

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6833705号
(P6833705)

(45) 発行日 令和3年2月24日 (2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月5日 (2021.2.5)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 31/7115 (2006.01)

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 31/7125 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 O Z

A 6 1 K 31/7115 Z N A

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 19 (全 115 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-546624 (P2017-546624)
 (86) (22) 出願日 平成28年4月4日 (2016.4.4)
 (65) 公表番号 特表2018-511307 (P2018-511307A)
 (43) 公表日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/025883
 (87) 国際公開番号 W02016/161429
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 審査請求日 平成31年4月4日 (2019.4.4)
 (31) 優先権主張番号 62/142, 986
 (32) 優先日 平成27年4月3日 (2015.4.3)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 595104323
 アイオーニス ファーマシューティカルズ
 , インコーポレーテッド
 Ionis Pharmaceutica
 ls, Inc.
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9201
 O, カールズバッド, ガゼル コート 2
 855
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74) 代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

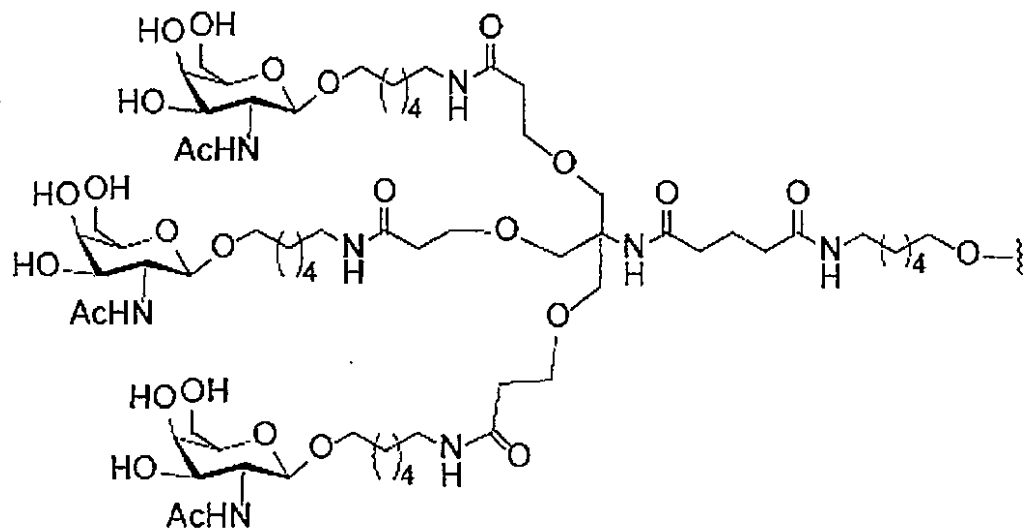
(54) 【発明の名称】 TMPRSS6発現を調節するための化合物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

共役基、及び以下の式：mCes Teo Teo Teo Ae o Tds Tds
 mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeo
 Ae o Ges mCes Te (配列番号36) に従う修飾オリゴヌクレオチドを含む
 化合物であって、式中、
 A = アデニン、
 mC = 5 - メチルシトシン、
 G = グアニン、
 T = チミン、
 e = 2' - O - メトキシエチル修飾ヌクレオシド、
 d = 2' - デオキシヌクレオシド、
 s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、
 o = ホスホジエステルヌクレオシド間結合であり、
 該共役基が、細胞標的部位、共役リンカー、及び開裂部位を含み、
 該細胞標的部位及び該共役リンカーが、以下の化学構造：

【化 1】



10

を有する、上記化合物。

【請求項 2】

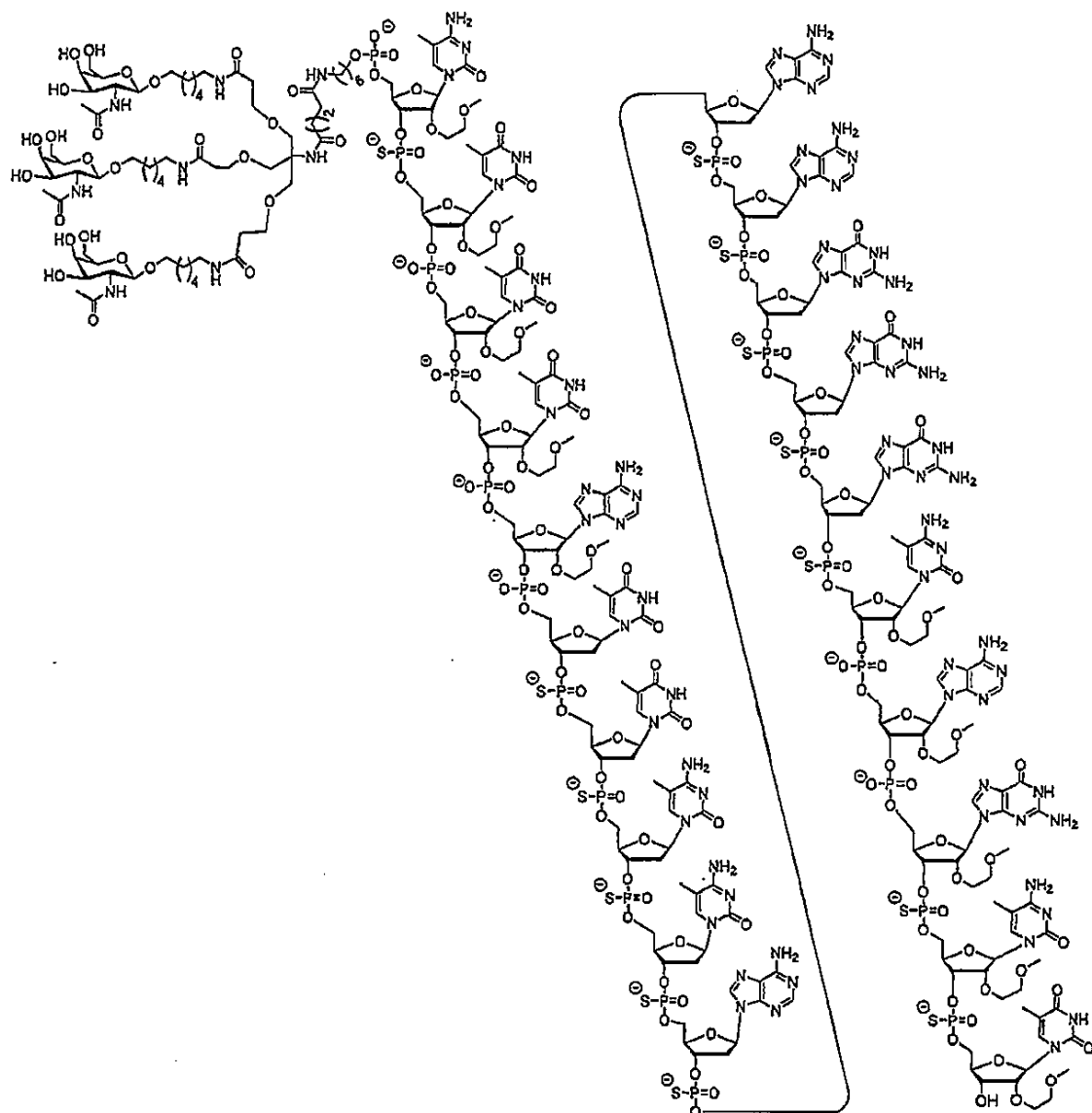
共役基が、修飾オリゴヌクレオチドの 5' 末端ヌクレオシドの 5' - ヒドロキシル基の 5' - 酸素原子に結合する、請求項 1 に記載の化合物。

20

【請求項 3】

アニオンの形態が以下の化学構造：

【化 2】



(配列番号 3 6)
を有する、化合物。

【請求項 4】

化合物が塩の形態であり、該塩がナトリウム塩又はカリウム塩である、請求項 3 に記載の化合物。

【請求項 5】

以下の化学構造：

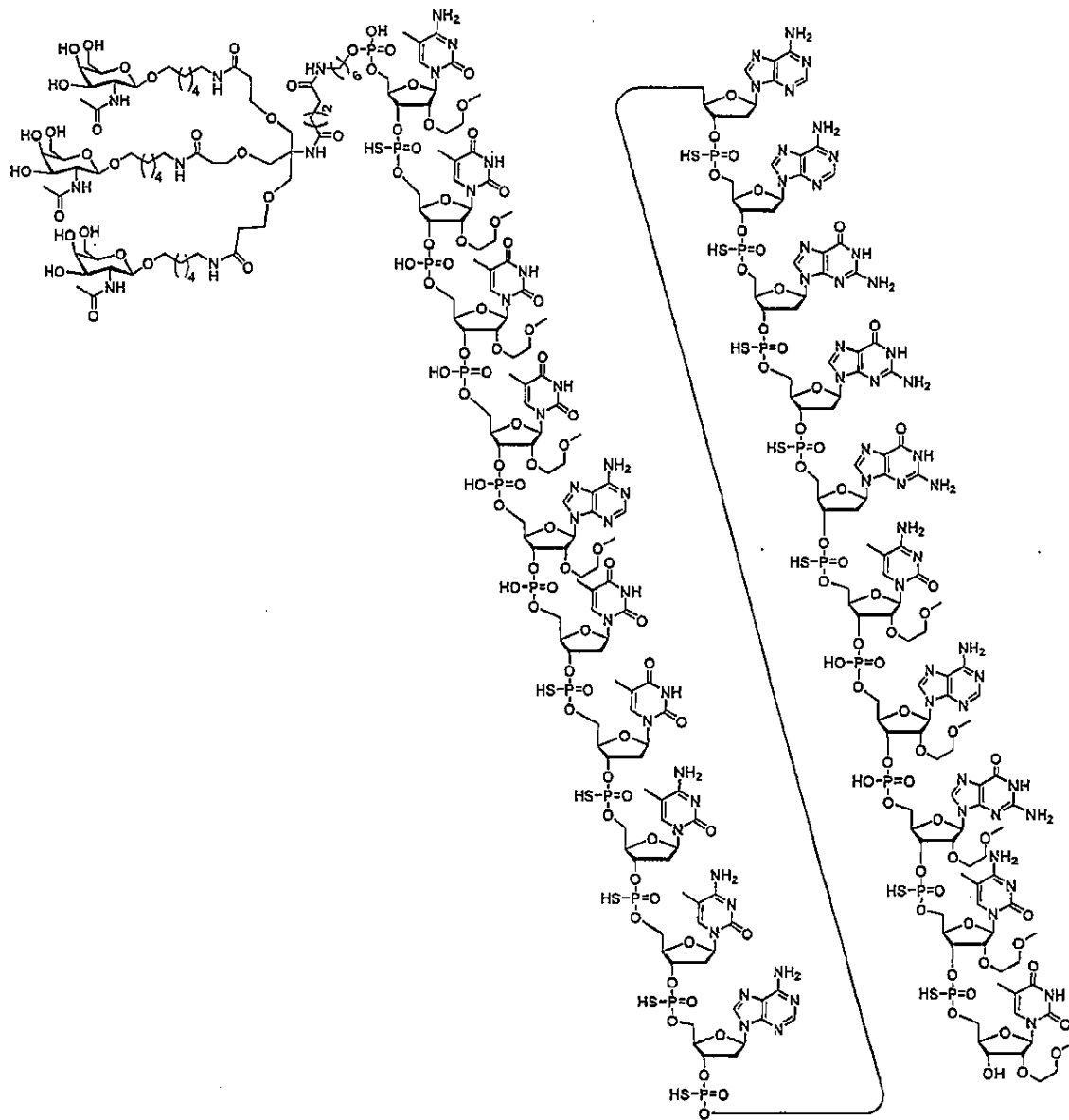
10

20

30

40

【化 3】



10

20

30

(配列番号 3 6)

を有する、又はその塩の形態である、化合物。

【請求項 6】

塩が、ナトリウム塩又はカリウム塩である、請求項 5 に記載の化合物。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項 8】

薬学的に許容可能な担体もしくは希釈剤をさらに含む、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

薬学的に許容可能な希釈剤がリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 1 0】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物及びリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) からなる、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

医薬品の調製に使用するための、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

40

50

【請求項 1 2】

細胞、組織、臓器または動物における T M P R S S 6 を減少させるための、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

動物における、鉄蓄積を減少し、ヘプシジン発現レベルを増加し、かつ / またはトランスフェリンの飽和度を減少するための、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

動物における過剰鉄蓄積に関連する疾患、障害または病態を治療し、または予防するための、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 5】

疾患、障害または病態が、赤血球増加症、ヘモクロマトーシス、及び貧血から選択される、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

遺伝性貧血、骨髓異形成症候群、及び重症慢性溶血から選択される疾患、障害または病態を治療し、または予防するための、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

遺伝性貧血が、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜傷害、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素欠損症、及び遺伝性出血性毛細血管拡張症から選択される、請求項 1 6 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 8】

サラセミアを治療し、または予防するための、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記サラセミアが、 - サラセミア、 - サラセミア（軽症型、中間型、及び重症型）及び - サラセミアから選択される、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表

本出願は、配列表とともに電子形式で出願されている。配列表は、2016年3月23日に作成された148KbのサイズのBIOL0271WOSEQ__ST25.txtという名前のファイルとして提供される。この配列表の電子形式の情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

技術分野

本発明は、動物における鉄蓄積を減少する目的で、T M P R S S 6 の発現を調節するための方法、化合物及び組成物を提供する。

40

【背景技術】

【0 0 0 3】

ヒトにおける鉄バランスの維持は、鉄吸収及び分泌についてのヒトの生理機能が限定的であるため、デリケートである（Finch, C. A. and Huebbers, H. N. Engl. J. Med. 1982. 306: 1520 - 1528）。鉄欠乏は、広範囲にわたる障害であり、食事による鉄摂取では、身体の要求に応えられない条件から生じる。病的失血は、負の鉄バランスに起因することが多い。鉄過剰も高頻度に認められる病態であり、遺伝的原因、例えば、鉄代謝の異なる遺伝子の突然変異から生じ得る（Camaschella, C. Blood. 2005. 106: 3710 - 3717）。肝臓ペ

50

チドホルモンであるヘプシジンは、鉄吸収及びリサイクルを制御するために、身体の鉄代謝に重要な役割を担っている (Ganz, T. Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2006. 507: 29 - 35; Kemna, E. H. et al., Clin. Chem. 2007. 53: 620 - 628)。HFE (ヘモクロマトーシスタンパク質) (Ahmad, K. A. et al., Blood Cells Mol Dis. 2002. 29: 361)、トランスフェリン受容体2 (Kawabata, H. et al., Blood 2005. 105: 376)、及びhemojuvelin (Papanikolaou, G. et al., Nat. Genet. 2004. 36: 77) を含むいくつかのタンパク質もまた、身体の鉄レベルを調節する。

【0004】

膜貫通プロテアーゼ、セリン6 (TMPRSS6) は、II型膜貫通セリンプロテアーゼであり、肝臓で主に発現する (Velasco, G. et al., J. Biol. Chem. 2002. 277: 37637 - 37646)。TMPRSS6における突然変異は、鉄欠乏貧血と関連し (Finberg, K. E. et al., Nat. Genet. 2008. 40: 569 - 571)、ヘプシジンのレベルが異常に増加することが分かった。小球性貧血を有するヒト集団の研究では、TMPRSS6遺伝子の機能喪失型突然変異は、ヘプシジンの過剰産生を導き、次に不完全な鉄吸収及び利用を導いてしまうことが分かった (Melis, M. A. et al., Hematologica 2008. 93: 1473 - 1479)。TMPRSS6は、鉄欠損によって誘因される膜貫通シグナル伝達経路に関与し、ヘプシジンをコードする遺伝子であるHamp活性の多様な経路を抑制する (Du, X. et al., Science 2008. 320: 1088 - 1092)。HFE^{-/-}マウスにおけるTMPRSS6のヘテロ接合性欠損は、全身の鉄過剰を減少させ、HFE^{-/-}マウスにおけるTMPRSS6のホモ接合性欠損は、全身の鉄欠乏及びヘプシジンの肝臓発現の増加を引き起す (Finberg, K. E. et al., Blood 2011. 117: 4590 - 4599)。

【0005】

鉄過剰障害の例は、ヘモクロマトーシスである。ヘモクロマトーシス (例えば、1型ヘモクロマトーシスまたは遺伝性ヘモクロマトーシス) は、消化器官からの食事性鉄の過剰な腸管吸収をもたらす障害である (Allen, K. J. et al., N. Engl. J. Med. 2008. 358: 221 - 230)。結果として、全身の鉄貯蔵が病的に増加する。過剰な鉄は、組織及び臓器、特に肝臓、副腎、心臓、皮膚、生殖腺、関節及び脾臓に蓄積し、それらの正常な機能を破壊する。硬変 (Ramm, G. A. and Ruddell, R. G. Semin. Liver Dis. 2010. 30: 271 - 287)、多発性関節障害 (Carroll, G. J. et al., Arthritis Rheum. 2011. 63: 286 - 294)、副腎不全、心不全、糖尿病 (Huang, J. et al., Diabetes 2011. 60: 80 - 87) 等の副次的な合併症が高頻度に認められる。鉄過剰障害の別の例は、サラセミアであり、患者は、サラセミアを治療するために無効赤血球生成または輸血によって生じる鉄過剰を発現する場合がある。

【0006】

これまで、鉄過剰障害を治療するための治療戦略は、限定的であった。siRNA及びアンチセンスオリゴヌクレオチド等の核酸阻害薬が、提示され、開発されてきたが、TMPRSS6 (PCT出願WO2014/076195、WO2012/135246、WO2014/190157、WO2005/0032733、WO2013/070786及びWO2013/173635、米国特許第8,090,542号、Schmidt et al., Blood. 2013, 121(7): 1200 - 8) を直接標的とする化合物のいずれも、鉄過剰障害を治療するために承認されてこなかった。したがって、TMPRSS6を阻害するための非常に強力に忍容性のある化合物についての必要性は満たされていない。本明細書に開示される本発明は、TMPRSS6発現の新規の非常に強力な阻害薬の発見及び治療におけるその使用に関する。

【 0 0 0 7 】

本願に引用される全ての文書、または文書の一部には、特許、特許出願、記事、書籍、及び論文が含まれるがこれらに限定されず、本明細書で考察する文書の一部を参照することにより、その全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本明細書では、動物における T M P R S S 6 mRNA 及び / またはタンパク質のレベルを調節するための組成物、化合物及び方法を提供する。本明細書では、T M P R S S 6 を減少させるための組成物、化合物及び方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、T M P R S S 6 をコードする核酸を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。特定の実施形態では、化合物は、配列番号 1 ~ 6 のいずれかの核酸配列に示されるように、T M P R S S 6 配列を標的とする。

【 0 0 1 0 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 1 の核酸塩基 3162 ~ 3184 の等しい長さの部分と相補的な少なくとも 8 個の連続した核酸塩基の部分を含む核酸塩基配列を含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 80 % 相補的である。

【 0 0 1 1 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号 23、36、37、63、77 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する化合物を提供する。

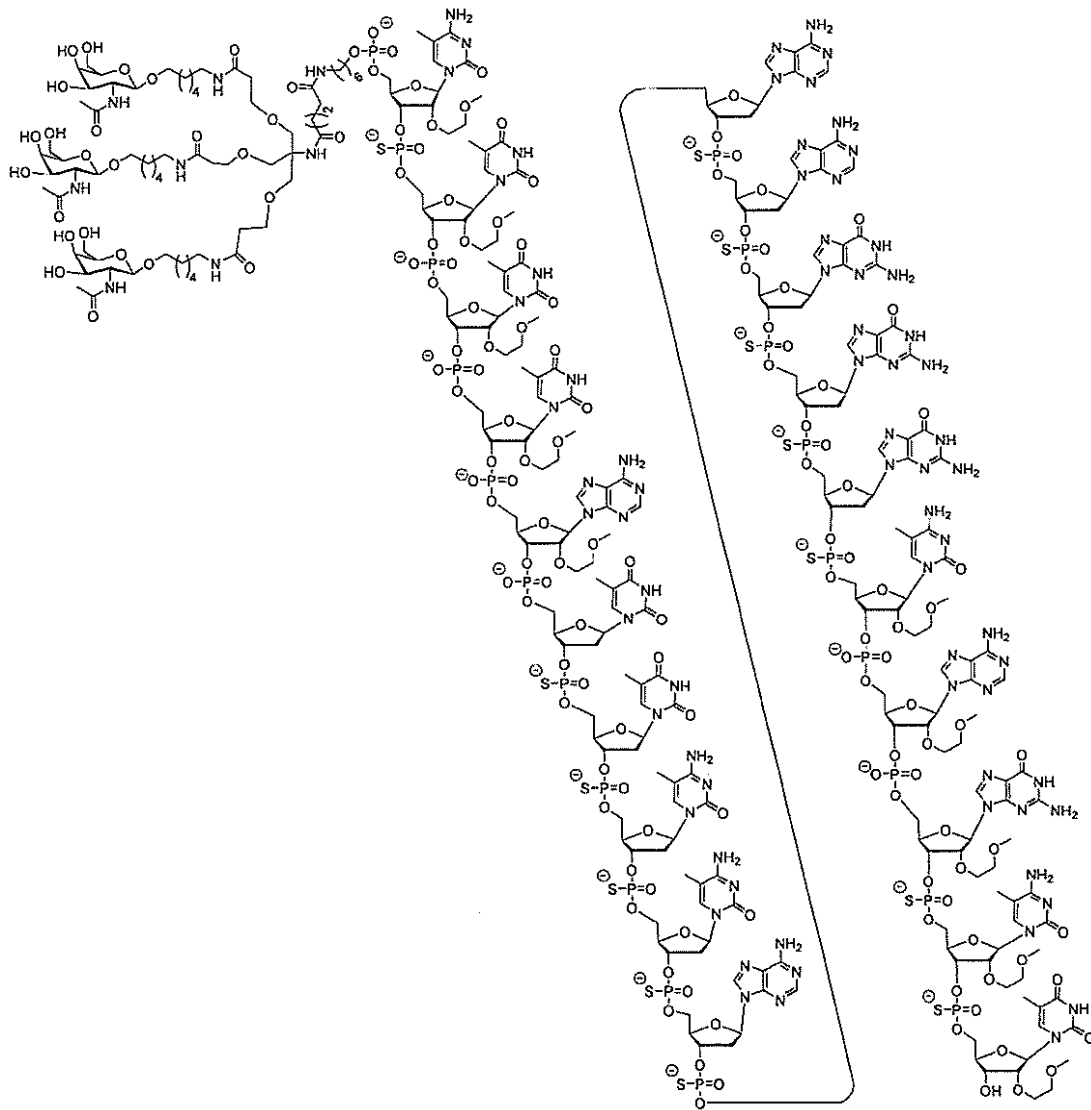
【 0 0 1 2 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、以下の式を有する、修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

10

20

【化 1】



10

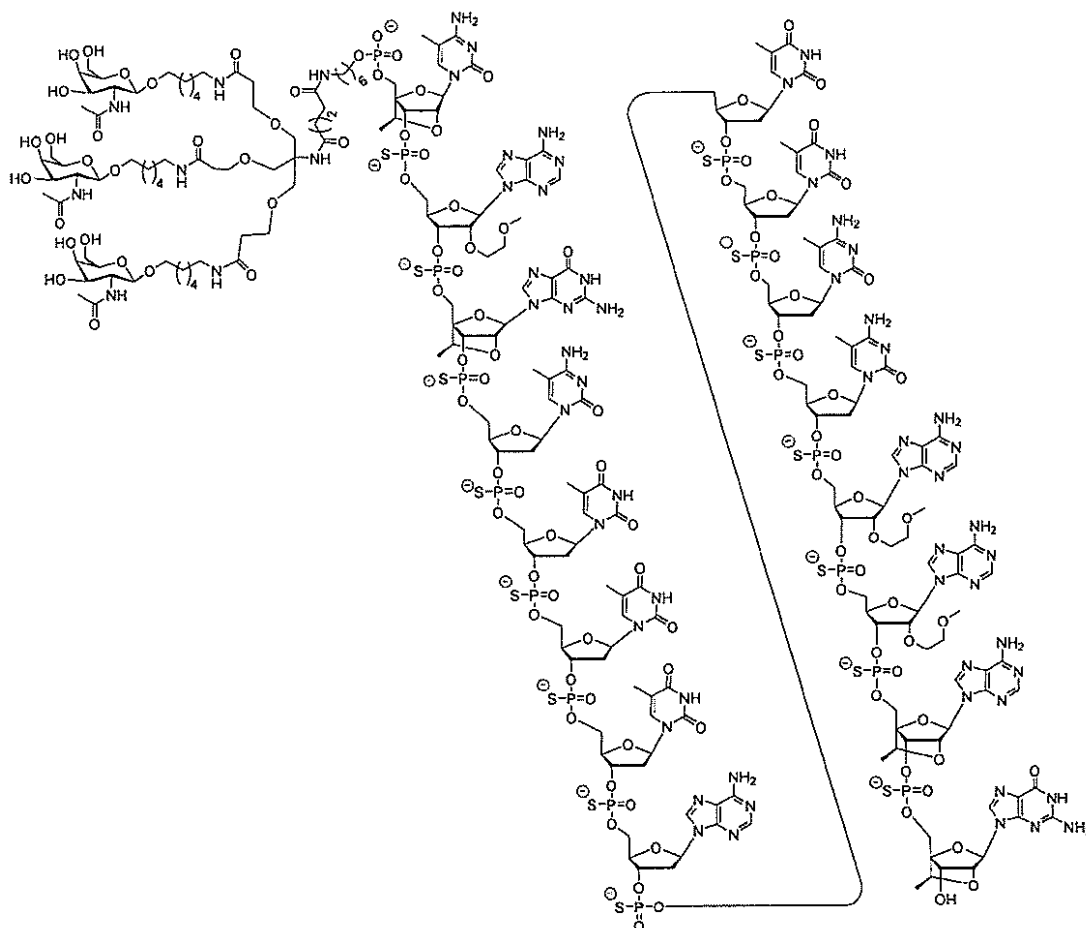
20

30

【 0 0 1 3 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、以下の式を有する、修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【化 2】



