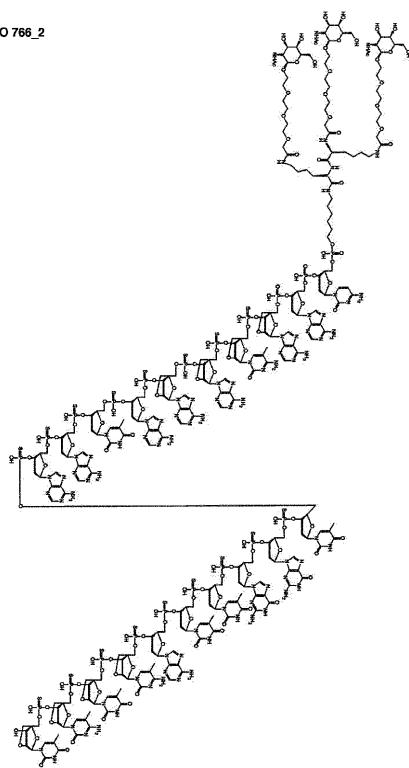
【図3】

Figure 3



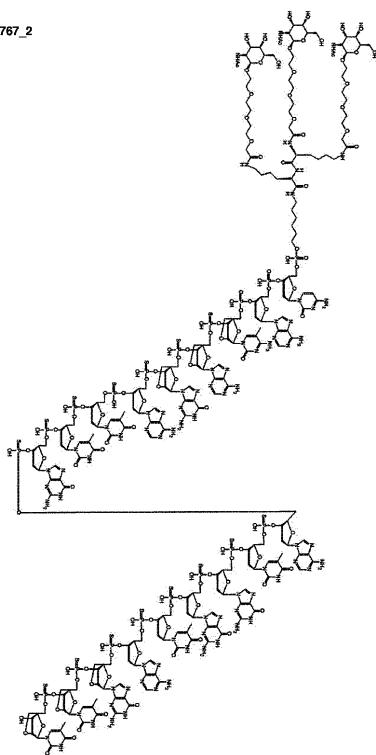
【図4】

Figure 4
CMP ID NO 766_2



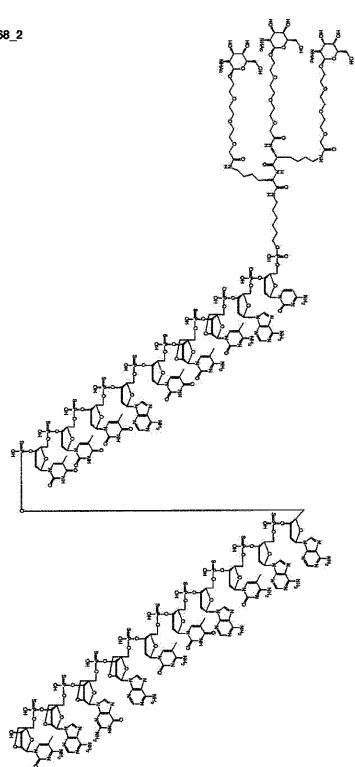
【図5】

Figure 5
CMP ID NO 767_2



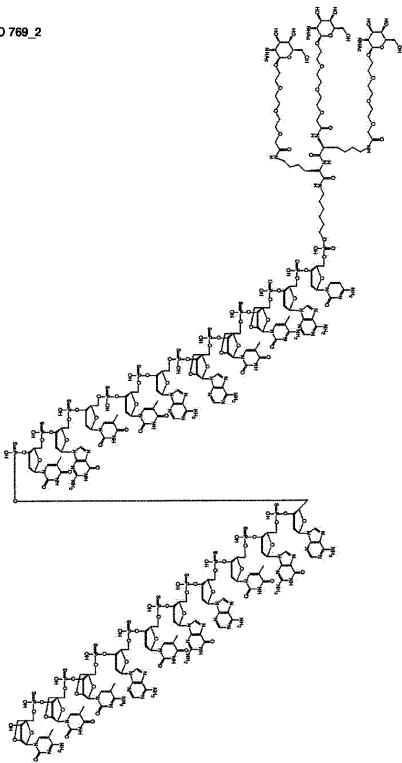
【図6】

Figure 6