10

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

前述の一般的な説明及び以下の発明を実施するための形態はどちらも例示的かつ説明的なものであるにすぎず、特許請求される発明を限定するものではないと理解すべきである。本明細書において、単数形の使用は、別途明確に記述されない限り、複数形を含む。本明細書で使用されるとき、「or（または）」の使用は、別途記述されない限り、「and / or（及び／または）」を意味する。さらに、「including（～を含む）」という用語、ならびに「includes（～を含む）」及び「included（含まれる）」等の他の形態の使用は、限定的なものではない。また、「要素」または「成分」等の用語は、別途明確に記述されない限り、1つのユニットを含む要素及び成分、ならびに2つ以上のサブユニットを含む要素及び成分の両方を包含する。

30

【0015】

本明細書で使用される節の見出しは、単に構成目的のものであり、記載される主題を限定するものと解釈されるべきではない。本願に列挙される全ての文書、または文書の部分は、これらに限定されないが、特許、特許出願、記事、書籍、及び論文を含み、本明細書で考察する文書の部分を参照することにより、その全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【0016】

定義

特別な定義が与えられない限り、本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、ならびに医化学及び製薬化学に関連して用いられる命名法、ならびにそれらの手順及び技法は、周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。化学合成及び化学分析には、標準的技法を使用することができる。許可されている場合、本明細書出の開示全般で参照される全ての特許、出願、公開された出願及び他の刊行物、GENBANK 寄託番号及び国

50

立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）及び他のデータ等のデータベースにより得られる関連の配列情報は、本明細書で考察する文書の部分を参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。別途示されない限り、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0017】

「2'-O-メトキシエチル」（2'-MOE及び2'-O(CH₂)₂-OCH₃とも称される）とは、フロシル環の2'位のO-メトキシ-エチル修飾を指す。2'-O-メトキシエチル修飾糖は、修飾糖である。

【0018】

「2'-O-メトキシエチルヌクレオチド」とは、2'-O-メトキシエチル修飾糖部分を含むヌクレオチドを意味する。

10

【0019】

「5-メチルシトシン」とは、5'位に結合したメチル基で修飾されたシトシンを意味する。5-メチルシトシンは、修飾核酸塩基である。

【0020】

「約」とは、値の±10%以内を意味する。例えば、「マーカーが約50%増加し得る」と述べられている場合、マーカーが45%～55%増加し得るということの意味する。

【0021】

「活性医薬品」または「医薬品」とは、個体に投与されたときに治療的利益を提供する医薬組成物中の1つの物質または複数の物質を意味する。例えば、特定の実施形態において、TMPRSS6を標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、活性医薬品である。

20

【0022】

「活性標的領域」または「標的領域」とは、1つまたは複数の活性アンチセンス化合物が標的とされる領域を意味する。

【0023】

「活性アンチセンス化合物」とは、標的核酸レベルまたはタンパク質レベルを低下させるアンチセンス化合物を意味する。

【0024】

「同時に投与される」とは、2つの薬剤の薬理学的効果が、患者に現れる任意の様式でのこれらの2つの薬剤を共投与することを指す。同時投与は、これら両方の薬剤が、単一の医薬組成物で、同一の剤形で、または同一の投与経路によって投与されることを必要としない。これら両方の薬剤の効果が同時に現われなくてもよい。効果は、ある期間の重複しか必要とせず、共に広範囲に及ぶ必要はない。

30

【0025】

「投与」は、個体に医薬品を提供することを意味し、医療専門家及び自己投与による投与を含むが、これに限定されない。

【0026】

「薬剤」とは、動物に投与したときに治療的利益を提供することができる活性物質を意味する。「第1の薬剤」とは、本発明で提供する治療化合物を意味する。例えば、第1の薬剤は、TMPRSS6を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドである。「第2の薬剤」とは、本発明で記載する第2の治療化合物を意味する。例えば、第2の薬剤は、TMPRSS6を標的とする第2のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは非TMPRSS6標的であり得る。あるいは、第2の薬剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド以外の化合物であり得る。

40

【0027】

「寛解」または「寛解する」とは、関連疾患、障害、及び/または病態の少なくとも1つの指標、兆候、または症状の軽減を指す。特定の実施形態では、寛解は、病態、障害及び/または疾患の1つまたは複数の指標の進行の遅延または緩徐化を含む。指標の重症度は、当業者に知られている主観的尺度または客観的尺度によって決定することができる。

50

【 0 0 2 8 】

「貧血」は、血中の赤血球細胞（赤血球）の正常な数より少ないことを特徴とする疾患であり、通常、ヘモグロビンの量の減少によって測定される。貧血の原因には、慢性炎症、慢性腎疾患、腎臓透析治療、遺伝的（遺伝性）障害、慢性感染症、急性感染症、がん及びがん治療が含まれ得る。これらの疾患、障害及び／または病態における鉄ホメオスタシスの変化及び／または赤血球生成は、赤血球の産生の減少を引き起こすこともある。貧血の臨床徴候として、低い血清鉄（低鉄血症）、低いヘモグロビンレベル、低いヘマトクリットレベル、赤血球細胞の減少、網状赤血球の減少、可溶性トランスフェリン受容体及び鉄拘束赤血球生成が挙げられる。貧血の例として、サラセミア（すなわち、 α -サラセミア、 β -サラセミア（軽症型、中間型、及び重症型）及び δ -サラセミア）、鎌状赤血球貧血、再生不良性貧血、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜障害、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素欠損症、または遺伝性出血性毛細血管拡張症、溶結性貧血、慢性疾患等の貧血が挙げられる。

10

【 0 0 2 9 】

「動物」とは、ヒト、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、及び非ヒト霊長類（サル及びチンパンジーを含むが、これらに限定されない）を含むが、これらに限定されない非ヒト動物を指す。

【 0 0 3 0 】

「抗体」は、何らかの方法で抗原と特異的に反応することを特徴とする分子を指し、この場合、抗体及び抗原はそれぞれ互いの観点から定義される。抗体は、完全な抗体分子、または重鎖、軽鎖、F a b 領域及び F c 領域等のその任意の断片もしくは領域を指してもよい。

20

【 0 0 3 1 】

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

【 0 0 3 2 】

「アンチセンス化合物」とは、水素結合により標的核酸へのハイブリダイゼーションを経ることのできるオリゴマー化合物を意味する。

30

【 0 0 3 3 】

「アンチセンス阻害」とは、アンチセンス化合物の不在下における標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルと比較した、標的核酸に相補的なアンチセンス化合物の存在下における標的核酸レベルまたは標的タンパク質レベルの低下を意味する。

【 0 0 3 4 】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的核酸の対応する領域またはセグメントへのハイブリダイゼーションを可能にする核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

【 0 0 3 5 】

「二環糖」とは、2 個の非ジェミナル環原子の架橋により修飾されたフロシル環を意味する。二環糖は、修飾糖である。

40

【 0 0 3 6 】

「二環式核酸」または「BNA」とは、ヌクレオシドまたはヌクレオチドを指し、ヌクレオシドまたはヌクレオチドのフラノース部分は、フラノース環上で2 個の炭素原子をつなぎ、それにより二環式環系を形成する橋を含む。

【 0 0 3 7 】

「輸血」とは、静脈内の血行路で血液産物を受け取る過程を指す。輸血は、失われた血液成分を交換するために、様々な疾患、障害及び／または病態で使用される。

【 0 0 3 8 】

「キャップ構造」または「末端キャップ部分」とは、アンチセンス化合物のいずれかの

50

末端に組み込まれている化学的修飾を意味する。

【0039】

「cEt」または「拘束エチル」は、4'-炭素及び2'-炭素を接続する架橋を含む二環糖部分を意味し、架橋は式4'-CH(CH₃)-O-2'を有する。

【0040】

「拘束エチルヌクレオシド」(cEtヌクレオシドとも呼ばれる)は、4'-CH(CH₃)-O-2'架橋を含む二環糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0041】

「化学的に異なる領域」とは、同一のアンチセンス化合物の別の領域とは何らかの点で化学的に異なるアンチセンス化合物の領域を指す。例えば、2'-O-メトキシエチルヌクレオチドを有する領域は、2'-O-メトキシエチル修飾を有しないヌクレオチドを有する領域とは化学的に異なる。

10

【0042】

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

【0043】

「共投与」とは、個体への2つ以上の薬剤の投与を意味する。これらの2つ以上の薬剤は、単一の医薬組成物中に存在し得るか、または別個の医薬組成物中に存在し得る。これらの2つ以上の薬剤の各々は、同一または異なる投与経路で投与され得る。共投与は、同時投与、並行投与または連続投与を包含する。

20

【0044】

「相補性」とは、第1の核酸及び第2の核酸の核酸塩基間で対合する能力を意味する。特定の実施形態において、第1の核酸は、アンチセンス化合物であり、第2の核酸は、標的核酸である。

【0045】

「連続した核酸塩基」とは、互いに直接隣接した核酸塩基を意味する。

【0046】

「デオキシリボヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖部分の2'位に水素を有するヌクレオチドを意味する。デオキシリボヌクレオチドは、様々な置換基のうちのいずれかで修飾され得る。

30

【0047】

「希釈剤」とは、薬理学的活性を欠くが、薬学的に必要であるか、または望ましい組成物中の成分を意味する。例えば、注入された組成物中の希釈剤は、液体、例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)であり得る。

【0048】

「投薬単位」とは、医薬品が提供される形態、例えば、丸剤、錠剤、または当技術分野で既知の他の剤形を意味する。特定の実施形態において、剤形は、凍結乾燥されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。特定の実施形態において、剤形は、再構成されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。

【0049】

「用量」とは、単回投与で提供されるか、または特定の期間に提供される医薬品の特定の量を意味する。特定の実施形態において、用量は、1、2、またはそれ以上のボラス、錠剤、または注入で投与され得る。例えば、特定の実施形態において、皮下投与が所望される場合、所望の用量は、単回注入では容易に提供されない体積を必要とし、それ故に、2回以上注入して所望の用量を達成することができる。特定の実施形態において、医薬品は、輸液によって長期間にわたって、または連続して投与される。用量は、1時間、1日、1週間、または1ヵ月当たりの医薬品の量として記載してもよい。

40

【0050】

「有効量」または「治療有効量」とは、薬剤を必要とする個体において所望の生理学的結果をもたらすのに十分な活性医薬品の量を意味する。有効量は、治療される個体の健康

50

及び身体状態、治療される個体の分類群、組成物の製剤、個体の病状の評価、ならびに他の関連因子によって個体間で異なり得る。

【 0 0 5 1 】

「完全に相補的な」または「100%相補的な」とは、第1の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基が、第2の核酸の第2の核酸塩基配列中に相補的な核酸塩基を有することを意味する。特定の実施形態において、第1の核酸は、アンチセンス化合物であり、第2の核酸は、標的核酸である。

【 0 0 5 2 】

「ギャップマー」とは、RNAse H切断を支援する複数のヌクレオシドを有する内部領域が1個または複数個のヌクレオシドを有する外部領域間に位置付けられるキメラアンチセンス化合物を意味し、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシドまたは複数のヌクレオシドとは化学的に異なる。内部領域は、「ギャップセグメント」と称され得、外部領域は、「ウイングセグメント」と称され得る。

【 0 0 5 3 】

「ギャップ拡大」は、1～6個のヌクレオシドを有する5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントとの間及びそれらのすぐ隣に位置する12個以上の連続した2'-デオキシヌクレオシドのギャップセグメントを有するキメラアンチセンス化合物を意味する。

【 0 0 5 4 】

「ヘモクロマトーシス」は、消化器官から過剰な鉄を吸収する鉄代謝の障害であり、身体のような組織に、鉄を過剰に蓄積かつ沈着させてしまう。原発性または遺伝性または典型的なヘモクロマトーシスは、例えばHFE遺伝子における遺伝的突然変異によって引き起こされる。当該疾患の患者は、過剰な量の鉄を有し、これが、消化器官で吸収され、身体組織、特に肝臓で蓄積する。二次的または後天性ヘモクロマトーシスは、頻繁な輸血、鉄サプリメントの大量の経口もしくは非経口摂取、またはその他の疾患の二次影響によって生じる場合がある。

【 0 0 5 5 】

「造血発生」は、造血性幹細胞に由来する血液の細胞成分の形成を指す。これらの幹細胞は、骨髄の髄質に存在し、全ての異なる成熟した血液細胞型を生じさせる固有の能力を有する。

【 0 0 5 6 】

「溶血」は、赤血球または赤血球細胞が破壊され、その内容物が周囲の体液に放出されることを指す。動物における溶血は、微生物感染、寄生虫感染、自己免疫障害及び遺伝的障害を含む多数の医学的状態によって生じることがある。

【 0 0 5 7 】

「ヘプシジン」は、mRNA、及び炎症または血中の鉄レベルの上昇に反応して肝細胞によって産生されるmRNAによってコードされるタンパク質の両方を指す。ヘプシジンの主要な役割は、これらの血中鉄レベルの減少を促進することによって、血中鉄レベルを制御することである。ヘプシジンの発現は、赤血球生成について鉄利用性を減少させる急性及び慢性炎症の状態で増加する。「ヘプシジン」は、また、ヘプシジン抗菌ペプチド、HAMP、HAMP1、HEPC、HFE2、LEAP-1、LEAP1及び肝発現抗菌ペプチドとも称される。

【 0 0 5 8 】

「遺伝性貧血」は、身体中の赤血球細胞を通常より速く死滅させてしまい、肺から身体へ酸素を送ることにおいて無効なものにするか、または赤血球細胞を全く作り出さない遺伝性病態によって生じる貧血を指す。例として、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜障害、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症、または遺伝性出血性毛細血管拡張症が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 9 】

「HFE」は、ヒトヘモクロマトーシス遺伝子またはタンパク質を指す。

【0060】

「HFE 遺伝子突然変異」は、遺伝性ヘモクロマトーシスを生じ得る、HFE 遺伝子における突然変異を指す。

【0061】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸分子のアニールングを意味する。特定の実施形態において、相補的核酸分子には、アンチセンス化合物及び標的核酸が含まれる。

【0062】

「鉄の過剰蓄積に関連する疾患、障害及び／もしくは病態のリスクがあるかまたはそれを有する動物を識別すること」は、鉄の過剰蓄積に関連する疾患、障害及び／もしくは病態と診断されている動物を識別すること、またはその疾患、障害及び／もしくは病態を発現しやすい動物を識別することを意味する。例えば、動物は、ヘモクロマトーシスの家族歴がある場合、鉄の過剰蓄積に関連する疾患、障害及び／または病態を発症しやすい場合がある。このような識別は、動物の病歴の評価及び標準的試験または評価を含む任意の方法によって達成することができる。

10

【0063】

「すぐ隣に」は、すぐ隣の要素間で、介入する要素がないことを意味する。

【0064】

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

20

【0065】

「発現または活性を阻害する」とは、RNA またはタンパク質の発現または活性の減少または阻害を指し、必ずしも発現または活性の完全な排除を示すわけではない。

【0066】

「ヌクレオシド間結合」とは、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0067】

「静脈内投与」とは、静脈への投与を意味する。

【0068】

「鉄蓄積」または「鉄過剰」は、何らかの原因による、身体における鉄の蓄積及び沈着を示す。最も一般的な要因は、遺伝的要因、輸血の反復により生じ得る輸血による鉄過剰、または食事性鉄過剰摂取である。

30

【0069】

「鉄サプリメント」は、患者における鉄欠乏を治療するために、医療的理由から処方されるサプリメントを指す。鉄は、経口経路で、または非経口で供給することができる。

【0070】

「連結したヌクレオシド」とは、一緒に結合する隣接したヌクレオシドを意味する。

【0071】

「マーカー」または「バイオマーカー」は、健康または生理関連評価のために、指標として機能する測定可能かつ定量可能な生物学的パラメータである。例えば、トランスフェリンの飽和度の増加、鉄レベルの増加、またはヘプシジンレベルの減少が、鉄過剰疾患、障害及び／または病態の考えられるマーカーである。

40

【0072】

「MCH」は、「平均赤血球血色素量」または「平均赤血球ヘモグロビン」、血液サンプル中の赤血球あたりのヘモグロビン(Hb)の平均質量を表す値を意味する。

【0073】

「MCV」は、「平均赤血球容積」または「平均赤血球容積」、赤血球細胞の平均サイズを表す値を指す。

【0074】

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

50

。

【 0 0 7 5 】

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

【 0 0 7 6 】

「修飾核酸塩基」とは、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、またはウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。例えば、修飾核酸塩基は、5 - メチルシトシンであり得る。

「非修飾核酸塩基」とは、プリンが、アデニン（A）及びグアニン（G）をベースとし、ピリミジンが、チミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）をベースとすることを意味する。

10

【 0 0 7 7 】

「修飾ヌクレオシド」は、独立して、修飾糖部分及び／または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

【 0 0 7 8 】

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

【 0 0 7 9 】

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

【 0 0 8 0 】

「修飾糖」とは、天然糖の置換または変化を指す。例えば、修飾糖は、2' - MOEであり得る。

20

【 0 0 8 1 】

「調節する」は、細胞、組織、臓器または有機体の特徴を変化または調節することを指す。例えば、TMPRSS6 レベルを調節することは、細胞、組織、臓器または有機体におけるTMPRSS6 mRNAまたはTMPRSS6 タンパク質のレベルを増加または減少させることを意味することができる。「調節剤」は、細胞、組織、臓器または有機体における変化に影響する。例えば、TMPRSS6 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞、組織、臓器または有機体におけるTMPRSS6 mRNAまたはTMPRSS6 タンパク質の量を増加または減少させる調節剤であり得る。

30

【 0 0 8 2 】

「モノマー」は、オリゴマーの単一の単位である。モノマーは、天然であっても改変されたものであっても、ヌクレオシド及びヌクレオチドを含むが、これに限定されない。

【 0 0 8 3 】

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

【 0 0 8 4 】

「突然変異」は、核酸配列の変化を指す。突然変異は、放射線照射、ウイルス、トランスポゾン及び変異原性化学物質、ならびに減数分裂、DNA複製、RNA転写及び転写後プロセッシングの最中に生じるエラーを含むがこれらに限定されない様々な方法で発生させることができる。突然変異によって、配列にいくつかの異なる変化が生じ、これらは、何ら影響を及ぼすことなく、遺伝子の産物を変化させるか、または遺伝子を適切にもしくは完全に機能することを阻止することができる。例えば、HFE突然変異は、遺伝子産物の不適切な機能化を起こし、腸内の過剰な鉄吸収を引き起こす。

40

【 0 0 8 5 】

「骨髄異形成症候群」は、血液細胞の骨髄の種類の無効な産生を伴う血液学的疾患、障害及び／または病態の多様な集合を指す。症候群は、骨髄における幹細胞の障害によって生じる。骨髄異形成症候群において、造血発生は無効であり、血液細胞の数及び質が不可逆的に減少し、さらに血液産生を損なう。結果として、骨髄異形成症候群の患者は、重度の貧血を発症し、頻繁に輸血を必要とする。

50

【0086】

「天然に存在するヌクレオシド間連結部」とは、3'～5'ホスホジエステル連結部を意味する。

【0087】

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

【0088】

「核酸」とは、モノマーヌクレオチドから成る分子を指す。核酸には、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、一本鎖核酸、二本鎖核酸、低分子干渉リボ核酸(siRNA)、及びマイクロRNA(s miRNA)が含まれる。

10

【0089】

「核酸塩基」とは、別の核酸塩基と対合することができる複素環部分を意味する。

【0090】

「核酸塩基配列」とは、任意の糖、結合、または核酸塩基修飾から独立した連続した核酸塩基の順序を意味する。

【0091】

「ヌクレオシド」とは、糖に連結された核酸塩基を意味する。

【0092】

「ヌクレオシド模倣物」は、糖または糖と塩基を置換するために用いられる構造を含み、例えば、モルホリノ、シクロヘキセニル、シクロヘキシル、テトラヒドロピラニル、ピシクロ、またはトリシクロ糖模倣物、例えば、非フラノース糖単位を有するヌクレオシド模倣物等のオリゴマー化合物の1つまたは複数の位置での結合を必ずしも含むわけではない。

20

【0093】

「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基を有するヌクレオシドを意味する。

【0094】

「ヌクレオチド模倣物」は、ヌクレオシドを置換するために用いられる構造と、例えば、ペプチド核酸またはモルホリノ(-N(H)-C(=O)-O-または他の非ホスホジエステル結合によって連結されたモルホリノ)等のオリゴマー化合物の1つまたは複数の位置での結合とを含む。

30

【0095】

「オリゴマー化合物」または「オリゴマー」は、2つ以上の下部構造(モノマー)を含み、核酸分子の領域にハイブリダイズすることができるポリマー構造を指す。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオシドである。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は、アンチセンス化合物である。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態において、オリゴマー化合物は、キメラオリゴヌクレオチドである。

【0096】

「オリゴヌクレオチド」とは、各々が互いに独立して、修飾され得るかまたは修飾され得ない連結したヌクレオシドのポリマーを意味する。

40

【0097】

「非経口投与」とは、注入または輸液を介する投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または頭蓋内投与、例えば、髄腔内もしくは脳室内投与が含まれる。投与は、連続投与、または長期投与、短期投与、または間欠投与であり得る。

【0098】

「ペプチド」とは、アミド結合によって少なくとも2つのアミノ酸を連結することによって形成される分子を指す。ペプチドは、ポリペプチド及びタンパク質を指す。

50

【 0 0 9 9 】

「トランスフェリンの飽和度」は、合計の鉄結合能に対する血清鉄の比を 1 0 0 で乗算したものを指す。この値により、臨床医は、鉄を結合するために利用可能なトランスフェリン分子のうち、どれくらいの血清鉄が実際に結合するのかが分かる。

【 0 1 0 0 】

「医薬組成物」とは、個体への投与に好適な物質の混合物を意味する。例えば、医薬組成物は、1 つまたは複数の活性剤及び医薬担体、例えば滅菌水溶液を含み得る。

【 0 1 0 1 】

「薬学的に許容される担体」とは、オリゴヌクレオチドの構造を妨害しない媒体または希釈剤を意味する。ある特定のそのような担体は、医薬組成物を、例えば、対象による経口摂取のための丸剤、錠剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、及びトローチ剤として製剤化することを可能にする。例えば、薬学的に許容される担体は、P B S 等の滅菌水溶液であり得る。

10

【 0 1 0 2 】

「薬学的に許容される誘導体」は、薬学的に許容される塩、共役体、プロドラッグまたは本明細書に記載の化合物の異性体を含む。

【 0 1 0 3 】

「薬学的に許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的にかつ薬学的に許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの所望の生物学的活性を保持し、かつそれに望ましくない毒物学的影響を与えない塩を意味する。

20

【 0 1 0 4 】

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

【 0 1 0 5 】

「赤血球増加症」は、赤血球細胞数の増加（絶対的赤血球増加症）または血漿量の減少（相対的赤血球増加症）のいずれかに起因する特定の量の赤血球細胞（R B C）が増加する病態を指す。血液量対赤血球細胞の比率は、ヘマトクリット（H c t）レベルとして測定することができる。R B C の比率の増加により、血液が粘稠性となり、循環系を通る血流が遅くなり、血餅を形成される場合がある。血流がより遅くなると、細胞、組織及び / または臓器に輸送される酸素が減少する場合があり、アンギナまたは心不全等の疾患、障害または病態を引き起こされる場合がある。循環器において血餅が形成されると、細胞、組織及び / または臓器が損傷する場合があり、心筋梗塞または脳卒中等の疾患、障害または病態を引き起こされる場合がある。赤血球増加症の治療として、R B C 産生を減少させる静脈切開術または薬剤が挙げられる（例えば、I N F - 、ヒドロキシ尿素、アナグレリド）。赤血球増加症の例として、真性多血症（P C V）、真性一次性赤血球増加症（P R V）及び赤血病が挙げられるが、これらに限定されない。特定の例において、赤血球増加症は対象における赤血球白血病に進行する場合がある。

30

【 0 1 0 6 】

「部分」とは、定義された数の核酸の連続した（すなわち、連結した）核酸塩基を意味する。特定の実施形態において、部分は、定義された数の標的核酸の連続した核酸塩基である。特定の実施形態において、部分は、定義された数のアンチセンス化合物の連続した核酸塩基である。

40

【 0 1 0 7 】

「予防する」とは、数分から無期限の期間、疾患、障害、もしくは病態の発生、発現もしくは進行を遅延させるか、または未然に防ぐことを指す。予防は、疾患、障害、または状態の発症のリスクを低下させることも意味する。

【 0 1 0 8 】

「プロドラッグ」は、内因性酵素または他の化学物質または条件の作用によって、体内または細胞内で活性形態に変換される不活性な形態で調製される治療薬を意味する。

50

【0109】

「副作用」とは、所望の作用以外の治療に起因する生理学的応答を意味する。特定の実施形態において、副作用には、注入部位反応、肝機能検査異常、腎機能異常、肝臓毒性、腎臓毒性、中枢神経系異常、ミオパシー、及び倦怠感が含まれる。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベルの増加は、肝臓毒性または肝機能異常を示し得る。

【0110】

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

【0111】

「特異的にハイブリダイズ可能な」とは、アンチセンス化合物が標的核酸に対して所望の効果を引き起こすのに十分な程度の相補性を有する一方で、特異的結合が所望される条件下、すなわち、*in vivo* アッセイ及び治療処置の場合の生理学的条件下で非標的核酸にほとんどまたはまったく影響を及ぼさないことを指す。

10

【0112】

「皮下投与」とは、皮膚の直下への投与を意味する。

【0113】

「Targeting（標的とする）」または「Targeted（標的にする）」とは、標的核酸に特異的にハイブリダイズし、かつ所望の効果を引き起こすアンチセンス化合物の設計及び選択のプロセスを意味する。

【0114】

「標的核酸」、「標的RNA」、及び「標的RNA転写物」は全て、アンチセンス化合物によって標的にすることができる核酸を指す。

20

【0115】

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

【0116】

「サラセミア」は、異常なヘモグロビン分子の形成によって生じる貧血の下位グループ（例えば、 α -サラセミア、 β -サラセミア、 δ -サラセミア、非輸血依存性サラセミア（NTDT））を意味し、赤血球細胞を破壊または分解してしまう。サラセミアの合併症として、過剰鉄（サラセミア自体またはサラセミアを治療するための頻繁な輸血のいずれかによる血中の鉄過剰）、感染、骨の変形、脾臓の腫大（すなわち、脾腫）、成長の遅延、及び心臓の問題（例えば、うっ血性心不全及び不整脈）のリスクの増加が挙げられる。

30

【0117】

「治療有効量」は、動物に治療利益をもたらす薬剤の量を意味する。

【0118】

「TMPRSS6」（「マトリプターゼ-2」としても知られる）は、TMPRSS6の任意の核酸またはタンパク質を指す。

【0119】

「TMPRSS6核酸」は、TMPRSS6をコードする核酸を意味する。例えば、特定の実施形態において、TMPRSS6は、TMPRSS6をコードするDNA配列、TMPRSS6をコードするDNA（イントロン及びエキソンを含むゲノムDNAを含む）から転写されるRNA配列、及びTMPRSS6をコードするmRNA配列を含む。「TMPRSS6 mRNA」とは、TMPRSS6タンパク質をコードするmRNAを意味する。

40

【0120】

「TMPRSS6特異的阻害剤」は、TMPRSS6遺伝子、TMPRSS6 RNAの発現及び/またはTMPRSS6の発現を分子レベルで特異的に阻害することができる任意の薬剤を指す。例えば、TMPRSS6特異的阻害剤には、核酸（アンチセンス化合物を含む）、ペプチド、抗体、小分子、及びTMPRSS6のレベルを阻害することがで

50

きる他の薬剤が含まれる。特定の実施形態では、TMPRSS6を特異的に調節することによって、TMPRSS6特異的阻害剤は、鉄蓄積経路の成分に影響を与えることができる。

【0121】

「治療する」とは、動物における疾患、障害または病態の変化または改善に影響を与えるために、医薬組成物を動物に投与することを指す。特定の実施形態では、1つまたは複数の医薬組成物を動物に投与することができる。

【0122】

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

【0123】

特定の実施形態

本明細書に開示される特定の実施形態では、TMPRSS6は、以下に記載の配列を有する：GenBank寄託番号NM_153609.2（配列番号1として本明細書に組み込まれる）、16850000~16897000を切断したGENBANK寄託NT_011520.12の成分（配列番号2として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号CR456446.1（配列番号3として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号BC039082.1（配列番号4として本明細書に組み込まれる）、GENBANK寄託番号AY358398.1（配列番号5として本明細書に組み込まれる）、及びGENBANK寄託番号DB081153.1（配列番号6として本明細書に組み込まれる）。

【0124】

本明細書に開示される特定の実施形態では、TMPRSS6をコードする核酸を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。特定の実施形態では、化合物は、配列番号1~6のいずれかの核酸配列に示されるように、TMPRSS6配列を標的とする。

【0125】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号1~6の等しい長さの部分と相補的な少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または20個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、12~30個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0126】

本明細書に開示する特定の実施形態は、配列番号1の核酸塩基3162~3184の等しい長さの部分と相補的な少なくとも8個の連続した核酸塩基の部分を含む核酸塩基配列を有する12~30個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号1と少なくとも80%相補的である。

【0127】

本明細書に開示する特定の実施形態は、配列番号1の核酸塩基1286~1305の等しい長さの部分と相補的な少なくとも8個の連続した核酸塩基の部分を含む核酸塩基配列を有する12~30個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号1と少なくとも80%相補的である。

【0128】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号1の3162~3184の等しい長さの部分と相補的な少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少

10

20

30

40

50

なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 80 % 相補的である。

【0129】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号 1 の 1286 ~ 1305 の等しい長さの部分と相補的な少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 80 % 相補的である。

10

【0130】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号 7 ~ 85 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0131】

20

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号 23、36、37、63、77 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0132】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号 36 の少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

30

【0133】

本明細書に開示される特定の実施形態は、配列番号 77 の少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、または 20 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0134】

特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号 1 ~ 6 のいずれかの等しい長さの部分と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 相補的である。特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 6 のいずれかの等しい長さの部分と 100 % 相補的な核酸塩基配列を含む。

40

【0135】

特定の実施形態において、化合物は、8 ~ 80、20 ~ 80、10 ~ 50、20 ~ 35、10 ~ 30、12 ~ 30、15 ~ 30、16 ~ 30、20 ~ 30、20 ~ 29、20 ~ 28、20 ~ 27、20 ~ 26、20 ~ 25、20 ~ 24、20 ~ 23、20 ~ 22、20 ~ 21、15 ~ 25、16 ~ 25、15 ~ 24、16 ~ 24、17 ~ 24、18 ~ 24

50

、19～24、19～22、16～21、18～21または16～20の連結した核酸塩基から成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、化合物は、16個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、化合物は、20個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0136】

特定の実施形態において、化合物は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80の長さの連結した核酸塩基、または上記の値のいずれか2つで定義される範囲の連結した核酸塩基から成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0137】

特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、一本鎖である。

【0138】

特定の実施形態において、修飾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。特定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態において、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態において、修飾ヌクレオシド間結合のそれぞれは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0139】

特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、修飾糖を含む少なくとも1つのヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、少なくとも1つの修飾糖は二環糖を含む。特定の実施形態では、少なくとも1つの修飾糖が、2'-O-メトキシエチル、拘束エチル、3'-フルオロ-HNA、または4'-(CH₂)_n-O-2'架橋を含み、ここでnは、1または2である。

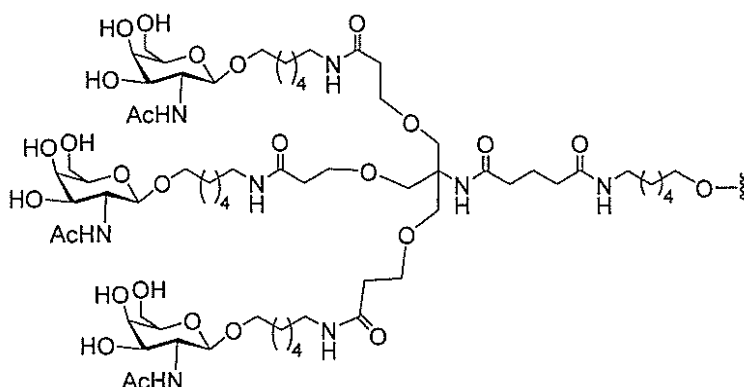
【0140】

特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、修飾核酸塩基を含む少なくとも1つのヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、該修飾核酸塩基は、5-メチル-シトシンである。

【0141】

特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、共役基を含む。特定の実施形態において、共役体は炭水化物部分である。特定の実施形態において、共役体はGalNAc部分である。特定の実施形態において、GalNAcは、5'-トリスヘキシルアミノ-(THA)-C₆-GalNAc₃である。特定の実施形態において、共役体は、以下の式を有する。

【化3】



10

20

30

40

50

【0142】

特定の実施形態において、化合物は、12～30個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号1の領域3162～3184の等しい長さの部分
を標的にするか、またはそれに相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)連結したヌクレオシドから
成る5'ウイングセグメント、及び(c)連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾糖を含む。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、G a l N A c 共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(T H A)-C 6 G a l N A c₃共役体である。

10

【0143】

特定の実施形態において、化合物は、12～30個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号1の領域1286～1305の等しい長さの部分
を標的とするか、またはそれに相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)連結したヌクレオシドから
成る5'ウイングセグメント、及び(c)連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾糖を含む。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、G a l N A c 共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(T H A)-C 6 G a l N A c₃共役体である。

20

【0144】

特定の実施形態において、化合物は、20個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号1の領域3162～3181の等しい長さの部分
を標的にするか、またはそれに相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)10個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)5個の連結したヌクレオシドから成る5'ウイングセグメント、及び(c)5個の連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル糖を含み、少なくとも1つのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、G a l N A c 共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(T H A)-C 6 G a l N A c₃共役体である。

30

【0145】

特定の実施形態において、化合物は、16個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号1の領域3169～3184の等しい長さの部分
を標的にするか、またはそれに相補的であり、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)9個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)3個の連結したヌクレオシドから成る5'ウイングセグメント、及び(c)4個の連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは、修飾糖を含み、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、G a l N A c 共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(T H A)-C 6 G a l N A c₃共役体である。

40

【0146】

50

特定の実施形態において、化合物は、20個の結合したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号36の少なくとも8個の連結した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有し、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)10個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)5個の連結したヌクレオシドから成る5'ウイングセグメント、及び(c)5個の連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは2'-O-メトキシエチル糖を含み、少なくとも1つのヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(THA)-C6 GalNAc₃共役体である。

10

【0147】

特定の実施形態において、化合物は、16個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含み、配列番号77の少なくとも8個の連結した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有し、修飾オリゴヌクレオチドは、(a)9個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、(b)3個の連結したヌクレオシドから成る5'ウイングセグメント、及び(c)4個の連結したヌクレオシドから成る3'ウイングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントに直接隣接してかつその間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾糖を含み、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(THA)-C6 GalNAc₃共役体である。

20

【0148】

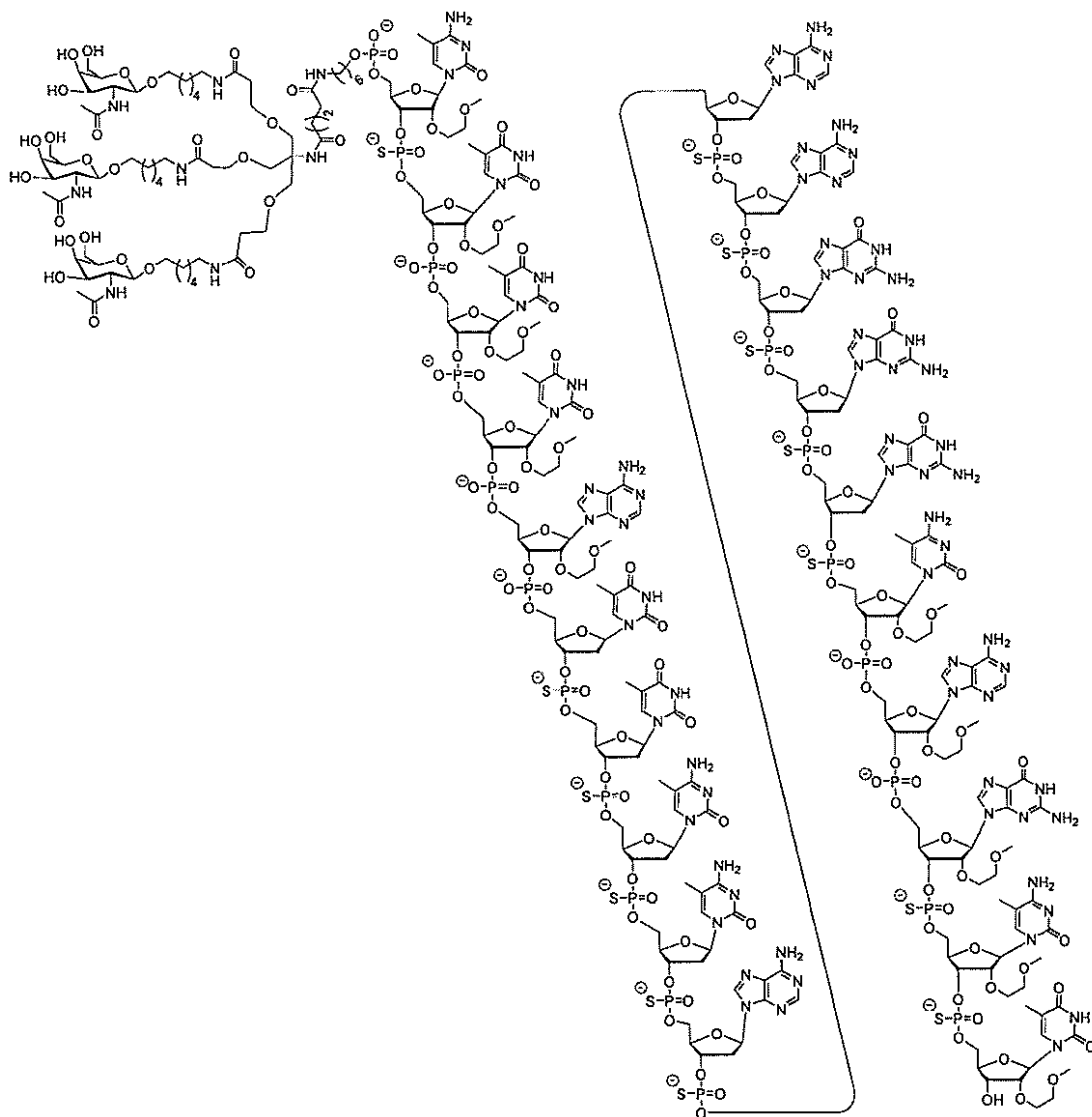
本明細書に開示される特定の実施形態は、以下の式：mCes Teo Teo Teo Aeoe Tds Tds mCds mCds Ads Ads Ads Gds Gds Gds mCeo Aeoe Ges mCes Te (配列番号36)に従う修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供するが、ここでAはアデニンであり、mCは5-メチルシトシンであり、Gはグアニンであり、Tはチミンであり、eは2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、dは2'-デオキシヌクレオシドであり、sはホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5'-トリスヘキシルアミノ-(THA)-C6 GalNAc₃共役体である。

30

【0149】

本明細書に開示する特定の実施形態では、以下の式を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【化 4】



10

20

30

【 0 1 5 0 】

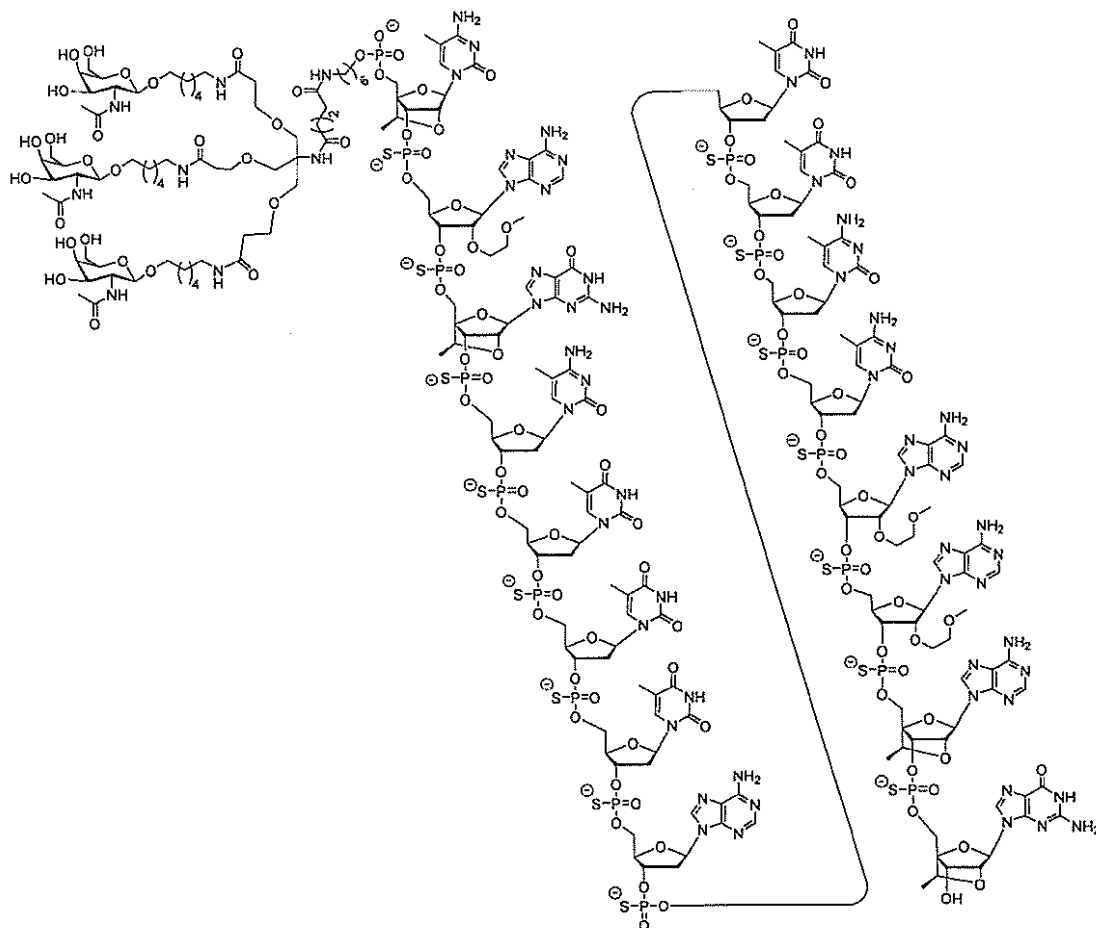
本明細書に開示される特定の実施形態は、以下の式： $mCks\ Aes\ Gks\ mCds\ Tds\ Tds\ Tds\ Ads\ Tds\ Tds\ mCds\ mCds\ Aes\ Aes\ Aks\ Gk$ （配列番号 77）に記載の修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供するが、ここで A はアデニンであり、mC は 5 - メチルシトシンであり、G はグアニンであり、T はチミンであり、e は 2' - O - メトキシエチル修飾ヌクレオシドであり、d は 2' - デオキシヌクレオシドであり、s はホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、k は c e t である。特定の実施形態において、修飾オリゴヌクレオチドは、GalNAc 共役体をさらに含む。特定の実施形態において、共役体は、5' - トリスヘキシル

40

【 0 1 5 1 】

本明細書に開示する特定の実施形態では、以下の式で修飾されたオリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【化 5】



10

20

【 0 1 5 2 】

特定の実施形態では、本明細書に開示される化合物または組成物は、修飾オリゴヌクレオチドの塩を含む。

【 0 1 5 3 】

特定の実施形態では、本明細書に開示される化合物または組成物は、薬学的に許容される担体または希釈剤をさらに含む。

【 0 1 5 4 】

特定の実施形態において、動物はヒトである。

【 0 1 5 5 】

特定の実施形態は、本明細書に記載の修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物または組成物を提供し、ここで粘度は40 cP未満である。特定の実施形態では、組成物は15 cP未満の粘度を有する。特定の実施形態では、組成物は12 cP未満の粘度を有する。特定の実施形態では、組成物は10 cP未満の粘度を有する。

【 0 1 5 6 】

本明細書に開示される特定の実施形態は、細胞、組織、臓器または動物におけるTMPRSS6を減少させる際に使用する、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物を提供する。

【 0 1 5 7 】

本明細書に開示される特定の実施形態は、細胞、組織、臓器または動物における鉄レベルを減少させる際に使用する、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物を提供する。特定の実施形態では、化合物及び組成物は、血清鉄レベルを減少させる。特定の実施形態では、化合物及び組成物は、肝鉄レベルを減少させる。特定の実施形態では、化合物及び組成物は、鉄吸収を減少させる。特定の実施形態では、化合物及び組成物は、鉄過剰または蓄積を減少させる。特定の実施形態では、鉄過剰 / 蓄

30

40

50

積を減少することによって、鉄過剰に関連する疾患、障害または病態が寛解され、治療され、予防されるか、遅延する。

【0158】

本明細書に開示される特定の実施形態は、動物におけるmRNAまたはタンパク質発現レベル等のプシジンレベルを増加させる際に使用する、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物を提供する。

【0159】

本明細書に開示される特定の実施形態は、動物におけるトランスフェリンの飽和度を減少させる際に使用する、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物を提供する。特定の実施形態では、トランスフェリンの飽和度を減少させることによって、赤血球生成について鉄供給が減少する。特定の実施形態では、赤血球生成の減少は、動物における赤血球増加症またはその症状を治療、予防、発症を遅延し、寛解し、かつ/または減少させる。特定の実施形態において、赤血球増加症は真性多血症である。特定の実施形態では、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドでの治療は、赤血球増加症が赤血球白血病に進行するのを予防または遅延する。

10

【0160】

本明細書に開示される特定の実施形態は、動物における鉄蓄積を減少させるための、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物を提供する。特定の実施形態では、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物及び組成物は、動物における鉄の過剰蓄積に関連する疾患、障害及び/もしくは病態、またはその症状を治療し、予防し、その進行を遅らせ、その発症を遅延させ、寛解させ、かつ/または減少させるために使用される。

20

【0161】

特定の実施形態では、鉄蓄積は、動物の疾患、障害または病態の結果または原因である。特定の実施形態では、疾患、障害または病態は、無効赤血球生成、赤血球増加症、ヘモクロマトーシスまたは貧血である。特定の実施形態において、ヘモクロマトーシスは遺伝性ヘモクロマトーシスである。特定の実施形態では、貧血は、遺伝性貧血、骨髓異形成症候群または重症慢性溶血である。特定の実施形態では、遺伝性貧血は、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜障害、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠損症、または遺伝性出血性毛細血管拡張症である。特定の実施形態において、サラセミアは、-サラセミアである。特定の実施形態では、-サラセミアは、重症型-サラセミア、中間型-サラセミアまたは軽症型-サラセミアである。特定の実施形態では、疾患、障害または病態は、HFE遺伝子の突然変異に関連する。他の実施形態では、疾患は、hemojuvelin遺伝子の突然変異に関連する。他の実施形態では、疾患は、ヘプシジン遺伝子の突然変異に関連する。

30

【0162】

特定の実施形態では、鉄蓄積は、動物の疾患、障害を治療するための治療の結果である。特定の実施形態では、治療は、静脈切開術または輸血治療である。特定の実施形態では、疾患、障害及び/または病態は、複数回の輸血に起因し得る。特定の実施形態では、複数回の輸血は、赤血球増加症をもたらし得る。特定の実施形態では、複数回の輸血は、動物が貧血を有することに関連する。複数回の輸血を必要とする貧血の例は、遺伝性貧血、遺伝性貧血及び重症慢性溶血である。

40

【0163】

特定の実施形態では、疾患、障害及び/または病態は、非経口の鉄サプリメント摂取または過剰な食事性鉄摂取に関連する。

【0164】

特定の実施形態では、治療に使用されるTMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物または組成物を提供する。特定の実施形態では、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物または組成物は、治療有効量で動物に投与

50

される。

【0165】

特定の実施形態では、医薬品の調製のために使用されるTMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物または組成物を提供する。特定の実施形態では、医薬品は、動物における鉄の過剰蓄積に関連する疾患、障害及び/または病態を治療し、予防し、その進行を遅らせ、その発症を遅らせ、かつ/または減少させるために使用する。

【0166】

特定の実施形態では、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む組成物または化合物は、1つまたは複数の第2薬剤（複数可）と共に同時投与される。特定の実施形態では、第2薬剤は、鉄キレート剤またはヘプシジンアゴニストである。さらなる実施形態では、鉄キレート剤は、FBS0701（Ferrokin）、エクジェイド、Desferalまたはデスフェラル（DFP）を含む。特定の実施形態において、第2薬剤は第2アンチセンス化合物である。さらなる実施形態では、第2アンチセンス化合物はTMPRSS6を標的とする。他の実施形態では、第2アンチセンス化合物は、非TMPRSS6化合物を標的とする。他の実施形態では、TMPRSS6を標的とする修飾オリゴヌクレオチドを含む組成物または化合物は、静脈切開術または輸血治療の前、最中、または後に投与される。

【0167】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物として、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣物、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びsiRNAが挙げられるが、これらに限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して「アンチセンス」であってもよく、これは、水素結合を介して標的核酸へのハイブリダイゼーションを受けることができることを意味する。