CMP ID NO 768_2

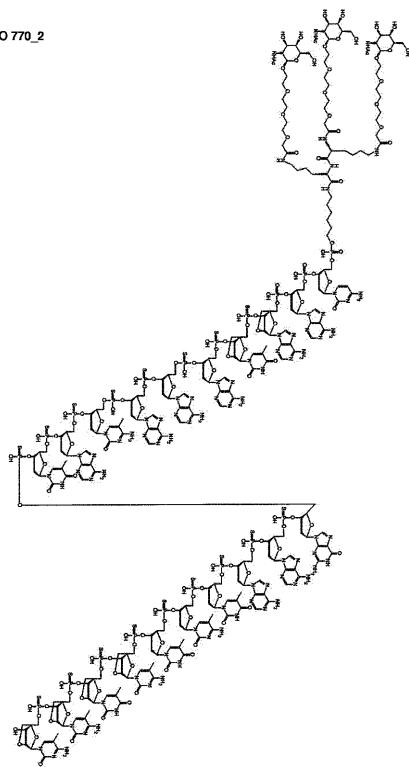


【図7】

Figure 7
CMP ID NO 769_2

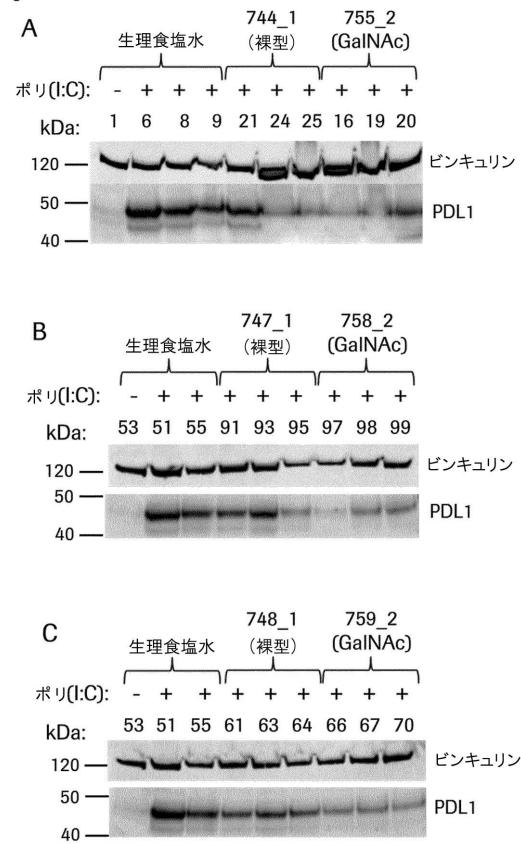


【図8】

Figure 8
CMP ID NO 770_2

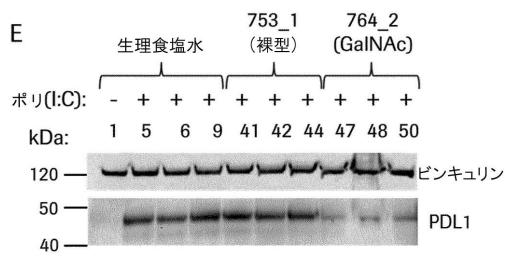
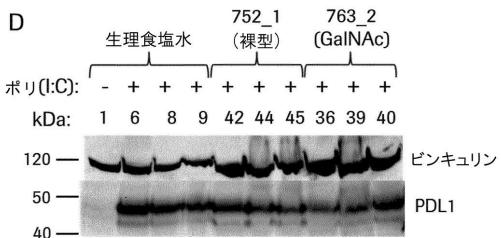
【図9 A - C】

Figure 9



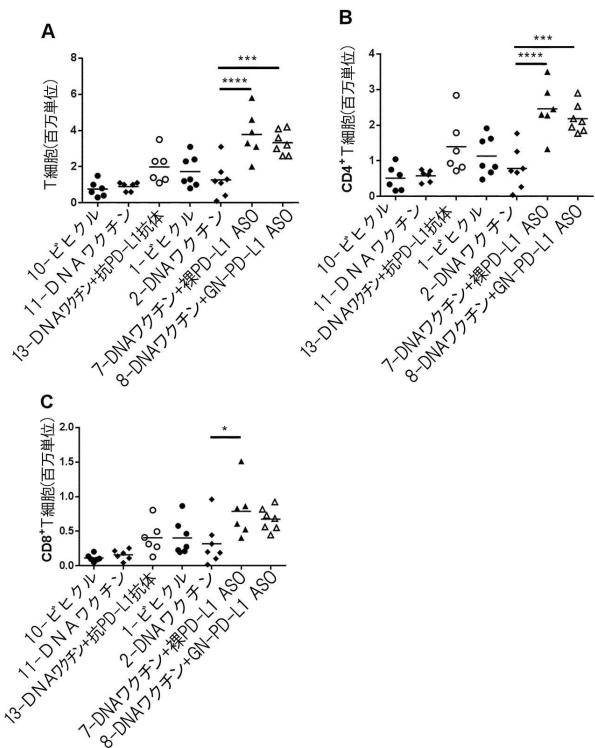
【図9 D - E】

Figure 9 続き

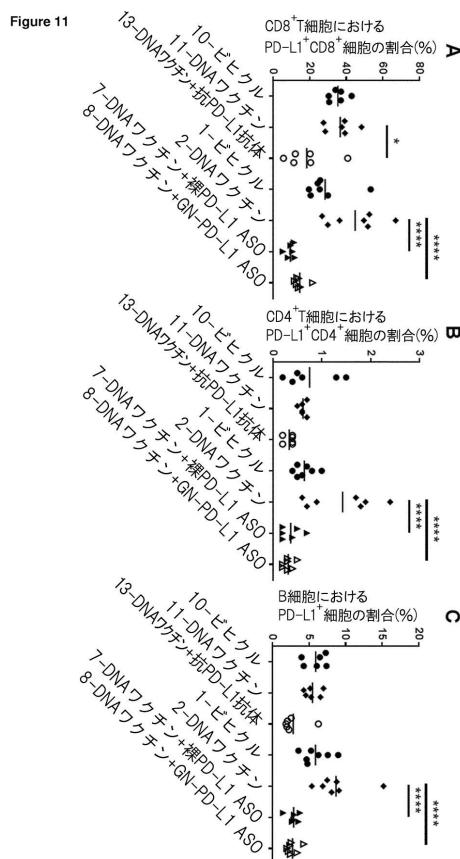


【図10】

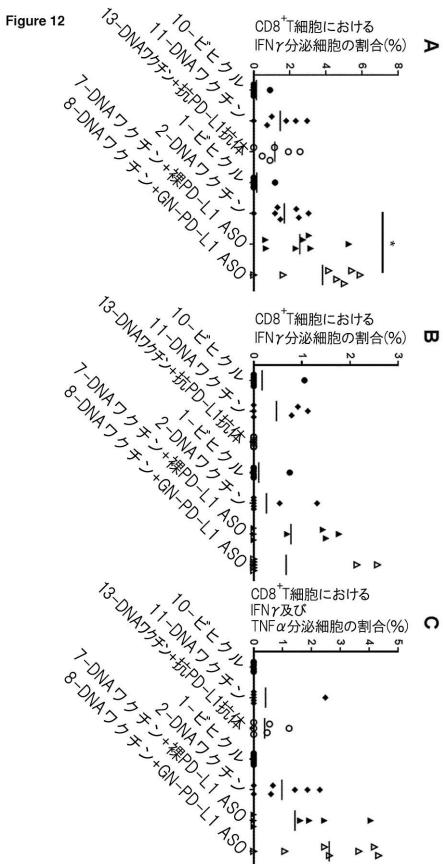
Figure 10



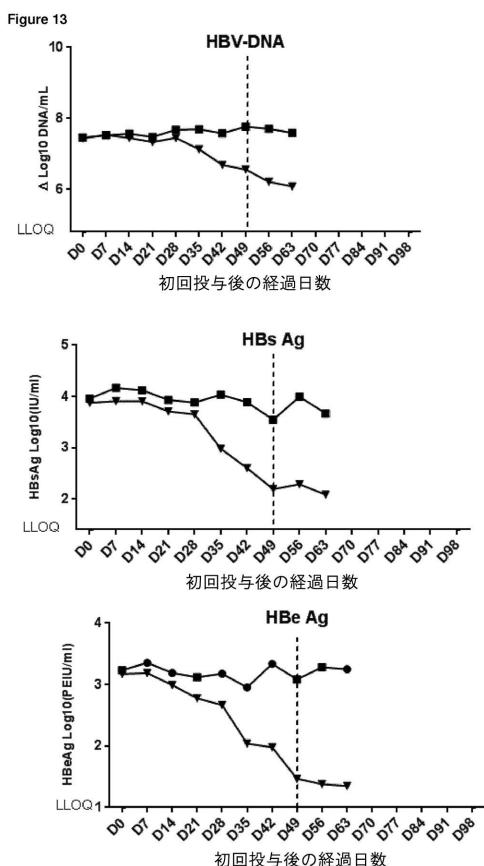
【図11】



【図12】



【図13】



【配列表】

0006748219000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 33/00 (2006.01) A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 37/04

(74)代理人 100150810
 弁理士 武居 良太郎
 (74)代理人 100166165
 弁理士 津田 英直
 (72)発明者 ルゲ ピーダスン
 デンマーク国, 2970 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セー/オー ロシュ イノベーション センター コペンハーゲン アクティーゼルスカブ
 (72)発明者 ハッサン ジャパンバクト
 スイス国 4070 バーゼル, グレンツァーヘルストラツセ 124, ツェー/オー エフ. ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
 (72)発明者 マリーネ ジャクエロット
 デンマーク国, 2970 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セー/オー ロシュ イノベーション センター コペンハーゲン アクティーゼルスカブ
 (72)発明者 セーアン オトスン
 デンマーク国, 2970 ハアスホルム, フレムティズバイ 3, セー/オー ロシュ イノベーション センター コペンハーゲン アクティーゼルスカブ
 (72)発明者 スーファローヌ ルワンセイ
 スイス国 4070 バーゼル, グレンツァーヘルストラツセ 124, ツェー/オー エフ. ホフマン - ラ ロシュ アーゲー

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2013-523162 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 12 N 15 / 00 - 15 / 90
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 W P I D S / W P I X (S T N)