【0168】

特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、5'から3'方向に書かれた場合に、標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。特定のような実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に書かれた場合、標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補体を含む核酸塩基配列を有する。

【0169】

特定の実施形態において、TMPRSS6核酸を標的とするアンチセンス化合物は、長さが10～30ヌクレオチドある。換言すれば、アンチセンス化合物は、10～30個の連結した核酸塩基である。特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、8～80、10～80、12～50、15～30、18～24、19～22または20個の連結した核酸塩基から成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。特定のそのような実施形態において、アンチセンス化合物は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80の長さの連結した核酸塩基、または上記の値のいずれか2つで定義される範囲の連結した核酸塩基から成る修飾オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、アンチセンス化合物はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0170】

特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、短縮または切断された修飾オリゴヌクレオチドを含む。短縮または切断された修飾オリゴヌクレオチドは、5'末端（5'切断）、中央部分またはあるいは3'末端（3'切断）から欠失された単一のヌクレオシドを有することができる。短縮または切断された修飾オリゴヌクレオチドは、5'末端から

10

20

30

40

50

欠失された2以上のヌクレオシド、中央部分から欠失した2以上のヌクレオシドを有することができ、あるいは3'末端から欠失した2以上のヌクレオシドを有することができる。あるいは、欠失したヌクレオシドは、例えば、5'末端から欠失された1つまたは複数のヌクレオシド、中央部分から欠失された1つまたは複数のヌクレオシド、及び/または3'末端から欠失された1つまたは複数のヌクレオシドを有するアンチセンス化合物において、修飾オリゴヌクレオチド全体に分散してもよい。

【0171】

単一の追加のヌクレオシドが伸長オリゴヌクレオチド中に存在する場合、追加のヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または中央部分に位置し得る。2つ以上の追加のヌクレオシドが存在する場合、例えば、2つのヌクレオシドが、オリゴヌクレオチドの5'末端に付加されている(5'付加)、3'末端に付加されている(3'付加)、または中央部分に付加されているオリゴヌクレオチドでは、追加されたヌクレオシドは互いに隣接していてもよい。あるいは、追加されたヌクレオシドは、例えば、5'末端に付加された1つまたは複数のヌクレオチド、3'末端に付加された1つまたは複数のヌクレオシド、及び/または中央部分に付加された1つまたは複数のヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンス化合物全体に分散してもよい。

【0172】

活性を排除することなく、アンチセンスオリゴヌクレオチド等のアンチセンス化合物の長さを増加しもしくは減少させ、かつ/またはミスマッチ塩基を導入することができる。例えば、Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)において、13~25核酸塩基長の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、標的RNAの切断を誘導するその能力について、卵母細胞注入モデルで試験した。末端近くに8個または11個のミスマッチ塩基を含む25核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含まないアンチセンスオリゴヌクレオチドほどではなかったものの、標的mRNAの特異的切断を導くことができた。同様に、標的特異的切断が、13核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド(1つまたは3つのミスマッチを有するものを含む)を使用して達成された。

【0173】

Gautschi et al (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001)は、bcl-2 mRNAに対して100%の相補性を有し、かつbcl-xL mRNAに対して3つのミスマッチを有するオリゴヌクレオチドが、in vitro及びin vivoでbcl-2とbcl-xL両方の発現を低減できることを実証した。さらに、このオリゴヌクレオチドはin vivoで強力な抗腫瘍活性も示した。

【0174】

Maher及びDolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988)は、一連のタンデム14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびにそれぞれ2つまたは3つの該タンデムアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列で構成される28核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド及び42核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドを、ヒトDHFRの翻訳を停止させるその能力について、ウサギ網状赤血球アッセイで試験した。3つの14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドのそれぞれは単独で、28核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは42核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドよりもレベルは低かったものの、翻訳を阻害することができた。

【0175】

特定のアンチセンス化合物モチーフ及びメカニズム

特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、強化された阻害活性、標的核酸に対する増加した結合親和性、またはin vivoヌクレアーゼによる分解に対する耐性といった性質が該アンチセンス化合物に付与されるようなパターンまたはモチーフで配置された化学修飾サブユニットを有する。

【0176】

キメラアンチセンス化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する増加した耐性、増加した細胞取り込み、標的核酸に対する増加した結合親和性、及び/または増加した阻害活性が付与されるように修飾された少なくとも1つの領域を含有する。キメラアンチセンス化合物の第2の領域は、別の所望の特性を付与することができ、例えば、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼRNase Hの基質として役立つことができる。

【0177】

アンチセンス活性は、標的核酸とのアンチセンス化合物（例えば、オリゴヌクレオチド）のハイブリダイゼーションに關与する任意のメカニズムから生じ得、ハイブリダイゼーションは最終的に生物学的効果をもたらす。特定の実施形態において、標的核酸の量及び/または活性が調節される。特定の実施形態において、標的核酸の量及び/または活性が低下する。特定の実施形態において、アンチセンス化合物の標的核酸へのハイブリダイゼーションは、最終的に標的核酸の分解をもたらす。特定の実施形態において、アンチセンス化合物の標的核酸へのハイブリダイゼーションは、標的核酸の分解をもたらさない。特定のそのような実施形態において、標的核酸とハイブリダイズしたアンチセンス化合物の存在（占有）は、アンチセンス活性の調節をもたらす。特定の実施形態において、特定の化学的モチーフまたは化学修飾のパターンを有するアンチセンス化合物は、1つまたは複数のメカニズムを利用するのに特に適している。特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、1超のメカニズムを介して、かつ/または解明されていないメカニズムを介して機能する。したがって、本明細書に記載のアンチセンス化合物は、特定のメカニズムによって限定されない。

【0178】

アンチセンスメカニズムは、これらに限定されることなく、RNase H媒介性アンチセンス、RISC経路を利用し、siRNA、ssRNA及びマイクロRNAメカニズムを含むがこれらに限定されないRNAiメカニズム、及び占有ベースのメカニズムを含む。特定のアンチセンス化合物は、1つまたは複数のそのようなメカニズムを介してかつ/または追加のメカニズムを介して作用し得る。

【0179】

RNase H媒介アンチセンス

特定の実施形態では、アンチセンス活性は、少なくとも部分的に、RNase Hによる標的RNAの分解から生じる。RNase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。「DNA様」の一本鎖アンチセンス化合物が哺乳類細胞におけるRNase H活性を誘発することが当技術分野で既知である。したがって、DNAまたはDNA様ヌクレオシドの少なくとも一部を含むアンチセンス化合物は、RNase Hを活性化し得、標的核酸の切断をもたらす。特定の実施形態において、RNase Hを利用するアンチセンス化合物は、1つまたは複数の修飾ヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、そのようなアンチセンス化合物は、1～8個の修飾ヌクレオシドの少なくとも1つのブロックを含む。特定のそのような実施形態において、修飾ヌクレオシドはRNase H活性を支持しない。特定の実施形態において、このようなアンチセンス化合物は、本明細書に記載されるようなギャップマーである。特定のそのような実施形態において、ギャップマーのギャップはDNAヌクレオシドを含む。特定のそのような実施形態において、ギャップマーのギャップはDNA様ヌクレオシドを含む。特定のそのような実施形態において、ギャップマーのギャップはDNAヌクレオシド及びDNA様ヌクレオシドを含む。

【0180】

ギャップマーモチーフを有する特定のアンチセンス化合物は、キメラアンチセンス化合物と考えられる。ギャップマーでは、RNase H切断を支持する複数のヌクレオチドを有する内側領域が、内側領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外側領域の間に配置されている。ギャップマーモチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの場合、ギャップセグメントは一般にエンドヌクレアーゼ切断の基質として

機能し、一方、ウイングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、ギャップマーの領域は、各別個の領域を含む糖部分のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために使用される糖部分のタイプとして、いくつかの実施形態において、 $-D-$ リボヌクレオシド、 $-D-$ デオキシリボヌクレオシド、 $2'$ -修飾ヌクレオシド（そのような $2'$ -修飾ヌクレオシドとして、例えば $2'$ -MOE及び $2'$ -O-CH₃等を挙げることができる）、及び二環式糖修飾ヌクレオシド（そのような二環式糖修飾ヌクレオシドとして拘束エチルを有するものを挙げることができる）が挙げられる。特定の実施形態において、ウイング中のヌクレオシドは、例えば $2'$ -MOE及び拘束エチル（cEt）またはLNA等の二環式糖部分を含む、いくつかの修飾糖部分を含み得る。特定の実施形態において、ウイングはいくつかの修飾糖部分と非修飾糖部分を含んでもよい。特定の実施形態において、ウイングには、 $2'$ -MOEヌクレオシド、拘束エチルヌクレオシドまたはLNAヌクレオシド等の二環糖部分、及び $2'$ -デオキシヌクレオシドの様々な組み合わせが含まれ得る。

【0181】

異なる領域は、それぞれ均一な糖部分を含むか、異なった糖部分を含むか、または交互に並んだ糖部分を含み得る。ウイングギャップ-ウイングモチーフは、しばしば「X-Y-Z」と記載されるが、この場合、「X」は $5'$ -ウイングの長さを表し、「Y」はギャップの長さを表し、「Z」は $3'$ -ウイングの長さを表す。「X」及び「Z」は、均一な糖部分を含むか、異なった糖部分を含むか、または交互に並んだ糖部分を含み得る。特定の実施形態において、「X」及び「Y」が、1つまたは複数の $2'$ -デオキシヌクレオシドを含み得る。「Y」は $2'$ -デオキシヌクレオシドを含み得る。本明細書で使用される「X-Y-Z」と記述されるギャップマーは、ギャップが $5'$ -ウイング及び $3'$ -ウイングのそれぞれと直接隣接して配置されるような構成を有する。したがって、 $5'$ -ウイングとギャップの間にも、ギャップと $3'$ -ウイングの間にも、介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書に記載するアンチセンス化合物はいずれもギャップマーモチーフを有することができる。特定の実施形態において、「X」及び「Z」が同じであり、他の実施形態において、それらが異なる。特定の実施形態において、「Y」は8~15個のヌクレオシドである。X、Y、またはZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30個またはそれ以上のヌクレオシドのいずれかで有り得る。

【0182】

特定の実施形態において、TMPRSS6核酸を標的とするアンチセンス化合物は、ギャップが6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個の連結したヌクレオシドから成るギャップマーモチーフを有する。

【0183】

特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、次の式A： $(J)_m - (B)_n - (J)_p - (B)_r - (A)_t - (D)_g - (A)_v - (B)_w - (J)_x - (B)_y - (J)_z$ で表される糖モチーフを有し、

式中、

各Aは独立して $2'$ -置換ヌクレオシドであり、

各Bは独立して二環式ヌクレオシドであり、

各Jは独立して $2'$ -置換ヌクレオシドまたは $2'$ -デオキシヌクレオシドのいずれかであり、

各Dは $2'$ -デオキシヌクレオシドであり、

mは0~4、nは0~2、pは0~2、rは0~2、tは0~2、vは0~2、wは0~4、xは0~2、yは0~2、zは0~4、gは6~14であるが、ただし、

m、n及びrの少なくとも1つは0以外であり、

w及びyの少なくとも1つは0以外であり、

m、n、p、r及びtの合計は2~5であり、

10

20

30

40

50

v、w、x、y 及び z の合計は 2 ~ 5 である。

【0184】

RNAi 化合物

特定の実施形態において、アンチセンス化合物は干渉 RNA 化合物 (RNAi) であり、これは二本鎖 RNA 化合物 (低分子干渉 RNA または siRNA と呼ばれる) 及び一本鎖 RNAi 化合物 (または ssRNA) を含む。そのような化合物は、標的核酸 (したがって、マイクロ RNA / マイクロ RNA 模倣化合物を含む) を分解かつ / または隔離するために、RISC 経路を少なくとも部分的に介して働く。特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、そのようなメカニズムに特に適した修飾を含む。

【0185】

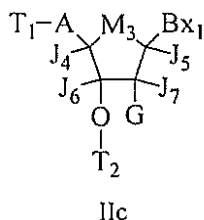
i. ssRNA 化合物

特定の実施形態において、一本鎖 RNAi 化合物 (ssRNA) としての使用に特に適したものを含むアンチセンス化合物は、修飾された 5' 末端を含む。特定のそのような実施形態において、5' 末端は修飾リン酸部分を含む。特定の実施形態において、このような修飾リン酸は安定化する (例えば、未修飾 5' - リン酸と比較し、分解 / 切断に耐性がある)。特定の実施形態において、このような 5' - 末端ヌクレオシドは 5' - リン部分を安定化させる。特定の修飾された 5' - 末端ヌクレオシドは、当該分野で、例えば WO / 2011 / 139702 に見出され得る。

【0186】

特定の実施形態において、ssRNA 化合物の 5' - ヌクレオシドは式 IIc :

【化 6】



で表される糖モチーフを有し、式中、

T₁ は任意に保護されたリン部分であり、

T₂ は式 IIc の化合物をオリゴマー化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、

A は次の式の 1 つを有する。

【化 7】



Q₁ 及び Q₂ はそれぞれ、H、ハロゲン、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₁ - C₆ アルコキシ、置換 C₁ - C₆ アルコキシ、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₂ - C₆ アルキニルまたは N(R₃)(R₄) であり、

Q₃ は、O、S、N(R₅) または C(R₆)(R₇) であり、

R₃、R₄、R₅、R₆ 及び R₇ はそれぞれ、独立して H、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキルまたは C₁ - C₆ アルコキシであり、

M₃ は、O、S、NR₁₄、C(R₁₅)(R₁₆)、C(R₁₅)(R₁₆)C(R₁₇)(R₁₈)、C(R₁₅) = C(R₁₇)、OC(R₁₅)(R₁₆) または OC(R₁₅)(Bx₂) であり、

R₁₄ は、H、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₁ - C₆ アルコキシ、置換 C₁ - C₆ アルコキシ、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニルまたは置換 C₂ - C₆ アルキニルであり、

R₁₅、R₁₆、R₁₇ 及び R₁₈ はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₁ - C₆ アルコキシ、置換 C₁ - C₆ アルコキシ、

10

20

30

40

50

$C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニルまたは置換 $C_2 - C_6$ アルキニルである。

$B \times_1$ は、複素環式塩基部分であり、

または、 $B \times_2$ が存在する場合、 $B \times_2$ は、複素環式塩基部分であり、 $B \times_1$ は、 H 、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニルまたは置換 $C_2 - C_6$ アルキニルであり、

J_4 、 J_5 、 J_6 及び J_7 はそれぞれ独立して、 H 、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニルまたは置換 $C_2 - C_6$ アルキニルであり、

10

または J_4 は、 J_5 または J_7 の 1 つと架橋を形成し、ここで、前記架橋は、 O 、 S 、 NR_{19} 、 $C(R_{20})(R_{21})$ 、 $C(R_{20}) = C(R_{21})$ 、 $C[=C(R_{20})(R_{21})]$ 及び $C(=O)$ から選択される 1 ~ 3 個の連結されたピラジカル基を含み、他の J_5 、 J_6 及び J_7 の 2 つはそれぞれ独立して、 H 、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニルまたは置換 $C_2 - C_6$ アルキニルであり、

R_{19} 、 R_{20} 及び R_{21} はそれぞれ独立して、 H 、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_6$ アルコキシ、 $C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニルまたは置換 $C_2 - C_6$ アルキニルである。

20

G は、 H 、 OH 、ハロゲンまたは $O - [C(R_8)(R_9)]_n - [(C=O)_m - X_1]_j - Z$ であり、

R_8 及び R_9 はそれぞれ独立して、 H 、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキルであり、

X_1 は O 、 S または $N(E_1)$ であり、

Z は、 H 、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_2 - C_6$ アルケニル、置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、 $C_2 - C_6$ アルキニル、置換 $C_2 - C_6$ アルキニル、または $N(E_2)(E_3)$ であり、

30

E_1 、 E_2 及び E_3 はそれぞれ独立して、 H 、 $C_1 - C_6$ アルキル、または置換 $C_1 - C_6$ アルキルであり、

n は 1 ~ 約 6 であり、

m は 0 または 1 であり、

j は 0 または 1 であり、

各置換基は、ハロゲン、 OJ_1 、 $N(J_1)(J_2)$ 、 $=NJ_1$ 、 SJ_1 、 N_3 、 CN 、 $OC(=X_2)J_1$ 、 $OC(=X_2)N(J_1)(J_2)$ 及び $C(=X_2)N(J_1)(J_2)$ から独立して選択される 1 つまたは複数の任意に保護される置換基を含み、

X_2 は O 、 S または NJ_3 であり、

J_1 、 J_2 及び J_3 はそれぞれ独立して、 H または $C_1 - C_6$ アルキルであり、

40

j が 1 である場合、 Z はハロゲンまたは $N(E_2)(E_3)$ 以外であり、

ここで、該オリゴマー化合物は、8 ~ 40 個のモノマーサブユニットを含み、標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズ可能である。

【0187】

特定の実施形態において、 M_3 は O 、 $CH=CH$ 、 OCH_2 または $OC(H)(B \times_2)$ である。特定の実施形態において、 M_3 は O である。

【0188】

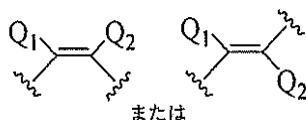
特定の実施形態では、 J_4 、 J_5 、 J_6 及び J_7 それぞれ H である。特定の実施形態では、 J_4 は、 J_5 または J_7 の 1 つと架橋を形成する。

【0189】

50

特定の実施形態において、Aは次の式の1つを有する。

【化8】



式中、

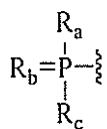
Q_1 及び Q_2 はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシまたは置換 $C_1 - C_6$ アルコキシである。特定の実施形態では、 Q_1 及び Q_2 はそれぞれHである。特定の実施形態では、 Q_1 及び Q_2 はそれぞれ独立して、Hまたはハロゲンである。特定の実施形態では、 Q_1 及び Q_2 はHであり、 Q_1 及び Q_2 の他は、F、 CH_3 または OCH_3 である。

10

【0190】

特定の実施形態において、 T_1 は以下の式を有する。

【化9】



式中、

R_a 及び R_c はそれぞれ独立して、保護ヒドロキシル、保護チオール、 $C_1 - C_6$ アルキル、置換 $C_1 - C_6$ アルキル、 $C_1 - C_6$ アルコキシまたは置換 $C_1 - C_6$ アルコキシ、保護アミノまたは置換アミノであり、

20

R_b はOまたはSである。特定の実施形態では、 R_b はOであり、 R_a 及び R_c はそれぞれ独立して、 OCH_3 、 OCH_2CH_3 または $CH(CH_3)_2$ である。

【0191】

特定の実施形態では、Gは、ハロゲン、 OCH_3 、 OCH_2F 、 $OCHF_2$ 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 $O(CH_2)_2F$ 、 OCH_2CHF_2 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2 - CH = CH_2$ 、 $O(CH_2)_2 - OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2 - SCH_3$ 、 $O(CH_2)_2 - OCF_3$ 、 $O(CH_2)_3 - N(R_{10})(R_{11})$ 、 $O(CH_2)_2 - ON(R_{10})(R_{11})$ 、 $O(CH_2)_2 - O(CH_2)_2 - N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O) - N(R_{10})(R_{11})$ 、 $OCH_2C(=O) - N(R_{12}) - (CH_2)_2 - N(R_{10})(R_{11})$ または $O(CH_2)_2 - N(R_{12}) - C(=NR_{13})[N(R_{10})(R_{11})]$ であり、ここで、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 及び R_{13} はそれぞれ独立して、Hまたは $C_1 - C_6$ アルキルである。特定の実施形態では、Gは、ハロゲン、 OCH_3 、 OCF_3 、 OCH_2CH_3 、 OCH_2CF_3 、 $OCH_2 - CH = CH_2$ 、 $O(CH_2)_2 - OCH_3$ 、 $O(CH_2)_2 - O(CH_2)_2 - N(CH_3)_2$ 、 $OCH_2C(=O) - N(H)CH_3$ 、 $OCH_2C(=O) - N(H) - (CH_2)_2 - N(CH_3)_2$ または $OCH_2 - N(H) - C(=NH)NH_2$ である。特定の実施形態では、GはF、 OCH_3 または $O(CH_2)_2 - OCH_3$ である。特定の実施形態では、Gは $O(CH_2)_2 - OCH_3$ である。

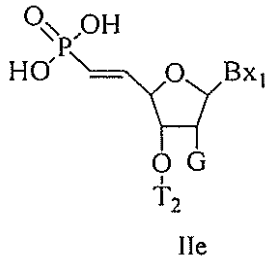
30

40

【0192】

特定の実施形態において、5'-末端ヌクレオシドは式IIeを有する。

【化 10】



【0193】

10

特定の実施形態において、ssRNAに特に適しているものを含むアンチセンス化合物は、定義されたパターンまたは糖修飾モチーフでオリゴヌクレオチドまたはその領域に沿って配置された1つまたは複数の型の修飾糖部分及び/または天然糖部分を含む。そのようなモチーフは、本明細書で考察される糖修飾及び/または他の既知の糖修飾のうちのいずれかを含み得る。

【0194】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、均一な糖修飾を有する領域を含むか、またはそれから成る。特定のそのような実施形態において、領域の各ヌクレオシドは、同じRNA様糖修飾を含む。特定の実施形態において、領域の各ヌクレオシドは2'-Fヌクレオシドである。特定の実施形態において、領域の各ヌクレオシドは2'-OMeヌクレオシドである。特定の実施形態において、領域の各ヌクレオシドは2'-MOEヌクレオシドである。特定の実施形態において、領域の各ヌクレオシドはcEtヌクレオシドである。特定の実施形態において、領域の各ヌクレオシドはLNAヌクレオシドである。特定の実施形態において、均一な領域はオリゴヌクレオチドの全てまたは本質的に全てを構成する。特定の実施形態において、領域は1~4個の末端ヌクレオシドを除きオリゴヌクレオチド全体を構成する。

20

【0195】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオシドが第1型の糖修飾を有するヌクレオチドと第2型の糖修飾を有するヌクレオチドとの間で交互に並ぶ1つまたは複数の交互糖修飾領域を含む。特定の実施形態において、両方の型のヌクレオシドはRNA様ヌクレオシドである。特定の実施形態において、交互ヌクレオシドは、2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA、及びcEtから選択される。特定の実施形態において、交互の修飾は、2'-F及び2'-OMeである。そのような領域は、連続していてもよく、または異なる修飾ヌクレオシドまたは共役ヌクレオシドによって中断されていてもよい。

30

【0196】

特定の実施形態において、交互修飾の交互領域はそれぞれ単一のヌクレオシドから成る(すなわち、パターンは $(AB)_x A_y$ であり、ここで、Aは第1の型の糖修飾を有するヌクレオシドであり、Bは第2の型の糖修飾を有するヌクレオシドであり、xは1~20であり、yは0または1である)。特定の実施形態において、交互のモチーフ内の1つまたは複数の交互領域は、1超の型のヌクレオシドを含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、以下のヌクレオシドモチーフのいずれかの1つまたは複数の領域を含むことができ、:

40

A A B B A A、
 A B B A B B、
 A A B A A B、
 A B B A B A A B B、
 A B A B A A、
 A A B A B A B、
 A B A B A A、
 A B B A A B B A B A B A A、

50

B A B B A A B B A B A B A A、または
A B A B B A A B B A B A B A A、

式中、Aは第1の型のヌクレオシドであり、Bは第2の型のヌクレオシドである。特定の
実施形態において、A及びBはそれぞれ2'-F、2'-OMe、BNA、及びMOEから
選択される。

【0197】

特定の実施形態において、そのような交互のモチーフを有するオリゴヌクレオチドは、
修飾された5'末端ヌクレオシド、例えば、式IIcまたはIIEのヌクレオシドも含む
。

【0198】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、2-2-3モチーフを有する領域を
含む。

そのような領域は以下のモチーフ：

- (A)₂ - (B)_x - (A)₂ - (C)_y - (A)₃ - を含み、

式中、Aは第1型の修飾ヌクレオシドであり、

B及びCは、Aとは異なって修飾されたヌクレオシドであるが、B及びCは、互いに同
じまたは異なる修飾を有していてもよく、

x及びyは1～15である。

【0199】

特定の実施形態において、Aは2'-OMe修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態
において、B及びCは両方とも2'-F修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態におい
て、Aは2'-OMe修飾ヌクレオシドであり、B及びCは両方とも2'-F修飾ヌクレ
オシドである。

【0200】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは以下の糖モチーフ：

5' - (Q) - (AB)_x A_y - (D)_z

を有し、式中、

Qは、安定化リン酸部分を含むヌクレオシドである。

特定の実施形態において、Qは、式IIcまたはIIEを有するヌクレオシドであり、

Aは第1型の修飾ヌクレオシドであり、

Bは第2型の修飾ヌクレオシドであり、

Dは、それに隣接するヌクレオシドとは異なる修飾を含む修飾ヌクレオシドである。

したがって、yが0の場合、DにはBとは異なる修飾をしなければならない、yが1の場合
、DにはAとは異なる修飾をしなければならない。

特定の実施形態では、Dは、AともBとも異なる。

Xは5～15であり、

Yは0または1であり、

Zは0～4である。

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは以下の糖モチーフ：

5' - (Q) - (A)_x - (D)_z

を有し、式中、

Qは、安定化リン酸部分を含むヌクレオシドである。

特定の実施形態において、Qは、式IIcまたはIIEを有するヌクレオシドであり、

Aは第1型の修飾ヌクレオシドであり、

Dは、Aとは異なる修飾を含む修飾ヌクレオシドである。

Xは11～30であり、

Zは0～4である。

【0201】

特定の実施形態において、上記モチーフのA、B、C及びDは、2'-OMe、2'-
F、2'-MOE、LNA、及びcetから選択される。特定の実施形態において、Dは

10

20

30

40

50

末端ヌクレオシドを表す。特定の実施形態において、このような末端ヌクレオシドは、標的核酸にハイブリダイズするようには設計されていない（ただし、1つまたは複数は偶然にハイブリダイズし得る）。特定の実施形態において、各Dヌクレオシドの核酸塩基は、標的核酸の対応する位置における核酸塩基の同一性に関わらず、アデニンである。特定の実施形態において、各Dヌクレオシドの核酸塩基はチミンである。

【0202】

特定の実施形態において、ssRNAとしての使用に特に適しているものを含むアンチセンス化合物は、定義されたパターンまたは修飾ヌクレオシド間結合モチーフでオリゴヌクレオチドまたはその領域に沿って配置された修飾ヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、交互のヌクレオシド間結合モチーフを有する領域を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、均一に修飾されたヌクレオシド間結合の領域を含む。特定のそのような実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって均一に連結された領域を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合によって均一に連結される。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル及びホスホロチオエートから選択される。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル及びホスホロチオエートから選択され、少なくとも1個のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートである。

【0203】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも6個のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも8個のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10個のホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも6個の連続したホスホロチオエートヌクレオシド間結合の少なくとも1個のブロックを含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも8個の連続したホスホロチオエートヌクレオシド間結合の少なくとも1個のブロックを含む。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10個の連続したホスホロチオエートヌクレオシド間結合の少なくとも1個のブロックを含む。特定のそのような実施形態において、少なくとも1個のそのようなブロックは、オリゴヌクレオチドの3'末端に位置する。特定のそのような実施形態において、少なくとも1個のそのようなブロックがオリゴヌクレオチドの3'末端から3ヌクレオシド以内に位置する。

【0204】

本明細書に記載の種々の糖モチーフのいずれかを有するオリゴヌクレオチドは、任意の連結モチーフを有してもよい。例えば、上記のオリゴヌクレオチドを含むがそれらに限定されないオリゴヌクレオチドは、以下の表から非限定的に選択される結合モチーフを有してもよい。

【表1】

5'末端結合	中央領域	3'一領域
PS	交互に並んだPO/PS	6 PS
PS	交互に並んだPO/PS	7 PS
PS	交互に並んだPO/PS	8 PS

【0205】

isiRNA化合物

特定の実施形態において、アンチセンス化合物は二本鎖RNAi化合物（siRNA）である。そのような実施形態において、一方または両方の鎖は、ssRNAについて上記の

任意の修飾モチーフを含み得る。特定の実施形態において、*s s R N A*化合物は非修飾 *R N A*であってもよい。特定の実施形態において、*s i R N A*化合物は、未修飾 *R N A*ヌクレオシドを含むが、修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。

【0206】

いくつかの実施形態は、各鎖が1つまたは複数の修飾されたまたは修飾されていないヌクレオシドの位置によって定義されるモチーフを含む二本鎖組成物に関する。特定の実施形態において、完全にまたは少なくとも部分的にハイブリダイズして二重鎖領域を形成し、さらに核酸標的に相補的であり、核酸標的にハイブリダイズする領域を含む第1及び第2のオリゴマー化合物を含む組成物が提供される。このような組成物は、核酸標的に対して完全または部分的相補性を有するアンチセンス鎖である第1のオリゴマー化合物と、第1のオリゴマー化合物と少なくとも1つの二本鎖領域を形成し、かつそれと相補性である1つまたは複数の領域を有するセンス鎖である第2のオリゴマー化合物と、を含むことが適切である。

10

【0207】

いくつかの実施形態の組成物は、核酸標的にハイブリダイズすることによって遺伝子発現を調節し、その結果、その正常な機能が失われる。いくつかの実施形態において、標的核酸は *T M P R S S 6* である。特定の実施形態において、標的 *T M P R S S 6* の分解は、本発明の組成物で形成される活性化 *R I S C* 複合体によって促進される。

【0208】

いくつかの実施形態は、鎖の1つが、例えば、*R I S C*（または切断）複合体への反対鎖の優先的ローディングに影響を及ぼすのに有用な二本鎖組成物に関する。組成物は、選択された核酸分子を標的化し、1つまたは複数の遺伝子の発現を調節するのに有用である。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、標的 *R N A*の一部にハイブリダイズし、その結果、標的 *R N A*の正常な機能が失われる。

20

【0209】

特定の実施形態は、両方の鎖がヘミマーモチーフ、完全修飾モチーフ、位置修飾モチーフまたは交互モチーフを含む二本鎖組成物を対象とする。本発明の組成物の各鎖は、例えば *s i R N A*経路において特定の役割を果たすように修飾することができる。各鎖において異なるモチーフを使用することにより、または各鎖において異なる化学修飾を有する同じモチーフを使用することにより、センス鎖の取り込みを阻害しながら *R I S C* 複合体に対するアンチセンス鎖を標的とすることが可能になる。このモデル内では、各鎖は、その特定の役割のために強化されるように、独立して修飾することができる。アンチセンス鎖は、*R I S C*の1つの領域におけるその役割を強化するために5'末端で修飾することができ、3'末端には *R I S C*の異なる領域におけるその役割を強化するために異なった修飾を行うことができる。

30

【0210】

二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、自己相補的センス領域及びアンチセンス領域を含む二本鎖ポリヌクレオチド分子で有り得、ここでアンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、及び標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含む。二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、一方のストランドがセンス鎖であり、他方がアンチセンス鎖である2つの別々のオリゴヌクレオチドから構築されてもよく、この場合、アンチセンス及びセンス鎖は、自己相補的であり（すなわち、各ストランドが、他方のストランドのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む）、例えば、アンチセンス鎖及びセンス鎖が二本鎖または二本鎖構造を形成する場合、例えば、二本鎖領域（*d o u b l e - s t r a n d e d r e g i o n*）は、約15～約30、例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30塩基対であり、アンチセンス鎖は、標的核酸分子またはその一部分のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は、標的核酸配列またはその一部分に対応するヌクレオチド配列を含む（例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド分子の約15～約25以上のヌクレオチドが、

40

50

標的核酸またはその一部分に相補的である)。あるいは、二本鎖オリゴヌクレオチドは、単一のオリゴヌクレオチドから構築され、ここで *siRNA* の自己相補的センス領域及びアンチセンス領域は、核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカー（単数または複数）によって連結される。

【0211】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖、非対称二重鎖、ヘアピンまたは非対称ヘアピン二次構造を有するポリヌクレオチドであり得、自己相補的センス及びアンチセンス領域を有するが、この場合、アンチセンス領域は、別個の標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、及び標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有するセンス領域を含む。二本鎖オリゴヌクレオチドは、2つ以上のループ構造及び自己相補的なセンス及びアンチセンス領域を含む基部を有する環状単鎖ポリヌクレオチドであってもよく、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、*RNAi* を媒介することができる活性 *siRNA* 分子を生成するように、*in vivo* または *in vitro* のいずれかでプロセッシングされ得る。

【0212】

特定の実施形態において、二本鎖オリゴヌクレオチドは、別々のセンス及びアンチセンス配列または領域を含むが、この場合、センス及びアンチセンス領域は、当分野で知られているようにヌクレオチドまたは非ヌクレオチドリanker分子によって共有結合的に連結されるか、または代替的にイオン性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、及び/またはスタッキング相互作用によって非共有結合的に連結される。特定の実施形態において、二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、二本鎖オリゴヌクレオチドは、標的遺伝子の発現の阻害を引き起こす様式で標的遺伝子のヌクレオチド配列と相互作用する。

【0213】

本明細書で使用される二本鎖オリゴヌクレオチドは、*RNA* のみを含む分子に限定される必要はないが、化学的に修飾されたヌクレオチド及び非ヌクレオチドをさらに包含する。特定の実施形態において、短い干渉核酸分子は、2'-ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠いている。特定の実施形態において、短い干渉核酸は、任意にいかなるリボヌクレオチド(例えば、2'-OH基を有するヌクレオチド)も含まない。しかし、*RNAi* を支持するために分子内にリボヌクレオチドの存在を必要としないそのような二本鎖オリゴヌクレオチドは、2'-OH基を有する1つまたは複数のヌクレオチドを含む、結合した1つのリンカーもしくは複数のリンカー、または他の結合もしくは会合した基、部分、もしくは鎖を有してもよい。任意に、二本鎖オリゴヌクレオチドは、約5, 10, 20, 30, 40、または50%のヌクレオチド位置でリボヌクレオチドを含み得る。本明細書で使用される *siRNA* という用語は、配列特異的 *RNAi*、例えば、低分子干渉 *RNA* (*siRNA*)、二本鎖 *RNA* (*dsRNA*)、マイクロ *RNA* (*miRNA*)、短ヘアピン *RNA* (*shRNA*)、低分子干渉オリゴヌクレオチド、低分子干渉核酸、低分子干渉修飾オリゴヌクレオチド、化学修飾 *siRNA*、転写後遺伝子サイレンシング *RNA* (*ptgsRNA*)、及びその他を媒介することが可能である核酸分子を説明するために使用される他の用語と同等であることを意味する。さらに、本明細書で使用される *RNAi* という用語は、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳阻害、またはエピジェネティクス等の配列特異的 *RNA* 干渉を説明するために使用される他の用語と同等であることを意味する。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドを、転写後レベル及び転写前レベルの両方で後成的に沈黙化された遺伝子に使用することができる。非限定的な例において、本発明の *siRNA* 分子による遺伝子発現の後成的な調節は、遺伝子発現を変化させるためのクロマチン構造またはメチル化パターンの *siRNA* 媒介性修飾に起因し得る(例えば、Verdel et al., 2004, Science, 303, 672-676、Pa

10

20

30

40

50

l - Bhadra et al. , 2004 , Science , 303 , 669 - 672 、 Allshire , 2002 , Science , 297 , 1818 - 1819 、 ; Volpe et al. , 2002 , Science , 297 , 1833 - 1837 、 Jenwein , 2002 , Science , 297 , 2215 - 2218 、 及び Hall et al. , 2002 , Science , 297 , 2232 - 2237 を参照) 。

【 0214 】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態の化合物及び組成物は、例えば、自己相補的配列を有する単一のRNA鎖が二本鎖構造をとることのできる「ヘアピン」またはステムループ二本鎖RNAエフェクター分子または2つの別々のRNA鎖を含む二重鎖dsRNAエフェクター分子を含むdsRNA媒介遺伝子サイレンシングまたはRNAiメカニズムにより、TMPRSS6を標的とすることができることが企図される。様々な実施形態において、dsRNAは、完全にリボヌクレオチドから成るか、または例えば2000年4月19日に出願されたWO00/63364、もしくは1999年4月21日に出願された米国特許出願第60/130,377号により開示されるRNA/DNAハイブリッド等のリボヌクレオチドとデオキシヌクレオチドとの混合物から成る。dsRNAまたはdsRNAエフェクター分子は、分子の1つのセグメントのヌクレオチドが分子の別のセグメントのヌクレオチドと塩基対を形成するように、自己相補性の領域を有する単一の分子であってもよい。様々な実施形態において、単一分子から成るdsRNAは、完全にリボヌクレオチドから成るか、またはデオキシリボヌクレオチドの領域に相補的なリボヌクレオチドの領域を含む。あるいは、dsRNAは、互いに相補的な領域を有する2つの異なる鎖を含み得る。

【 0215 】

様々な実施形態において、両方の鎖は完全にリボヌクレオチドからなり、一方の鎖は完全にリボヌクレオチドからなり、一方の鎖は完全にデオキシリボヌクレオチドから成るか、または一方または両方の鎖はリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドとの混合物を含む。特定の実施形態において、相補性の領域は、互いに対してかつ標的核酸配列に対して、少なくとも70、80、90、95、98、または100%相補的である。特定の実施形態において、二本鎖構造内に存在するdsRNAの領域は、少なくとも19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、50、75、100、200、500、1000、2000または5000ヌクレオチドを含むか、またはdsRNAに表されるcDNAまたは他の標的核酸配列中の全てのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、dsRNAは、一本鎖末端等のいかなる一本鎖領域を含有しないか、またはdsRNAはヘアピンである。他の実施形態において、dsRNAは、1つまたは複数の一本鎖領域またはオーバーハングを有する。特定の実施形態において、RNA/DNAハイブリッドは、アンチセンス鎖または領域であるDNA鎖または領域（例えば、標的核酸に対して少なくとも70、80、90、95、98、または100%の相補性を有する）及びRNA鎖またはセンス鎖もしくは領域である領域（例えば、標的核酸に対して少なくとも70、80、90、95、98、または100%の同一性を有する）を含み、逆もまた同様である。

【 0216 】

様々な実施形態において、RNA/DNAハイブリッドは、本明細書に記載のものまたは2000年4月19日に出願されたWO00/63364、または1999年4月21日に出願された米国特許出願第60/130,377号に記載されたもの等の酵素的または化学的合成方法を使用してin vitroで作製される。他の実施形態において、in vitroで合成されたDNA鎖は、in vivoまたはin vitroで作製されたRNA鎖と、DNA鎖の細胞への形質転換の前、後または同時に複合化される。他の実施形態では、dsRNAは、センス及びアンチセンス領域を含む単一環状核酸であるか、dsRNAは、環状核酸、及び第2の環状核酸もしくは線状核酸のいずれかを含む（例えば、2000年4月19日に出願されたWO00/63364、または1999年4月21日に出願された米国特許出願第60/130,377号を参照のこと）。例示的な

環状核酸には、ヌクレオチドの遊離 5' ホスホリル基がループバック様式で別のヌクレオチドの 2' ヒドロキシル基に連結されるラリアト構造が含まれる。

【0217】

他の実施形態において、該 dsRNA は、対応する 2' 位が水素またはヒドロキシル基を含有する対応する dsRNA と比較して、糖の 2' 位がハロゲン（フッ素基等）を含むか、または *in vitro* もしくは *in vivo* で dsRNA の半減期を増加させるアルコキシ基（例えば、メトキシ基）を含む 1 つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。さらに他の実施形態において、dsRNA は、天然に存在するホスホジエステル結合以外の隣接するヌクレオチド間に 1 つまたは複数の結合を含む。そのような結合の例には、ホスホラミド、ホスホロチオエート、及びホスホロジチオエート結合が含まれる。dsRNA はまた、米国特許第 6,673,661 号に教示されているような化学的に修飾された核酸分子であってもよい。他の実施形態において、dsRNA は、例えば 2000 年 4 月 19 日に出願された WO00/63364、または 1999 年 4 月 21 日に出願された米国特許出願第 60/130,377 号で開示される通り、1 つまたは 2 つのキャップ鎖を含有する。

10

【0218】

他の実施形態において、dsRNA は、米国仮特許出願第 60/399,998 号、米国仮特許出願第 60/419,532 号、及び PCT/US2003/033466 に記載の dsRNA 分子と同様に、少なくとも部分的に WO00/63364 に開示される dsRNA 分子のいずれかであり得、その教示は参照により本明細書に組み込まれる。該 dsRNA のいずれかは、本明細書に記載の方法または WO00/63364 に記載されているような標準的方法を用いて、*in vitro* または *in vivo* で発現させることができる。

20

【0219】

占有

特定の実施形態において、アンチセンス化合物は、RNase H を介して切断または標的核酸を生じさせる、または RISC 経路を介する切断または隔離をもたらすと予想されない。特定のそのような実施形態において、アンチセンス活性は、ハイブリダイズしたアンチセンス化合物の存在が標的核酸の活性を妨害する占有から生じ得る。特定のそのような実施形態において、アンチセンス化合物は均一に修飾されていてもよく、または修飾及び/または修飾ヌクレオシド及び未修飾ヌクレオシドの混合物を含んでいてもよい。

30

【0220】

標的核酸、標的領域及びヌクレオチド配列

TMPRSS6 をコードするヌクレオチド配列は、以下に記載の配列を有するが、これらに限定されない：GenBank 寄託番号 NM_153609.2（配列番号 1 として本明細書に組み込まれる）、16850000~16897000 を切断した GENBANK 寄託番号 NT_011520.12 の成分（配列番号 2 として本明細書に組み込まれる）、GENBANK 寄託番号 CR456446.1（配列番号 3 として本明細書に組み込まれる）、GENBANK 寄託番号 BC039082.1（配列番号 4 として本明細書に組み込まれる）、GENBANK 寄託番号 AY358398.1（配列番号 5 として本明細書に組み込まれる）、または GENBANK 寄託番号 DB081153.1（配列番号 6 として本明細書に組み込まれる）。特定の実施形態では、本明細書に記載のアンチセンス化合物は、TMPRSS6 をコードする核酸を標的とする。特定の実施形態では、本明細書に記載のアンチセンス化合物は、配列番号 1~6 のいずれかの配列を標的とする。

40

【0221】

本明細書に含まれる例の各配列番号に記載される配列は、糖部分に対する任意の修飾、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対する任意の修飾に依存しないことが理解される。このように、配列番号によって定義されたアンチセンス化合物は、独立して、糖部分に対する 1 つまたは複数の修飾、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基を含むことができる。Issis 番号（ISSIS 番号）によって定義されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配

50

列及びモチーフの組み合わせを示す。

【0222】

特定の実施形態において、標的領域は、標的核酸の構造的に定義された領域である。例えば、標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、エキソン/イントロン接合部、コーディング領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の定義された核酸領域を含んでいてもよい。TMPRSS6の構造的に定義された領域は、NCBI等の配列データベースからの寄託番号によって得ることができ、そのような情報は、参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施形態において、標的領域は、標的領域内の1つの標的セグメントの5' 標的部位から、標的領域内の別の標的セグメントの3' 標的部位までの配列を含んでいてもよい。

10

【0223】

特定の実施形態において、「標的セグメント」は、核酸内の標的領域のより小さなサブ部分である。例えば、「標的セグメント」とは、1つまたは複数のアンチセンス化合物が標的とする標的核酸のヌクレオチドの配列で有り得る。「5' 標的部位」は、標的セグメントの5' 末端のヌクレオチドを指す。「3' 標的部位」は、標的セグメントの3' 末端のヌクレオチドを指す。

【0224】

標的化は、所望の効果が生じるように、アンチセンス化合物がハイブリダイズする少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。特定の実施形態において、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの減少である。特定の実施形態において、所望の効果は、標的核酸または標的核酸に関連する表現型の変化によりコードされるタンパク質のレベルの減少である。

20

【0225】

標的領域は、1つまたは複数の標的セグメントを含んでいてもよい。標的領域内の複数の標的セグメントは重複してもよい。あるいは、それらは重複していなくてもよい。特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、約300個以下のヌクレオチドにより分離される。特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、いくつかのヌクレオチドによって分離され、すなわち、標的核酸上の約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10個のヌクレオチド、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10個以下のヌクレオチド、約250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10個以下のヌクレオチド、または前述の値のいずれか2つによって定義される範囲のヌクレオチドで分離される。特定の実施形態において、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の5個以下のヌクレオチド、または約5個のヌクレオチドで分離される。特定の実施形態において、標的セグメントは連続する。本明細書に列挙される5' 標的部位または3' 標的部位のいずれかである開始核酸を有する範囲によって定義される標的領域が意図される。

30

【0226】

適切な標的セグメントは、5' UTR、コーディング領域、3' UTR、イントロン、エキソン、またはエキソン/イントロン接合内に見出すことができる。開始コドンまたは終止コドンを含む標的セグメントも、適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、特に、開始コドンまたは終始コドン等の特定の構造的に定義された領域を除外してもよい。

40

【0227】

適切な標的セグメントの決定は、ゲノム全体にわたる、標的核酸の配列と他の配列との比較を含むことができる。例えば、BLASTアルゴリズムは、異なる核酸間の類似性の領域を同定するために使用することができる。この比較により、選択された標的核酸（すなわち、非標的またはオフターゲット配列）以外の配列に非特異的にハイブリダイズし得るアンチセンス化合物配列を選択することを防ぐことができる。

【0228】

50

活性標的領域内のアンチセンス化合物の（例えば、標的核酸レベルの減少率によって定義されているように）活性の変化があり得る。特定の実施形態において、TMPRSS6 mRNAレベルの減少は、TMPRSS6発現の阻害の指標となる。TMPRSS6タンパク質のレベルの減少は、TMPRSS6発現の阻害の指標にもなる。さらに、表現型の変化は、TMPRSS6発現の阻害の指標となる。例えば、ヘプシジン発現レベルの増加は、TMPRSS6発現の阻害を示すことができる。別の例では、組織中の鉄蓄積の減少は、TMPRSS6発現の阻害を示すことができる。別の例では、トランスフェリンの飽和度の減少は、TMPRSS6発現の阻害を示すことができる。

【0229】

ハイブリダイゼーション

10

いくつかの実施形態において、本明細書に開示するアンチセンス化合物とTMPRSS6核酸との間でハイブリダイゼーションが起こる。最も一般的なハイブリダイゼーションのメカニズムは、核酸分子の相補的核酸塩基間での水素結合形成（例えばワトソン・クリック型、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型水素結合形成）を伴う。

【0230】

ハイブリダイゼーションは、様々な条件下で起こり得る。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、ハイブリダイズさせようとする核酸分子の性質及び組成によって決定する。

【0231】

配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるかどうかを決定する方法は、当該業界において公知である（Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001）。特定の実施形態において、本明細書中に提供するアンチセンス化合物は、TMPRSS6核酸と特異的にハイブリダイズする。

20

【0232】

相補性

アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合することができ、それにより所望の効果（例えばTMPRSS6核酸等の標的核酸のアンチセンス阻害）が生じることになる場合、そのアンチセンス化合物と標的核酸とは互いに相補的である。

30

【0233】

アンチセンス化合物とTMPRSS6核酸との間の非相補的な核酸塩基は、アンチセンス化合物が、依然としてTMPRSS6核酸に特異的にハイブリダイズすることができれば、耐容性を示すことができる。さらにアンチセンス化合物は、介在セグメントまたは隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように、TMPRSS6の1つまたは複数のセグメントにハイブリダイズしてもよい（例えばループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造）。

【0234】

特定の実施形態において、本明細書中に提供するアンチセンス化合物またはその特定部分は、TMPRSS6核酸、その標的領域、標的セグメント、または特定部分に対して、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。標的核酸に対するアンチセンス化合物の相補性パーセントは、常法を使って決定することができる。例えば、アンチセンス化合物の20核酸塩基中18核酸塩基が標的領域に相補的であり、それゆえに特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性を示す。この例では、残りの非相補的核酸塩基はクラスター化してもよいし、残りの非相補的核酸塩基に相補的核酸塩基が散在していてもよく、また、互いに連続している必要も、相補的核酸塩基と連続している必要もない。したがって、標

40

50

的核酸と完全に相補的な2つの領域と隣接する4つの非相補的核酸塩基を有する18核酸塩基長のアンチセンス化合物は、標的核酸に対して77.8%の総相補性を有し、したがって本発明の範囲に包含される。

【0235】

標的核酸の一領域に対するアンチセンス化合物の相補性パーセントは、通常当技術分野において知られているBLASTプログラム(basic local alignment search tool)及びPowerBLASTプログラム(basic local alignment search tool)及びPowerBLASTプログラム(Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)を使用して決定することができる。相同性パーセント、配列同一性パーセントまたは配列相補性パーセントは、例えばSmithとWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)を使用するGapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)により、デフォルト設定を使用して決定することができる。

【0236】

特定の実施形態において、本明細書中に提供するアンチセンス化合物またはその特定部分が、標的核酸またはその特定部分に完全に相補的(すなわち100%相補的)である。例えばアンチセンス化合物は、TMPRSS6核酸、またはその標的領域、またはその標的セグメントもしくは標的配列に完全に相補的であり得る。本明細書で使用される「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と正確に塩基対合できることを意味する。例えば、20核酸塩基アンチセンス化合物は、そのアンチセンス化合物に完全に相補的な標的核酸の対応する20核酸塩基部分が存在する限り、400核酸塩基長の標的配列に対して完全に相補的である。完全に相補的なものもまた、第1及び/または第2核酸の特定部分を参照して使用することもできる。例えば、30核酸塩基アンチセンス化合物の20核酸塩基部分は、400核酸塩基長の標的配列に対して「完全に相補的」であることができる。30核酸塩基オリゴヌクレオチドの20核酸塩基部分は、標的配列が対応する20核酸塩基部分(その各核酸塩基がアンチセンス化合物の該20核酸塩基部分に相補的であるもの)を有する限り、標的配列に対して完全に相補的である。同時に、該30核酸塩基アンチセンス化合物全体は、該アンチセンス化合物の残りの10核酸塩基も標的配列に相補的であるかどうかに応じて、標的配列に対して完全に相補的である場合も、そうでない場合もある。

【0237】

非相補的核酸塩基の場所は、アンチセンス化合物の5'末端または3'末端であることができる。あるいは、非相補的核酸塩基が、アンチセンス化合物の内部位置にあってもよい。2つ以上の非相補的核酸塩基が存在する場合、それらは連続して(すなわち連結されて)いてもよいし、不連続であってもよい。一実施形態において、非相補的核酸塩基が、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドのウイングセグメント内に位置する。

【0238】

特定の実施形態において、12、13、14、15、16、17、18、19、または20核酸塩基長のアンチセンス化合物または最長12、13、14、15、16、17、18、19、または20核酸塩基長のアンチセンス化合物が、TMPRSS6核酸等の標的核酸またはその特定部分と比較して、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つ以下の非相補的核酸塩基(複数可)を含む。

【0239】

特定の実施形態において、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基長のアンチセンス化合物、または最長12、13、14、15、16、17、18、19、20、

21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30 核酸塩基長のアンチセンス化合物が、T M P R S S 6 核酸等の標的核酸またはその特定部分と比較して、6 つ以下、5 つ以下、4 つ以下、3 つ以下、2 つ以下、または1 つ以下の非相補的核酸塩基（複数可）を含む。

【0240】

本明細書に提供するアンチセンス化合物には、標的核酸の一部に相補的なものも含まれる。本明細書で使用される「一部分」とは、標的核酸の一領域または一セグメント内の定義された数の連続する（すなわち連結された）核酸塩基を指す。「一部分」は、アンチセンス化合物の、定義された数の連続する核酸塩基も指し得る。特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも8 核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも12 核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、ある標的セグメントの少なくとも15 核酸塩基部分に相補的である。ある標的セグメントの少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20 核酸塩基部分もしくはそれ以上の核酸塩基部分、またはこれらの値のうちの任意の2 つによって画定される範囲に相補的なアンチセンス化合物も企図される。

10

【0241】

同一性

20

本明細書中に提供するアンチセンス化合物は、ある特定ヌクレオチド配列、配列番号、もしくは具体的な I s i s 番号によって表される化合物、またはその一部分に対して、定義された同一性パーセントも有し得る。本明細書で使用されるアンチセンス化合物は、同じ核酸塩基対合能を有する場合、本明細書に開示する配列と同一である。例えば、ウラシルとチミジンはどちらもアデニンと対合するので、開示した D N A 配列中のチミジンの代わりにウラシルを含有する R N A は、該 D N A 配列と同一であるとみなされるであろう。本明細書に記載するアンチセンス化合物の短縮型及び延長型、ならびに本明細書中に提供するアンチセンス化合物と比較して非同一塩基を有する化合物も企図される。非同一塩基は互いに隣接してもよいし、アンチセンス化合物全体に散在していてもよい。アンチセンス化合物のパーセント同一性は、比較対象である配列と比較して同一塩基対合を有する塩基の数に従って計算される。

30

【0242】

特定の実施形態において、アンチセンス化合物またはその一部分が、本明細書に開示するアンチセンス化合物もしくは配列番号、またはその一部分の1 つまたは複数と、少なくとも70 %、少なくとも75 %、少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、少なくとも99 %または100 % 同一である。

【0243】

修飾

40

ヌクレオシドは塩基 - 糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基としても知られる）部分は、通常、複素環式塩基部分である。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合は、リン酸基を、糖の2'、3'または5' ヒドロキシル部分に連結することができる。隣接するヌクレオシドを共有結合で互いに連結してオリゴヌクレオチド形成することにより、線状ポリマー状のオリゴヌクレオチドを形成する。一般に、オリゴヌクレオチド構造内では、リン酸基は、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結部を形成しているとみなされている。

【0244】

アンチセンス化合物の修飾には、ヌクレオシド間連結部、糖部分、または核酸塩基の置換または改変が包含される。修飾アンチセンス化合物は、例えば、強化された細胞取り込

50

み、核酸標的に対する強化された親和性、ヌクレアーゼの存在下での増加した安定性、増加した阻害活性といった望ましい性質ゆえに、ネイティブ型より好ましいことが多い。

【0245】

化学修飾ヌクレオシドは、短縮型または切断型アンチセンスオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結合親和性を増加させるために使用することもできる。結果として、そのような化学修飾ヌクレオシドを有する短いアンチセンス化合物で、匹敵する結果を得ることができる場合が多い。

【0246】

修飾ヌクレオシド間結合

RNA及びDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結部は、3'～5'ホスホジエステル連結部である。1つまたは複数の修飾（すなわち天然に存在しない）ヌクレオシド間連結部を有するアンチセンス化合物は、例えば、強化された細胞取り込み、核酸標的に対する強化された親和性、及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性等といった望ましい性質ゆえに、天然に存在するヌクレオシド間連結部を有するアンチセンス化合物よりも選択されることが多い。

【0247】

修飾ヌクレオシド間連結部を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子が保持されているヌクレオシド間連結部と、リン原子を有さないヌクレオシド間連結部とが含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間連結部には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、及びホスホロチオエートが含まれるが、これらに限定されない。リン含有連結部及び非リン含有連結部を調製する方法は、周知である。

【0248】

特定の実施形態において、TMPRSS6核酸を標的とするアンチセンス化合物が、1つまたは複数の修飾ヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態において、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部がホスホロチオエート連結部である。特定の実施形態において、アンチセンス化合物の各ヌクレオシド間連結部がホスホロチオエートヌクレオシド間連結部である。

【0249】

修飾糖部分

本発明のアンチセンス化合物は、場合によっては、糖基が修飾されているヌクレオシドを1つまたは複数含有し得る。そのような糖修飾ヌクレオシドは、強化されたヌクレアーゼ安定性、増加した結合親和性、または他の何らかの有益な生物学的性質を、アンチセンス化合物に付与し得る。特定の実施形態において、ヌクレオシドが化学修飾リボフラノース環部分を含む。化学修飾リボフラノース環の例には、置換基の付加（5'置換基、2'置換基、非ジェミナル環原子の架橋による二環式核酸（BNA）の形成、S、N(R)、またはC(R₁)(R₂)(R、R₁及びR₂は、それぞれ独立してH、C₁-C₁₂アルキルまたは保護基である)によるリボシル環酸素原子の置き換え、及びそれらの組み合わせ等があるが、これらに限定されない。化学修飾糖の例としては、2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド（開示されている他の5'、2'-ビス置換ヌクレオシドについては、PCT国際出願WO2008/101157（公開日2008年8月21日）を参照されたい）、またはSによるリボシル環酸素原子の置き換え及び2'位におけるさらなる置換（米国特許出願公開US2005-0130923（公開日2005年6月16日）参照）、あるいはBNAの5'-置換（PCT国際出願WO2007/134181（公開日2007年11月22日）参照、この場合はLNAが例えば5'-メチル基または5'-ビニル基で置換されている）等がある。

【0250】

修飾された糖部分を有するヌクレオシドの例として、限定されることなく、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル

、 $O-C_1-C_{10}$ アルキル、 OCF_3 、 OCH_2F 、 $O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 、 $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ 、及び $O-CH_2-C(=O)-N(R_1)-(CH_2)_2-N(R_m)(R_n)$ から選択することができ、 R_1 、 R_m 及び R_n はそれぞれ独立して、 H または置換もしくは非置換 C_1-C_{10} アルキルである。

【0251】

本明細書で使用される「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式ヌクレオシド(BNA)の例には、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子の間に架橋を含むヌクレオシド等があるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書で提供されるアンチセンス化合物は、1つまたは複数のBNAヌクレオシドを含み、ここで、架橋は以下の式の1つを含む：4'-(CH_2)-O-2'(LNA)；4'-(CH_2)-S-2'；4'-(CH_2)₂-O-2'(ENA)；4'-CH(CH_3)-O-2'(cet)及び4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'(及びその類似体、2008年7月15日に出願された米国特許第7,399,845号を参照のこと)；4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2'(及びその類似体、2009年1月8日に公開されたWO/2009/006478として公開されたPCT/US2008/068922を参照のこと)；4'-CH₂-N(OCH_3)-2'(及びその類似体、2008年12月11日に公開されたWO/2008/150729として公開されたPCT/US2008/064591を参照のこと)；4'-CH₂-O-N(CH_3)-2'(2004年9月2日に公開された米国特許第US2004-0171570を参照のこと)；4'-CH₂-N(R)-O-2'、ここでRは、 H 、 C_1-C_{12} アルキルまたは保護基であり(2008年9月23日に公開された米国特許第7,427,672号を参照のこと)；4'-CH₂-C(H)(CH_3)-2'(Zhou et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照のこと)；及び4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及びその類似体、2008年12月8日に公開されたWO 2008/154401として公表されたPCT/US2008/066154を参照のこと)。

【0252】

さらに二環式ヌクレオシドは、公開された文献に報告されている(例えば、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379、Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 31, 6365-6372、Elayadi et al., Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561、Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7、Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243、Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638、Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630、Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222、Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039、米国特許第7,399,845号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第6,794,499号、同第6,770,748号、同第6,670,461号、同第6,525,191号、同第6,268,490号、米国特許出願公開第US2008-0039618号、同第US2007-0287831号、同第US2004-0171570号、米国特許出願第12/129,154号、同第61/099,844号、同第61/097,787号、同第61/086,231号、同第61/056,564号、同第61/026,998号、同第61/026,995号、同第60/989,574号、国際出願第WO2007/134181号、同第WO2005/021570号、同第WO2004/106356号、同第WO99/

10

20

30

40

50

14226号、ならびにPCT国際出願第PCT/US2008/068922号、同第PCT/US2008/066154号、及び同第PCT/US2008/064591号を参照されたい)。例えば -L-リボフラノース及び -D-リボフラノース等の1つまたは複数の立体化学的糖配置を有する前述の二環式ヌクレオシドのそれぞれを調製することができる(PCT国際出願PCT/DK98/00393(1999年3月25日に公開されたWO99/14226)を参照されたい)。

【0253】

本明細書で使用される「単環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分ではない修飾糖部分を含むヌクレオシドを指す。特定の実施形態において、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体が、任意の位置で修飾または置換されていてもよい。

10

【0254】

本明細書で使用される「4'-2'二環式ヌクレオシド」または「4' 2'二環式ヌクレオシド」とは、フラノース環の2つの炭素原子をつなぐ架橋を含むフラノース環を含み、該橋が糖環の2'炭素原子と4'炭素原子をつなぐ、二環式ヌクレオシドを指す。

【0255】

特定の実施形態では、BNAヌクレオシドの二環式糖部分として、限定されないが、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-C(R_a)=C(R_b)-$ 、 $-C(R_a)=N-$ 、 $-C(=NR_a)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_a)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 、及び $-N(R_a)-$ であり、ここで、 x は0、1、または2であり； n は、1、2、3または4であり； R_a 及び R_b はそれぞれ独立して、H、保護基、ヒドロキシル、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 C_5-C_7 脂環式ラジカル、置換 C_5-C_7 脂環式ラジカル、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、 CN 、スルホニル($S(=O)_2-J_1$)、またはスルホキシル($S(=O)-J_1$)から独立して選択される1または1~4個の結合基を含む、架橋を限定されることなく含むペントフラノシル糖部分の4'炭素原子と2'炭素原子との間の少なくとも1つの架橋を有する化合物が挙げられる。

20

【0256】

J_1 及び J_2 はそれぞれ独立して、H、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、複素環ラジカル、置換複素環ラジカル、 C_1-C_{12} アミノアルキル、置換 C_1-C_{12} アミノアルキルまたは保護基である。

30

【0257】

特定の実施形態において、二環式糖部分の架橋は、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[CR_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ または $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ である。特定の実施形態では、架橋は、4'- CH_2-2' 、4'-(CH_2)₂-2'、4'-(CH_2)₃-2'、4'- CH_2-O-2' 、4'-(CH_2)₂-O-2'、4'- $CH_2-O-N(R)-2'$ 及び4'- $CH_2-N(R)-O-2'$ であり、 R はそれぞれ独立して、H、保護基または C_1-C_{12} アルキルである。

40

【0258】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは、異性体構成によってさらに定義される。例えば、4'-(CH_2)-O-2'架橋を含むヌクレオシドは、-L配置または-D配置で有り得る。従来、-L-メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')BNAは、以前に、アンチセンスオリゴヌクレオチドに組み込まれており、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドはアンチセンス活性を示した(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

50

【0259】

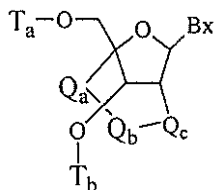
特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドは、4' ~ 2' 架橋を有するヌクレオチドであり、ここで、当該架橋として、限定されないが、 $-L-4'-(CH_2)-O-2'$ 、 $-D-4'-CH_2-O-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-O-2'$ 、 $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ 、 $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ 、 $4'-CH(CH_3)-O-2'$ 、 $4'-CH_2-S-2'$ 、 $4'-CH_2-N(R)-2'$ 、 $4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$ 、及び $4'-(CH_2)_3-2'$ であり、ここで R は H、保護基または C_1-C_{12} アルキルが挙げられる。

【0260】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

10

【化11】



式中、

Bx が、複素環式塩基部分であり、

$-Q_a-Q_b-Q_c-$ は、 $-CH_2-N(R_c)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-N(R_c)-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-N(R_c)-$ 、 $-CH_2-N(R_c)-O-$ または $-N(R_c)-O-CH_2$ であり、

20

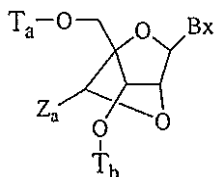
R_c は C_1-C_{12} アルキルまたはアミノ保護基であり、かつ

T_a 及び T_b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合である。

【0261】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

【化12】



30

式中、

Bx が、複素環式塩基部分であり、

T_a 及び T_b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合であり、

Z_a は、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_2-C_6 アルキニル、置換 C_1-C_6 アルキル、置換 C_2-C_6 アルケニル、置換 C_2-C_6 アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオールまたは置換チオールである。

40

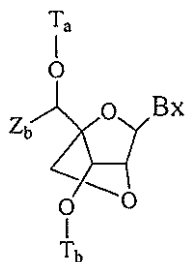
【0262】

一実施形態では、置換基は、それぞれ独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、 OJ_c 、 NJ_cJ_d 、 SJ_c 、 N_3 、 $OC(=X)J_c$ 、及び $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$ であり、ここで、 J_c 、 J_d 及び J_e はそれぞれ独立して、H、 C_1-C_6 アルキル、または置換 C_1-C_6 アルキルであり、X は O または NJ_c である。

【0263】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

【化 1 3】



式中、

B x が、複素環式塩基部分であり、

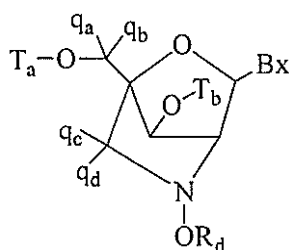
T a 及び T b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合であり、

Z b は、C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル、または置換アシル (C (=O) -) である。

【 0 2 6 4】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

【化 1 4】



式中、

B x が、複素環式塩基部分であり、

T a 及び T b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合であり、

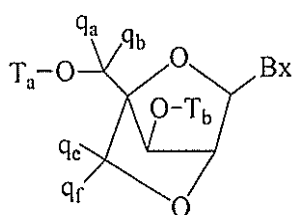
R d は、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、または置換 C₂ - C₆ アルキニルであり、

q a、q b、q c 及び q d はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル、C₁ - C₆ アルコキシル、置換 C₁ - C₆ アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁ - C₆ アミノアルキルまたは置換 C₁ - C₆ アミノアルキルである。

【 0 2 6 5】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

【化 1 5】



式中、

B x が、複素環式塩基部分であり、

T a 及び T b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基

10

20

30

40

50

、リン部分または支持媒体への共有結合であり、

q_a 、 q_b 、 q_e 及び q_f はそれぞれ独立して、水素、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシ、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ または $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ であり、

または q_e 及び q_f は共に $=C(q_g)(q_h)$ であり、

q_g 及び q_h はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、または置換 $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

10

【0266】

オリゴマー化及び核酸認識特性と共に、4'- CH_2-O-2' 架橋を有するアデニン、シトシン、グアニン、5-メチル-シトシン、チミン及びウラシル二環式ヌクレオシドの合成及び調製が記載されている (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。二環式ヌクレオシドの合成はまた、WO 98/39352 号及び WO 99/14226 号に記載されている。

【0267】

4'- CH_2-O-2' 及び 4'- CH_2-S-2' のような 4' から 2' への架橋基を有する種々の二環式ヌクレオシドの類似体も調製されている (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼの基質として使用するための二環式ヌクレオシドを含むオリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖の調製も説明されている (Wengel et al., WO 99/14226)。さらに、新規の構造的に制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である 2'-アミノ-BNAの合成は、当該技術分野において説明されている (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。加えて、2'-アミノ-及び2'-メチルアミノ-BNAも調製されており、相補的なRNA鎖及び相補的DNA鎖を有するそれらの二重鎖の熱安定性が、以前に報告されている。

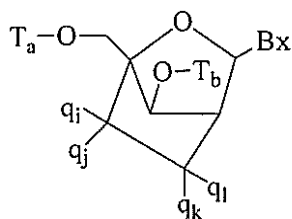
20

【0268】

特定の実施形態において、二環式ヌクレオシドは以下の式を有する。

30

【化16】



式中、

Bx が、複素環式塩基部分であり、

40

T_a 及び T_b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応性リン基、リン部分または支持媒体への共有結合であり、

q_i 、 q_j 、 q_k 及び q_l はそれぞれ独立して、水素、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換 $C_1 - C_{12}$ アルキル、 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルケニル、 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、置換 $C_2 - C_{12}$ アルキニル、 $C_1 - C_{12}$ アルコキシル、置換 $C_1 - C_{12}$ アルコキシル、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ または $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ であり、

q_i 及び q_j または q_l 及び q_k は一緒に $=C(q_g)(q_h)$ であり、ここで、 q_g

50

及び q_h はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、 $C_1 - C_{12}$ アルキルまたは置換 $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

【0269】

4' - $(CH_2)_3$ - 2' 架橋及びアルケニル類似体架橋 4' - $CH=CH-CH_2-$ 2' を有する1つの炭素環式二環式ヌクレオシドが説明されている (Frier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429 - 4443、及び Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731 - 7740)。炭素環式二環式ヌクレオシドの合成及び調製も、それらのオリゴマー化及び生化学的研究と共に説明されている (Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362 - 8379)。

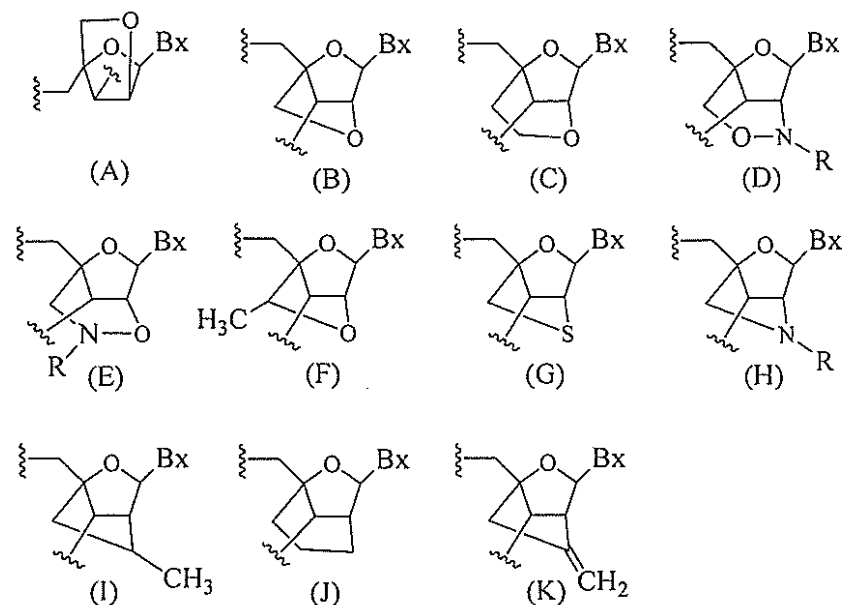
10

【0270】

特定の実施形態において、以下に示すように、二環式ヌクレオシドとして、(A) - L - メチレンオキシ (4' - CH_2-O-2') BNA、(B) - D - メチレンオキシ (4' - CH_2-O-2') BNA、(C) エチレンオキシ (4' - $(CH_2)_2-O-2'$) BNA、(D) アミノオキシ (4' - $CH_2-O-N(R)-2'$) BNA、(E) オキシアミノ (4' - $CH_2-N(R)-O-2'$) BNA、(F) メチル (メチレンオキシ) (4' - $CH(CH_3)-O-2'$) BNA、(拘束エチルまたは cEt と呼ばれる)、(G) メチレン - チオ (4' - CH_2-S-2') BNA、(H) メチレン - アミノ (4' - $CH_2-N(R)-2'$) BNA、(I) メチル炭素環 (4' - $CH_2-CH(CH_3)-2'$) BNA、(J) プロピレン炭素環 (4' - $(CH_2)_3-2'$) BNA、及び (K) ビニル BNA が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【化17】



30

式中、Bx は塩基部分であり、R は独立して、H、保護基、 $C_1 - C_6$ アルキルまたは $C_1 - C_6$ アルコキシである。

40

【0271】

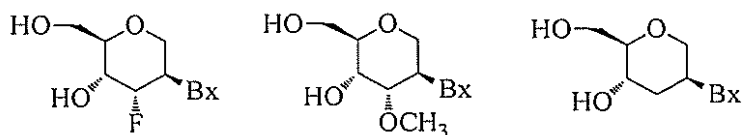
本明細書で使用する「修飾テトラヒドロピランヌクレオシド」または「修飾THPヌクレオシド」という用語は、通常のヌクレオシド中のペントフラノシル残基の代わりに六員テトラヒドロピラン「糖」が使用されているヌクレオシドを意味し、糖代用物と呼ばれる場合もある。

修飾THPヌクレオシドには、当技術分野においてヘキシトール核酸 (HNA)、アニトール (anitol) 核酸 (ANA)、マニトール (manitol) 核酸 (MNA) (Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841 - 854 を参照されたい) またはフルオロHNA (F-HNA) と呼ばれる、以下に示すテトラヒ

50

ドロピラン環系を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

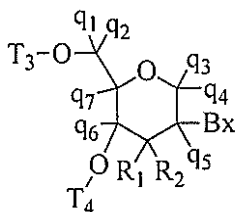
【化 1 8】



【0 2 7 2】

特定の実施形態において、以下の式を有する糖代用物が選択される。

【化 1 9】



10

式中、

B x が、複素環式塩基部分であり、

T₃ 及び T₄ はそれぞれ、独立して、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をオリゴマー化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、または T₃ 及び T₄ のうちの 1 つは 20
テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をオリゴマー化合物またはオリゴヌクレオチドに連結するヌクレオシド間連結基であり、T₃ 及び T₄ の他方は、H、ヒドロキシル保護基、連結共役基または 5' もしくは 3' 末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆ 及び q₇ はそれぞれ独立して、H、C₁ - C₆ アルキル、置換 C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニルまたは置換 C₂ - C₆ アルキニルであり、

R₁ 及び R₂ の 1 つは水素であり、他方は、ハロゲン、置換または非置換アルコキシ、N J₁ J₂、S J₁、N₃、O C (= X) J₁、O C (= X) N J₁ J₂、N J₃ C (= X) N J₁ J₂ 及び C N であり、ここで X は、O、S または N J₁ であり、J₁、J₂ 及び J₃ はそれぞれ独立して、H または C₁ - C₆ アルキルである。 30

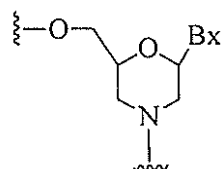
【0 2 7 3】

特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆ 及び q₇ はそれぞれ H である。特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆ 及び q₇ の少なくとも 1 つは、H 以外である。特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆ 及び q₇ の少なくとも 1 つは、メチルである。特定の実施形態では、T H P ヌクレオシドを提供し、ここで、R₁ 及び R₂ の 1 つは F である。特定の実施形態では、R₁ はフルオロであり、R₂ は H であり、R₁ はメトキシであり、R₂ は H であり、R₁ はメトキシエトキシであり、R₂ は H である。

【0 2 7 4】

特定の実施形態において、糖代用物が、5 超の原子及び 1 超のヘテロ原子を有する環を含む。例えば、モルホリノ糖部分を含むヌクレオシド、及びオリゴマー化合物におけるこれらの使用が説明されている（例えば B r a a s c h e t a l . , B i o c h e m i s t r y , 2 0 0 2 , 4 1 , 4 5 0 3 - 4 5 1 0、ならびに及び米国特許第 5 , 6 9 8 , 6 8 5 号、同第 5 , 1 6 6 , 3 1 5 号、同第 5 , 1 8 5 , 4 4 4 号、及び同第 5 , 0 3 4 , 5 0 6 号を参照されたい）。本明細書で使用する「モルホリノ」という用語は、以下の式を有する糖代用物を意味する。 40

【化 20】



【0275】

特定の実施形態において、例えば、上記モルホリノ構造の様々な置換基を付加するか改変することによって、モルホリノが修飾されていてもよい。そのような糖代用物を本明細書では「修飾モルホリノ」と称される。

10

【0276】

2'-F-5'-メチル置換ヌクレオシド（他の開示された5', 2'-ビス置換ヌクレオシドについては、2008年8月21日に公開されたPCT国際出願第WO2008/101157号を参照のこと）、ならびにリボシル環酸素原子のSでの置換及び2'位でのさらなる置換（2005年6月16日に公開された米国特許出願第US2005-0130923号を参照のこと）、または代替として二環式核酸の5'-置換（4'-CH₂-O-2'二環式ヌクレオシドが5'位で5'-メチルまたは5'-ビニル基でさらに置換される、2007年11月22日に公開されたPCT国際出願第WO2007/134181号を参照のこと）等であるが、これらに限定されない修飾の組み合わせも提供される。炭素環式二環式ヌクレオシドの合成及び調製も、それらのオリゴマー化及び生化学的研究と共に説明されている（Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129(26), 8362-8379を参照のこと）。

20

【0277】

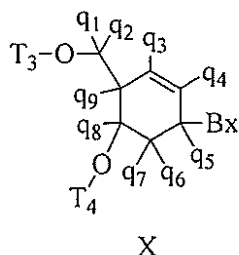
特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、天然に存在するヌクレオシド中のペントフラノシル残基の代わりに六員シクロヘキセニルを有するヌクレオシドである修飾シクロヘキセニルヌクレオシドを1つまたは複数含む。修飾シクロヘキセニルヌクレオシドとして、当該技術分野において説明されているものが挙げられるが、これらに限定されない（例えば、権利者が共通である、2010年4月10日公開の公開PCT出願WO2010/036696号、Robeyns et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(6), 1979-1984、; Horvath et al., Tetrahedron Letters, 2007, 48, 3621-3623、Nauwelaerts et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(30), 9340-9348、Gu et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2005, 24(5-7), 993-998、Nauwelaerts et al., Nucleic Acids Research, 2005, 33(8), 2452-2463、Robeyns et al., Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2005, F61(6), 585-586、Gu et al., Tetrahedron, 2004, 60(9), 2111-2123、Gu et al., Oligonucleotides, 2003, 13(6), 479-489、Wang et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 4499-4505、Verbeure et al., Nucleic Acids Research, 2001, 29(24), 4941-4947、Wang et al., J. Org. Chem., 2001, 66, 8478-82、Wang et al., Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20(4-7), 785-788、Wang et al., J. Am. Chem., 2000, 122, 8595-8602、公開PCT出願WO06/047842号及び公開PCT出願WO01/049687号、また、各文献の本文は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。特定の修飾シクロヘキセニルヌクレオシドは式Xを有する。

30

40

50

【化 2 1】



式中、該少なくとも1つの式Xのシクロヘキセニルヌクレオシド類似体のそれぞれについて、独立して、

Bxが、複素環式塩基部分であり、

T₃及びT₄はそれぞれ、独立して、シクロヘキセニルヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、またはT₃及びT₄のうちの1つはテトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であり、T₃及びT₄の他方は、H、ヒドロキシル保護基、連結共役基または5'もしくは3'末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、q₇、q₈、及びq₉はそれぞれ独立して、H、C₁-C₆アルキル、置換C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニルまたは置換C₂-C₆アルキニルまたはその他の糖置換基である。

【0278】

多くの他の単環式、二環式及び三環式環系が当該分野で公知であり、本明細書で提供されるようなオリゴマー化合物への取り込みのためにヌクレオシドを修飾するために使用され得る糖代用物として適切である（例えば、総説については、Leumann, Christian J. Bioorg. & Med. Chem., 2002, 10, 841-854を参照されたい）。そのような環系は、それらの活性をさらに増強するために様々な追加の置換を受けてもよい。

【0279】

本明細書で使用される「2'-修飾糖」とは、2'位で修飾されたフラノシル糖を意味する。特定の実施形態において、そのような修飾が、ハライド、例えば、限定するわけではないが、置換及び無置換アルコキシ、置換及び無置換チオアルキル、置換及び無置換アミノアルキル、置換及び無置換アルキル、置換及び無置換アリル、ならびに置換及び無置換アルキニルから選択される置換基を含む。特定の実施形態では、2'修飾は、限定されないが、O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nF、O(CH₂)_nONH₂、OCH₂C(=O)N(H)CH₃、及びO(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂を含む置換基から選択され、ここでn及びmは1～約10である。他の2'-置換基は、C₁-C₁₂アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリルまたはO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、F、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロアルキル、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、アンチセンス化合物の薬物動態特性を改良するための基または薬力学的性質を改良するための基、及び類似する性質を有する他の置換基から選択することもできる。特定の実施形態において、修飾ヌクレオシドが2'-MOE側鎖を含む(Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000)。そのような2'-MOE置換は、非修飾ヌクレオシド、ならびに他の修飾ヌクレオシド、例えば2'-O-メチル、O-プロピル、及びO-アミノプロピルと比較して、改良された結合親和性を有するものであると説明されている。2'-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドは、in vivo用途に有

望な特徴を持つ遺伝子発現のアンチセンス阻害剤であることも示されている (Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; and Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

【0280】

本明細書で使用される「2'-修飾」または「2'-置換」は、2'位にHまたはOH以外の置換基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。2'-修飾ヌクレオシドとして、限定されないが、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀アルキル、-OCF₃、O-(CH₂)₂-O-CH₃、2'-O(CH₂)₂SCH₃、O-(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、またはO-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)等の非架橋2'置換基を有するヌクレオシドが挙げられ、ここで、R_m及びR_nはそれぞれ独立して、Hまたは置換もしくは非置換C₁-C₁₀アルキルである。2'-修飾ヌクレオシドは、例えば糖の他の位置及び/または核酸塩基に、他の修飾をさらに含んでもよい。

10

【0281】

本明細書で使用される「2'-F」とは、糖環の2'位にフルオロ基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0282】

20

本明細書で使用される「2'-OMe」または「2'-OCH₃」または「2'-O-メチル」または「2'-メトキシ」とは、それぞれ、糖環の2'位に-OCH₃基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0283】

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

【0284】

修飾糖の調製方法は、当業者に公知である。修飾糖の調製方法は、当業者に公知である。そのような修飾糖の調製を教示する代表的な米国特許の一部には、例えば、限定するわけではないが、同4,981,957号、同5,118,800号、同5,319,080号、同5,359,044号、同5,393,878号、同5,446,137号、同5,466,786号、同5,514,785号、同5,519,134号、同5,567,811号、同5,576,427号、同5,591,722号、同5,597,909号、同5,610,300号、同5,627,053号、同5,639,873号、同5,646,265号、同5,670,633号、同5,700,920号、同5,792,847号及び同6,600,032号、ならびに国際出願PCT/US2005/019219(出願日2005年6月2日)(2005年12月22日に公開されたWO2005/121371)等があり、これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0285】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」とは、複数の連結されたヌクレオシドを含む化合物を指す。特定の実施形態において、該複数のヌクレオシドのうちの1つまたは複数の修飾されている。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドが、1つまたは複数のリボヌクレオシド(RNA)及び/またはデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

【0286】

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

【0287】

50

特定の実施形態において、アンチセンス化合物が、修飾糖部分を有する1つまたは複数のヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、修飾糖部分が2'-MOEである。特定の実施形態において、2'-MOE修飾ヌクレオシドがギャップマーモチーフで配置される。特定の実施形態において、修飾糖部分が、(4'-CH(CH₃))-O-2')架橋基を有する二環式ヌクレオシドである。特定の実施形態において、該(4'-CH(CH₃))-O-2')修飾ヌクレオシドが、ギャップマーモチーフのウイング全体にわたって配置される。

【0288】

修飾核酸塩基

核酸塩基(または塩基)の修飾または置換は、天然に存在するまたは合成的に修飾されていない核酸塩基と構造的に区別可能であるが、さらに機能的に交換可能である。天然及び修飾核酸塩基の両方は、水素結合に関与することができる。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、または他の有益な生物学的特性をアンチセンス化合物に付与し得る。修飾核酸塩基は、例えば、5-メチルシトシン(5-me-C)のような合成及び天然核酸塩基を含む。5メチル-シトシン置換を含む特定の核酸塩基置換は、標的核酸に対するアンチセンス化合物の結合親和性を増加させるのに特に有用である。例えば、5メチル-シトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2増加させることが示されている(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

【0289】

追加の非修飾核酸塩基としては、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル-C(C-CH₃)ウラシル及びピリミジン塩基のシトシン及び他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(プソイドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンが挙げられる。

【0290】

複素環式塩基部分は、プリンまたはピリミジン塩基が、他の複素環、例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、及び2-ピリドンに置換されるものも含まれ得る。アンチセンス化合物の結合親和性を増加させるのに特に有用な核酸塩基は、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含む5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及びO-6置換プリンを含む。

【0291】

特定の実施形態において、TMPPSS6核酸を標的とするアンチセンス化合物が、1つまたは複数の修飾核酸塩基を含む。特定の実施形態において、TMPPSS6核酸を標的とするギャップ拡大アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾核酸塩基を含む。特定の実施形態において、修飾核酸塩基の少なくとも1つは、5-メチルシトシンである。特定の実施形態において、各シトシンは5メチル-シトシンである。

【0292】

医薬組成物を処方するための組成物及び方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物または製剤の調製のために、薬学的に

10

20

30

40

50

許容される活性物質または不活性物質と混合することができる。組成物及び医薬組成物を製剤化するための方法は、投与経路、疾患の程度、または投与される用量を含むが、これらに限定されないいくつかの基準に依存する。

【0293】

TMPRSS6 核酸を標的とするアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物を適切な薬学的に許容される希釈剤または担体と組み合わせることによって、医薬組成物に利用することができる。薬学的に許容される希釈剤は水、例えば、注射用水(WFI)を含む。薬学的に許容される希釈剤は、生理食塩水、例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)を含む。水または生理食塩水は、非経口で送達される組成物における使用に適した希釈剤である。したがって、一実施形態において、本明細書に記載の方法で使用されるのは、TMPRSS6 核酸を標的とするアンチセンス化合物及び薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物である。特定の実施形態において、薬学的に許容される希釈剤は水または生理食塩水である。特定の実施形態において、アンチセンス化合物はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

10

【0294】

アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、ヒトを含む動物への投与時に、生物学的に活性な代謝産物またはその残基を(直接的または間接的に)提供することができる、そのようなエステルの任意の薬学的に許容される塩、エステルもしくはそのようなエステルの塩、または他のオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、例えば、本開示は、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、そのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、及び他の生物学的等価物を対象とする。好適な薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩及びカリウム塩が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0295】

本明細書に記載の化合物の薬学的に許容可能な塩は、当該技術分野において周知の方法によって調製することができる。薬学的に許容可能な塩の総説については、Stahl and Wermuth、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)を参照されたい。アンチセンスオリゴヌクレオチドのナトリウム塩が有用であり、ヒトへの治療的投与のために十分に許容されている。したがって、一実施形態において、本明細書に記載の化合物は、ナトリウム塩の形態である。

30

【0296】

プロドラッグは、体内で内因性ヌクレアーゼによって切断されて活性アンチセンス化合物を形成するアンチセンス化合物の一方または両方の末端におけるさらなるヌクレオシドの組み込みを含み得る。

【0297】

投薬

特定の実施形態において、医薬組成物は、所望の効果を達成するために投薬レジメンを選択することができる投薬レジメン(例えば、用量、投与頻度及び期間)に従って投与される。所望の効果は、例えばTMPRSS6の減少、またはTMPRSS6に関連する疾患または状態の予防、軽減、改善またはその進行の遅延であり得る。

40

【0298】

特定の実施形態において、投薬レジメンの変数は、対象において所望の濃度の医薬組成物をもたらすように調整される。投与レジメンに関して使用される「濃度の医薬組成物」は、医薬組成物の化合物、オリゴヌクレオチド、または活性成分を指すことができる。例えば、特定の実施形態において、用量及び投与頻度は、所望の効果を達成するのに十分な量で医薬組成物の組織濃度または血漿濃度を提供するように調整される。

【0299】

投薬は、処置される病態の重症度及び応答性に依存し、一連の治療は数日～数ヵ月間、または治癒が達成されるまで、または病態の減少が達成されるまで継続する。投薬は薬物

50

の効力及び代謝にも依存する。特定の実施形態において、投薬量は、体重 1 kg あたり 0 . 0 1 μ g ~ 1 0 0 mg、または 0 . 0 0 1 mg ~ 1 0 0 0 mg の投薬の範囲内であり、毎日、毎週、隔週、毎月、四半期、半年もしくは毎年 1 回以上、または 2 ~ 2 0 年に 1 回投与してもよい。治療が成功した後、病態の再発を防止するために患者は維持療法を受けることが望ましく、この場合、オリゴヌクレオチドは、1 日 1 回以上 ~ 2 0 年に 1 回、体重 1 kg 当たり 0 . 0 1 μ g ~ 1 0 0 mg の維持用量の範囲で、または 0 . 0 0 1 mg ~ 1 0 0 0 mg の範囲で投与される。

【0300】

投与

本発明の化合物または医薬組成物は、局所的または全身的治療が所望されるかどうか、及び治療される領域に応じて、多くの方法で投与することができる。吸収（すなわち肺）、経腸（すなわち腸）、非経口または局所で投与を行うことができる。

10

【0301】

特定の実施形態において、本明細書に記載の化合物及び組成物は、非経口的に投与される。非経口投与として、限定されないが、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、頭蓋内、くも膜下腔内、髄内、脳室内または腫瘍内投与または注入が挙げられる。非経口投与として、鼻腔内投与も含む。

【0302】

特定の実施形態において、非経口投与は輸液によるものである。輸液は、長期輸液、または、連続輸液、または短期輸液、または間欠輸液であり得る。特定の実施形態において、注入された医薬品はポンプで送達される。

20

【0303】

特定の実施形態において、非経口投与は注射によるものである。注入物は注射器またはポンプで送達することができる。特定の実施形態において、注射はボーラス注射である。特定の実施形態において、注射は、組織または器官に直接投与される。

【0304】

特定の実施形態において、非経口投与のための剤形は、緩衝剤、希釈剤、ならびに浸透増強剤、担体化合物及び他の薬学的に許容される担体または賦形剤を含むがこれらに限定されない、他の好適な添加剤をさらに含有する無菌水溶液を含んでもよい。

【0305】

特定の実施形態において、本明細書に記載の化合物及び組成物は、経腸的に投与される。経腸投与として、限定されないが、経口、経粘膜的、腸管または直腸（例えば、座薬、浣腸）が挙げられる。特定の実施形態では、化合物または組成物の経腸投与のための製剤として、限定されないが、薬学的担体、賦形剤、粉末剤または粒剤、ナノ微粒子、水中の懸濁液または溶液または非水性培地、カプセル、ゲルカプセル、サッシェ剤、タブレットまたはミニタブレットを挙げることができる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、または結合剤が所望され得る。特定の実施形態において、経腸製剤は、本発明で提供する化合物が 1 種以上の浸透増強剤、界面活性剤及びキレート剤と共に投与されるものである。

30

【0306】

特定の実施形態では、投与は、肺投与を含む。特定の実施形態では、肺投与は、吸入によって、対象の肺に、エアゾール化されたオリゴヌクレオチドを送達することを含む。対象がエアゾール化されたオリゴヌクレオチドを吸収した後に、オリゴヌクレオチドは、肺胞マクロファージ、好酸球、上皮、血管内皮及び細気管支内皮を含む正常肺組織及び炎症を起こした組織の両方の細胞に分布する。修飾オリゴヌクレオチドを含む医薬組成物の送達に適した機器として、限定されないが、標準噴霧器が挙げられる。追加の適切な機器として、ドライパウダー吸入器または定量噴霧式吸入器が挙げられる。

40

【0307】

特定の実施形態では、医薬組成物は、全身暴露より局所曝露を達成するために投与される。例えば、肺投与は、最小の全身暴露で、肺に医薬組成物を送達する。

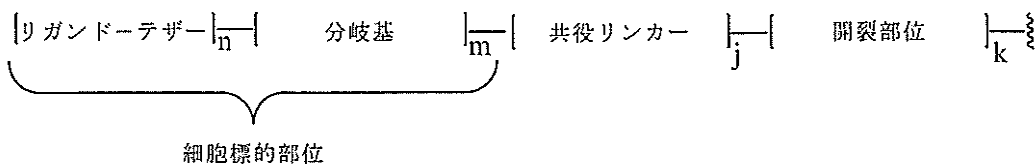
50

【0308】

共役アンチセンス化合物

特定の実施形態では、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物は、1つまたは複数の共役基の共有結合によって改変される。一般に、共役基は、限定されないが、薬力学、薬物動態、安定性、結合、吸収、細胞分布、細胞取込、負荷、及びクリアランスを含む結合したオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物の1つまたは複数の特性を改変する。本明細書で使用されるとき、「共役基」は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に結合する原子の基を含むラジカル基を意味する。一般に、共役基は、限定されないが、薬力学、薬物動態、安定性、結合、吸収、細胞分布、細胞取込、負荷、及び/またはクリアランス特性を含む結合する化合物の1つまたは複数の特性を改変する。共役基は、化学分野で通常、使用され、共役基をオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に共有結合させる共役リンカーを含むことができる。特定の実施形態では、共役基は、共役基をオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に共有結合させる切断可能な部分を含む。特定の実施形態では、共役基は、共役基をオリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に共有結合させる共役リンカー及び開裂部位を含む。特定の実施形態において、共役基は、以下の式を有する。

【化22】



ここで、nは、1～約3であり、nが1のときmは0であるか、またはnが2もしくは3であるときmは1であり、jは1もしくは0であり、kは1もしくは0であり、jとkの合計は少なくとも1である。

【0309】

特定の実施形態では、nが1であり、jが1であり、kが0である。特定の実施形態では、nが1であり、jが0であり、kが1である。特定の実施形態では、nが1であり、jが1であり、kが1である。特定の実施形態では、nが2であり、jが1であり、kが0である。特定の実施形態では、nが2であり、jが0であり、kが1である。特定の実施形態では、nが2であり、jが1であり、kが1である。特定の実施形態では、nが3であり、jが1であり、kが0である。特定の実施形態では、nが3であり、jが0であり、kが1である。特定の実施形態では、nが3であり、jが1であり、kが1である。

【0310】

共役基は、ラジカルとして本明細書で示され、オリゴヌクレオチド等のオリゴマー化合物と共有結合を形成するための結合を提供する。特定の実施形態では、オリゴマー化合物の結合点は、3'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、オリゴマー化合物の結合点は、3'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドの3'-ヒドロキシル基の3'-酸素原子である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物の結合点は、5'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、オリゴマー化合物の結合点は、5'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基の5'-酸素原子である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物の結合点は、ヌクレオシドの任意の反応部位、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオシド間結合である。

【0311】

本明細書で使用するとき、「開裂部位」及び「開裂結合」は、特定の生理学的条件下で、分裂または開裂することができる原子の開裂結合または開裂結合基を意味する。特定の実施形態では、開裂部位は開裂結合である。特定の実施形態では、開裂部位は開裂結合を含む。特定の実施形態では、開裂部位は原子の基である。特定の実施形態では、開裂部位は、細胞またはリソソーム等の細胞内区画の内部で選択的に開裂される。特定の実施形態では、開裂部位は、ヌクレアーゼ等の内在酵素によって、選択的に開裂される。特定の実

施形態では、開裂部位は、1、2、3、4、または4つ以上の開裂結合を有する原子の基を含む。

【0312】

特定の実施形態では、共役基は、開裂部位を含む。特定のそのような実施形態では、開裂部位は、オリゴマー化合物を共役リンカーと共有結合させる。特定のそのような実施形態では、開裂部位は、オリゴマー化合物を細胞標的部位と共有結合させる。

【0313】

特定の実施形態では、開裂結合は、アミド、ポリアミド、エステル、エーテル、リン酸ジエステルの1つもしくは両方、リン酸エステル、カルバミン酸、ジスルフィド、またはペプチドから選択される。特定の実施形態では、開裂結合は、リン酸ジエステルのエステルの1つである。特定の実施形態では、開裂結合は、リン酸ジエステルのエステルの1つまたは両方である。特定の実施形態では、開裂部位は、オリゴマー化合物と共役基の残りとリン酸ジエステル結合である。特定の実施形態では、開裂部位は、オリゴマー化合物と共役基の残りと間に位置する、リン酸ジエステル結合を含む。特定の実施形態では、開裂部位はリン酸塩またはリン酸ジエステルを含む。特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステルまたはホスホロチオエート結合のいずれかによって、共役リンカーと結合する。特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステル結合によって共役リンカーと結合する。特定の実施形態では、共役基は開裂部位を含まない。

【0314】

特定の実施形態では、開裂部位は開裂ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドは、プリン、置換プリン、ピリミジンまたは置換ピリミジンから選択される任意に保護された複素環式塩基を含む。特定の実施形態では、開裂部位は、ウラシル、チミン、シトシン、4-N-ベンゾイルシトシン、5-メチルシトシン、4-N-ベンゾイル-5-メチルシトシン、アデニン、6-N-ベンゾイルアデニン、グアニン及び2-N-イソブチルグアニンから選択されるヌクレオシドである。

【0315】

特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステル結合によって、オリゴマー化合物の3'末端または5'末端ヌクレオシドのいずれかに結合し、リン酸ジエステルまたはホスホロチオエート結合によって、共役基の残りと共結合する、2'-デオキシヌクレオシドである。特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステル結合によって、オリゴマー化合物の3'末端から5'末端ヌクレオシドのいずれかに結合し、リン酸ジエステルまたはホスホロチオエート結合によって、共役基の残りと共結合する、2'-デオキシアデノシンである。特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステル結合によって、3'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドの3'-ヒドロキシル基の3'-酸素原子に結合する2'-デオキシアデノシンである。特定の実施形態では、開裂部位は、リン酸ジエステル結合によって、5'末端ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基の5'-酸素原子に結合する2'-デオキシアデノシンである。特定の実施形態では、開裂部位は、オリゴマー化合物のヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシドの2'位に結合する。

【0316】

本明細書で使用されるとき、共役基に関連する「共役リンカー」は、細胞標的部位を、直接または開裂部位を介してオリゴマー化合物に共有結合させる任意の原子または原子の基を含む共役基の部分の意味する。特定の実施形態では、共役リンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル(-S-)及びヒドロキシルアミノ(-O-N(H)-)から選択される基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、アルキル及びアミド基から選択される基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、少なくとも1つの

リン酸結合基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、少なくとも1つのリン酸ジエステル基を含む。特定の実施形態では、共役リンカーは、少なくとも1つの中性結合基を含む。

【0317】

特定の実施形態では、共役リンカーは、オリゴマー化合物と共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、オリゴマー化合物及び分岐基と共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、オリゴマー化合物及びテザーリガンドと共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、開裂部位と共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、開裂部位及び分岐基と共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、開裂部位及びテザーリガンドと共有結合する。特定の実施形態では、共役リンカーは、1つまたは複数の開裂結合を含む。特定の実施形態では、共役基は共役リンカーを含まない。

10

【0318】

本明細書で使用されるとき、「分岐基」は、2つ以上のテザーリガンド及び共役基の残りと共有結合を形成することができる少なくとも3つの部位を有する原子の基を意味する。一般に、分岐基は、テザーリガンドを、共役リンカー及び/または開裂部位によって、オリゴマー化合物に接続するために、複数の反応部位を提供する。特定の実施形態では、分岐基は、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル及びヒドロキシルアミノ基から選択される基を含む。特定の実施形態では、分岐基は、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル及びヒドロキシルアミノ基から選択される基を含む、分岐脂肪族基を含む。特定のそのような実施形態では、分岐脂肪族基は、アルキル、アミノ、オキソ、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。特定のそのような実施形態では、分岐脂肪族基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態では、分岐基は単環式系または多環式環系を含む。

20

【0319】

特定の実施形態では、分岐基は、共役リンカーと共有結合する。特定の実施形態では、分岐基は、開裂部位と共有結合する。特定の実施形態では、分岐基は、共役リンカー及びテザーリガンドのいずれかと共有結合する。特定の実施形態では、分岐基は、1つまたは複数の開裂結合を含む。特定の実施形態では、共役基は分岐基を含まない。

30

【0320】

特定の実施形態では、本明細書で提供される共役基は、少なくとも1つのテザーリガンドを有する細胞標的部位を含む。特定の実施形態では、細胞標的部位は、分岐基と共有結合する2つのテザーリガンドを含む。特定の実施形態では、細胞標的部位は、分岐基と共有結合する3つのテザーリガンドを含む。

【0321】

本明細書で使用されるとき、「テザー」は、リガンドを共役基の残りに接続させる原子の基を意味する。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、置換アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミノ、オキソ、アミド、リン酸ジエステル及びポリエチレングリコールから選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、アミノ、オキソ、アミド、及びポリエチレングリコール基から選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、置換アルキル、リン酸ジエステル、エーテル及びアミノ、オキソ、アミド基から選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、アミノ、及びオキソ基から選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基

40

50

である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、及びオキソ基から選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、任意の組み合わせのアルキル、及びリン酸ジエステルから選択される1つまたは複数の基を含む直鎖脂肪族基である。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ少なくとも1つのリン酸結合基または中性結合基を含む。

【0322】

特定の実施形態では、テザーは、1つまたは複数の開裂結合を含む。特定の実施形態では、テザーリガンドはそれぞれ分岐基と結合する。特定の実施形態では、テザーリガンドはそれぞれアミド基によって分岐基と結合する。特定の実施形態では、テザーリガンドはそれぞれエーテル基によって分岐基と結合する。特定の実施形態では、テザーリガンドはそれぞれリン酸結合基または中性結合基によって、分岐基と結合する。特定の実施形態では、テザーリガンドはそれぞれリン酸ジエステル基によって分岐基と結合する。特定の実施形態では、テザーはそれぞれアミドまたはエーテル基のいずれかによってリガンドと結合する。特定の実施形態では、テザーはそれぞれエーテル基によってリガンドと結合する。

10

【0323】

特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、リガンドと分岐基との間の鎖長が約8～約20個の原子を含む。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、リガンドと分岐基との間の鎖長が約10～約18個の原子を含む。特定の実施形態では、テザーはそれぞれ、鎖長が約13個の原子を含む。

20

【0324】

特定の実施形態では、本開示は、各リガンドがテザーによって共役基の残りと共有結合する、リガンドを提供する。特定の実施形態では、各リガンドは、標的細胞上の少なくとも1つの種類の受容体について親和性を有するように選択される。特定の実施形態では、哺乳動物の肝細胞上の少なくとも1つの種類の受容体について親和性を有するリガンドが選択される。特定の実施形態では、肝臓アシアロ糖タンパク質レセプター (hepatic asialoglycoprotein receptor) (ASGP-R) について親和性を有するリガンドが選択される。特定の実施形態において、各リガンドは炭水化物である。特定の実施形態では、各リガンドは、独立して、ガラクトース、N-アセチルガラクトセアミン、マンノース、グルコース、グルコサモン及びフコースから選択される。特定の実施形態において、各リガンドは、N-アセチルガラクトセアミン (GalNAc) である。特定の実施形態では、標的部位は1～3個のリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は3個のリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は2個のリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は1個のリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は3個のN-アセチルガラクトセアミンリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は2個のN-アセチルガラクトセアミンリガンドを含む。特定の実施形態では、標的部位は1個のN-アセチルガラクトセアミンリガンドを含む。

30

【0325】

特定の実施形態では、各リガンドは、炭水化物、炭水化物誘導体、修飾炭水化物、多価炭水化物クラスター、多糖、修飾多糖、または多糖誘導体である。特定の実施形態では、各リガンドはアミノ等またはチオ糖である。例えば、アミノ糖は、当該技術分野で既知の任意の数の化合物、例えば、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノース (GalNAc)、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ-D-グルコピラノース (ムラミン酸)、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース及びN-スルホ-D-グルコサミン、及びN-グリコロイル-L-ノイラミン酸から選択することができる。例えば、チオ糖は、5-チオ-D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル-D-グルコピラノシド、

40

50

4 - チオ - - D - ガラクトピラノース及びエチル 3 , 4 , 6 , 7 - テトラ - O - アセチル - 2 - デオキシ - 1 , 5 - ジチオ - - D - g l u c o - ヘプトピラノシドから成る群から選択される。

【 0 3 2 6 】

特定の実施形態では、本明細書で提供される共役基は、炭水化物クラスターを含む。本明細書で使用されるとき、「炭水化物クラスター」は、2つ以上の炭水化物残基が、テザー基によって分岐基と結合する、共役基の部分の意味する。(例えば、炭水化物共役クラスターの例として、Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29, which is incorporated herein by reference in its entirety、またはRensen et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," J. Med. Chem. 2004, (47): 5798-5808を参照のこと)。

10

【 0 3 2 7 】

本明細書で使用されるとき、「修飾炭水化物」は、自然に存在する炭水化物に対して1つまたは複数の化学修飾を有する任意の炭水化物を意味する。

20

【 0 3 2 8 】

本明細書で使用されるとき、「炭水化物誘導体」は、出発物質または中間体として炭水化物を使用して合成することができる任意の化合物を意味する。

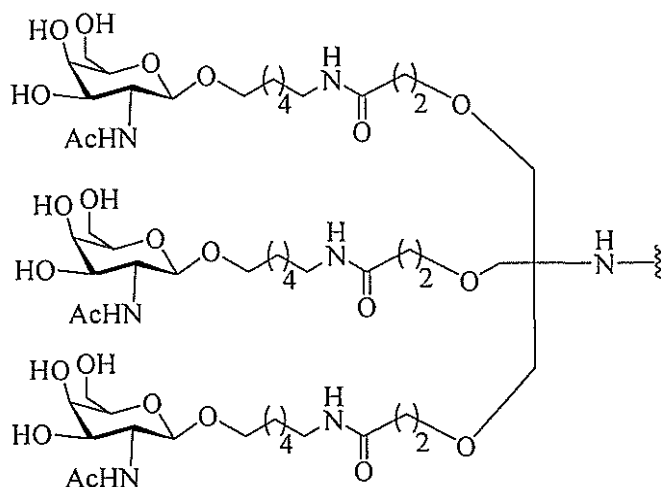
【 0 3 2 9 】

本明細書で使用されるとき、「炭水化物」は、自然に存在する炭水化物、修飾炭水化物、または炭水化物誘導体を意味する。

【 0 3 3 0 】

特定の実施形態では、細胞標的部位が以下の式を有する共役基を提供する。

【 化 2 3 】



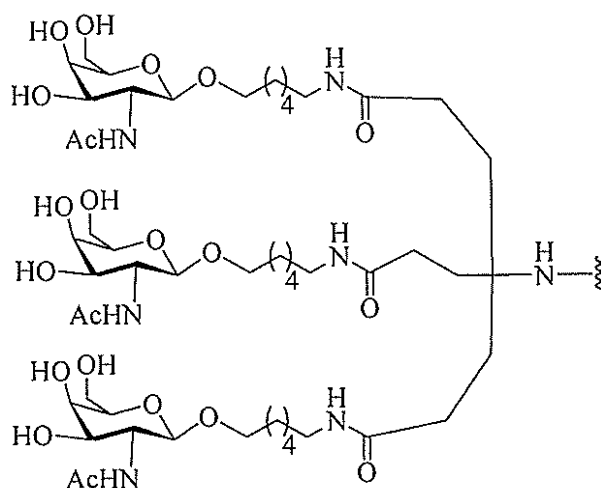
30

40

【 0 3 3 1 】

特定の実施形態では、細胞標的部位が以下の式を有する共役基を提供する。

【化 2 4】

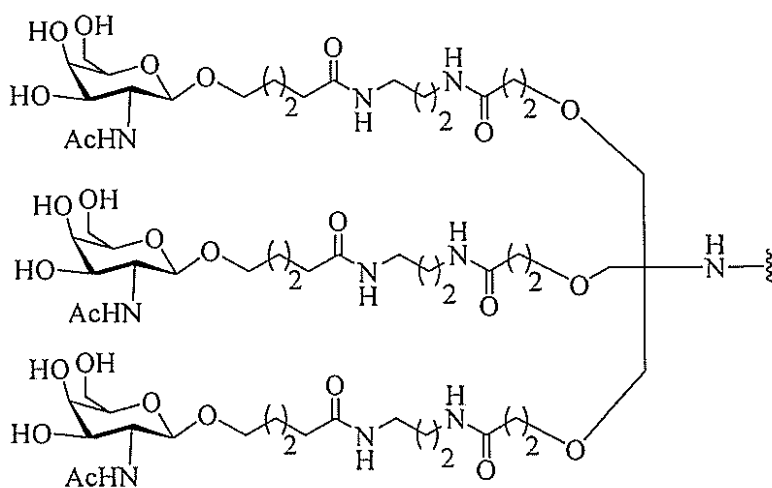


10

【 0 3 3 2】

特定の実施形態では、細胞標的部位が以下の式を有する共役基を提供する。

【化 2 5】



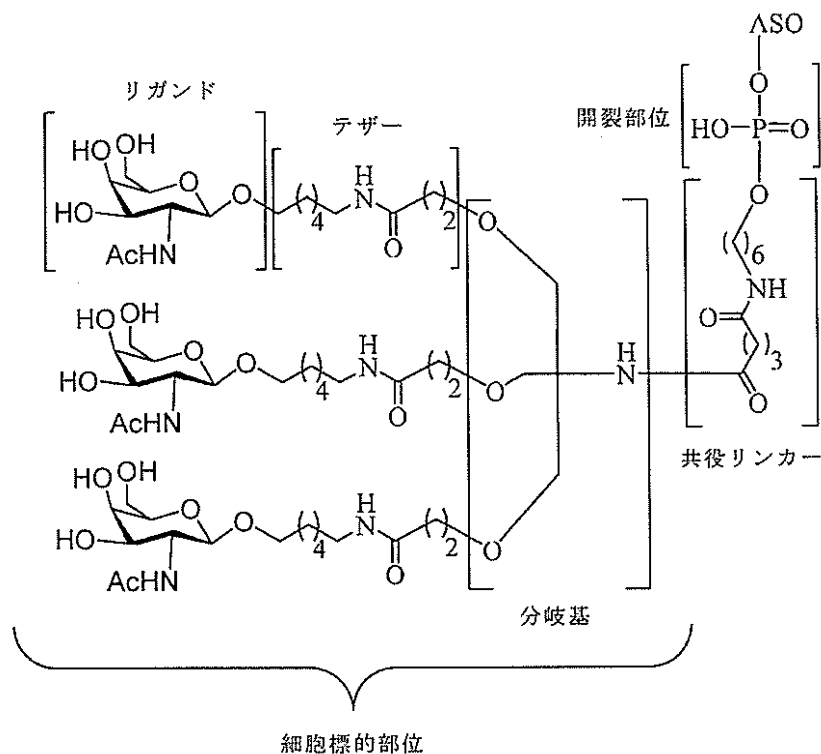
20

30

【 0 3 3 3】

特定の実施形態において、共役基は以下の式を有する。

【化 2 6】



10

20

【0334】

上述の共役基、共役基、テザー、共役リンカー、分岐基、リガンド、開裂部位、及びその他の修飾物を含むアンチセンス化合物等の共役オリゴマー化合物のいくつかの調製を教示する代表的な米国特許、米国特許出願公開、及び国際特許出願公開として、限定されないが、米国特許第5,994,517号、同第6,300,319号、同第6,660,720号、同第6,906,182号、同第7,262,177号、同第7,491,805号、同第8,106,022号、同第7,723,509号、同第2006/0148740号、同第2011/0123520号、国際公開第WO2013/033230号、及び同第WO2012/037254号が含まれるが、これらに限定されず、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0335】

上述の共役基、共役基、テザー、共役リンカー、分岐基、リガンド、開裂部位、及びその他の修飾物を含むアンチセンス化合物等の共役オリゴマー化合物のいくつかの調製を教示する代表的な出版物には、BIESSEN et al., "The Cholesterol Derivative of a Triantennary Galactoside with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor: a Potent Cholesterol Lowering Agent" J. Med. Chem. (1995) 38:1846-1852, BIESSEN et al., "Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1995) 38:1538-1546, LEE et al., "New and more efficient multivalent glyco-ligands for asialoglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes" Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) 19:2494-2500, RENSEN et al., "Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein

40

50

in Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo" J. Biol. Chem. (2001) 276(40):37577-37584, RENSEN et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (2004) 47:5798-5808, SLIEDREGT et al., "Design and Synthesis of Novel Amphiphilic Dendritic Galactosides for Selective Targeting of Liposomes to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor" J. Med. Chem. (1999) 42:609-618、及び Valentijn et al., "Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides with high affinity for the Asialoglycoprotein Receptor" Tetrahedron, 1997, 53(2), 759-770が含まれるが、これらに限定されず、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0336】

特定の実施形態では、共役基として、限定されないが、介入物、リポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、チオエーテル、ポリエーテル、コレステロール、チオコレステロール、コール酸部分、葉酸、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、アダマンタン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び染料が挙げられる。特定の共役基、例えば、コレステロール部分 (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1989, 86, 6553-6556)、コール酸 (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセリンまたはトリエチル-アンモニウム 1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホン酸塩 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783)、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)、またはアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)、またはオクタデシルアミンまたはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937)については、以前に記述されている。

20

30

40

【0337】

50

特定の実施形態では、共役基は、活性薬物質、例えば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S) - (+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 - トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、ホリン酸、ベンゾサイアジアザイド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビツール酸、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤または抗生剤を含む。

【0338】

共役リンカーの非限定的ないくつかの例として、ピロリジン、8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタン酸 (ADO)、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 - カルボン酸 (SMCC) 及び 6 - アミノヘキサン酸 (HEXまたはAHA) が挙げられる。その他のリンカーとして、限定されないが、置換 $C_1 - C_{10}$ アルキル、置換または非置換 $C_2 - C_{10}$ アルケニルまたは置換もしくは非置換 $C_2 - C_{10}$ アルキニルが挙げられ、ここで、好ましい置換基の非限定的なリストとして、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシ、カルボキシ、ベンジル、フェニル、ニトロ、チオール、チオアルコキシ、ハロゲン、アルキル、アリール、アルケニル及びアルキニルが挙げられる。

【0339】

共役基は、オリゴヌクレオチドの一方の端または両方の端 (末端共役基) 及び / または任意の内部位置に結合することができる。

【0340】

特定の実施形態では、共役基は、オリゴマー化合物のオリゴヌクレオチドの 3' 末端にある。特定の実施形態において、共役基は 3' 末端の近くにある。特定の実施形態では、共役基は、オリゴマー化合物の 3' 末端であるが、1 つまたは複数の末端基ヌクレオチドの前に結合する。特定の実施形態では、共役基は末端基の内部に置かれる。

【0341】

細胞培養及びアンチセンス化合物処理

アンチセンス化合物が TMPRSS6 核酸のレベル、活性または発現に与える効果を、様々な細胞型で *in vitro* で試験することができる。このような分析に使用する細胞型は、商業供給業者 (例えば、American Type Culture Collection, Manassus, VA、Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC、Clonetics Corporation, Walkersville, MD) から入手可能であり、市販の試薬 (例えば、Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) を使用して、供給業者の指示書に従って細胞を培養する。例示的な細胞型としては、HepG2 細胞、Hep3B 細胞、Huh7 細胞 (肝細胞癌)、初代肝細胞、A549 細胞、GM04281 繊維芽細胞及び LLC-MK2 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0342】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの *in vitro* 試験

本明細書では、アンチセンスオリゴヌクレオチドで細胞を処理する方法を記載し、その他のアンチセンス化合物で処理するために、適切に修飾することができる。

【0343】

一般に、細胞が培養物中で約 60 ~ 80 % コンフルエンスに達した時に、アンチセンスオリゴヌクレオチドで細胞を処理する。

【0344】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するためによく使用される試薬の 1 つに、カチオン性脂質トランスフェクション試薬 LIPOFECTIN (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドを OPTI-MEM (登録商標) 1 中の LIPOFECTIN (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) と混合し、所望の最終濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び 100 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき典型的には 2 ~ 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の LIPOFECTIN (登録商標) 濃度を達成する。

【0345】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入するために使用される別の試薬は、L I P O F E C T A M I N E 2000 (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM (登録商標) 1還元血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中のL I P O F E C T A M I N E 2000 (登録商標) と混合し、所望の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び100 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき典型的には2 ~ 12 ug / mLのL I P O F E C T A M I N E (登録商標) 濃度を達成する。

【0346】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の試薬は、C y t o f e c t i n (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM (登録商標) 1還元血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中のC y t o f e c t i n (登録商標) と混合し、所望の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチド及び100 nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき典型的には2 ~ 12 ug / mLのC y t o f e c t i n (登録商標) 濃度を達成する。

10

【0347】

培養細胞にアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入するために使用される別の試薬は、O l i g o f e c t a m i n e (商標) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) である。アンチセンスオリゴヌクレオチドをO p t i - M E M (商標) - 1還元血清培地 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 中でO l i g o f e c t a m i n e (商標) と混合することで、オリゴヌクレオチドに対するO l i g o f e c t a m i n e (商標) の比が、100 nMあたり約0.2対0.8 µLを有する所望のオリゴヌクレオチド濃度を達成する。

20

【0348】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入するために使用される別の試薬は、F u G E N E 6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) を含む。アンチセンスオリゴマー化合物を1 mLの無血清RPMI中のF u G E N E 6 と混合し、100 nM当たり1 ~ 4 µLのF u G E N E 6 のF u G E N E 6 対オリゴマー化合物比を有する所望の濃度のオリゴヌクレオチドを達成した。

30

【0349】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入するために使用される別の技術は、エレクトロポーション (Sambrook and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. third Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001) を含む。

【0350】

細胞は、常法により、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理される。細胞は、典型的にはアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の16 ~ 24時間後に採取され、その時点で、標的核酸のRNAレベルまたはタンパク質レベルが、当技術分野に知られており、本明細書に記載する方法によって測定される (Sambrook and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. third Edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。一般に、複数の複製試料で処理を行う場合は、反復した処理の平均としてデータを表す。

40

【0351】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに異なる。特定の細胞株について、最適なアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度を決定する方法は、当該技

50

術分野で既知である (Sambrook and Russell in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的に、LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標)、リポフェクチンまたはサイトフェクチンでトランスフェクトするときに、1 nM ~ 300 nM の範囲の濃度で使用される。エレクトロポレーションによるトランスフェクションの場合は、それより高い 625 nM ~ 20,000 nM の範囲の濃度で、アンチセンスオリゴヌクレオチドが使用される。

【0352】

RNA 単離

RNA 分析は、全細胞 RNA またはポリ (A) + mRNA で行うことができる。RNA 単離の方法は、当該技術分野で既知である (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001)。RNA は、当該技術分野において周知の方法を使って、例えば、製造者が推奨するプロトコルに従って、TRIzol (登録商標) 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用することによって、調製される。

【0353】

標的レベルまたは発現の阻害の解析

TMPRSS6 核酸のレベルまたは発現の阻害は、当該技術分野で既知の様々な方法でアッセイすることができる (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001)。例えば、標的核酸レベルは、例えばノーザンブロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、または定量的リアルタイム PCR によって定量化することができる。RNA 分析は、全細胞 RNA またはポリ (A) + mRNA に対して行うことができる。RNA 単離の方法は当該技術分野では周知である。ノーザンブロット分析は、また当該技術分野では典型的なものである。定量的リアルタイム PCR は、製造者の指示書に従って、PE- Applied Biosystems, Foster City, CA から入手可能な市販の ABI PRISM (登録商標) 7600、7700、または 7900 配列検出システムを使用して好都合に達成することができる。

【0354】

標的 RNA レベルの定量的リアルタイム PCR 分析

標的 RNA レベルの定量化は、製造業者の説明書に従って ABI PRISM (登録商標) 7600、7700、または 7900 配列検出システム (PE- Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて定量的リアルタイム PCR によって達成することができる。定量的リアルタイム PCR の方法は当該技術分野で周知である。

【0355】

リアルタイム PCR の前に、単離された RNA は、逆転写酵素 (RT) 反応に供され、リアルタイム PCR 増幅のための基質として使用される相補的 DNA (cDNA) を生成する。RT 及びリアルタイム PCR 反応は、同じサンプルウェル中で連続的に実施する。RT 及びリアルタイム PCR 試薬は、Invitrogen (Carlsbad, CA) から入手する。RT リアルタイム PCR 反応は、当業者に周知の方法によって実施される。

【0356】

リアルタイム PCR によって得られる遺伝子 (または RNA) 標的量は、シクロフィリン A 等の、発現が一定である遺伝子の発現レベルのいずれかを用いて、または RIBOGREEN (登録商標) (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA) を用いて全 RNA を定量することによって正規化される。シクロフィリン A の発現は、リアルタイム PCR によって、多重化を標的と同時にまたは別個に実行することによって定量化

10

20

30

40

50

する。全RNAは、RIBOGREEN（登録商標）RNA定量試薬（Invitrogen, Inc. Eugene, OR）を用いて定量される。RIBOGREEN（登録商標）によるRNA定量化の方法は、Jones, L. J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)に教示されている。CYTOFLUOR（登録商標）4000機器（PE Applied Biosystems）は、RIBOGREEN（登録商標）蛍光を測定するために使用する。

【0357】

プローブ及びプライマーは、TMPRSS6 核酸にハイブリダイズするように設計する。リアルタイムPCRプローブ及びプライマーの設計方法は、当該分野で周知であり、PRIMER EXPRESS（登録商標）ソフトウェア（Applied Biosystems, Foster City, CA）等のソフトウェアの使用を含んでもよい。

【0358】

タンパク質レベルの分析

TMPRSS6 核酸のアンチセンス阻害は、TMPRSS6 タンパク質レベルを測定することによって評価することができる。TMPRSS6 のタンパク質レベルは、免疫沈降、ウエスタンブロット分析（イムノブロットティング）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、定量タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えば、カスパーゼ活性アッセイ）、免疫組織化学、免疫細胞化学または蛍光活性化細胞選別（FACS）等の当該技術分野で周知の様々な方法で評価または定量化することができる（Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001）。標的に対する抗体を同定し、抗体のMSRSカタログ（Aerie Corporation, Birmingham, MI）等の種々のソースから得ることができるか、または当該技術で周知の従来のモノクローナルまたはポリクローナル抗体生成法で調製することができる。

【0359】

アンチセンス化合物の *in vivo* 試験

TMPRSS6 の発現を阻害し、身体における鉄の蓄積を減少するといった表現型の変化を起こす能力を評価するために、アンチセンス化合物、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの試験を動物で行う。正常な動物、または実験的疾患モデルで、試験を実施してもよい。動物への投与では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、殺菌注射用水またはリン酸緩衝生理食塩水等の薬学的に許容される希釈剤中で製剤化する。投与として、腹腔内、静脈内及び皮下等の非経口経路による投与が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量及び投薬頻度の計算は、投与経路及び動物の体重等の要因に依存する。1つの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療期間の後、RNAを肝組織から単離し、TMPRSS6 核酸発現の変化を測定する。TMPRSS6 タンパク質レベルの変化も測定することができる。TMPRSS6 発現の変化は、ヘプシジン発現レベル、鉄の血漿レベル、及び動物に存在するトランスフェリンの飽和度を決定することによって、測定することができる。

【0360】

特定の適応症

個体に本明細書に記載の1つまたは複数の組成物または化合物を投与することを含む、個体を治療するための組成物、化合物及び方法を提供する。特定の実施形態では、個体におけるTMPRSS6 発現を減少させるための組成物、化合物及び方法を提供する。特定の実施形態では、TMPRSS6 核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む治療有効量の組成物または化合物を個体に投与することによって、個体を治療するための組成物、化合物及び方法を提供する。特定の実施形態では、TMPRSS6 を標的とするアンチセンス化合物は、TMPRSS6 を減少させる。特定の実施形態では、TMPRSS6 の減少を必要とする個体は、鉄蓄積疾患、障害または病態を有しているか、またはそれらに罹患するリスクにある。特定の実施形態では、個体における鉄レベルを減少させる際に使用するために、本明細書に記載の組成物、化合物及び方法を提供する。

【 0 3 6 1 】

特定の実施形態では、鉄蓄積は、個体の疾患、障害または病態を治療するための治療の結果である。特定の実施形態では、治療は、輸血治療である。特定の実施形態では、複数回の輸血は赤血球増加症を引き起こし得る。さらなる実施形態では、複数回の輸血は、動物が貧血を有することに関連する。複数回の輸血を必要とする貧血の例は、遺伝性貧血、遺伝性貧血及び重症慢性溶血である。遺伝性貧血の例として、限定されないが、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜障害、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素欠損症、または遺伝性出血性毛細血管拡張症が挙げられる。特定の実施形態において、サラセミアは、 - サラセミアである。特定の実施形態では、 - サラセミアは、HbE / - サラセミア、重症型 - サラセミア、中間型 - サラセミアまたは軽症型 - サラセミアである。

10

【 0 3 6 2 】

特定の実施形態では、鉄蓄積は、個体の疾患、障害または病態に起因する。特定の実施形態では、疾患、障害または病態は、遺伝性ヘモクロマトーシスまたはサラセミアである。特定の実施形態では、サラセミアは、非輸血依存性サラセミア (NTDT) または - サラセミアである。特定の実施形態では、 - サラセミアは、HbE / - サラセミア、重症型 - サラセミア、中間型 - サラセミアまたは軽症型 - サラセミアである。

【 0 3 6 3 】

特定の実施形態では、疾患、障害及び / または病態は、過剰な非経口の鉄サプリメント摂取または過剰な食事性鉄摂取に関連する。

20

【 0 3 6 4 】

本明細書は、mRNAまたはタンパク質発現レベル等のヘプシジンレベルを増加させるための組成物、化合物及び方法を提供する。特定の実施形態では、mRNAまたはタンパク質発現レベル等のヘプシジンレベルを増加させるために使用される、本明細書に記載のTMPRSS6を標的とするアンチセンス化合物を提供する。

【 0 3 6 5 】

本明細書は、動物におけるトランスフェリンの飽和度を減少させるための組成物、化合物及び方法を提供する。特定の実施形態では、動物におけるトランスフェリンの飽和度を減少させるために使用される、本明細書に記載のTMPRSS6を標的とするアンチセンス化合物を提供する。特定の実施形態では、トランスフェリンの飽和度を減少させることによって、赤血球生成について鉄供給が減少する。特定の実施形態では、赤血球生成の減少は、動物における赤血球増加症またはその症状を治療し、予防し、その発症を遅延し、寛解し、かつ / または減少させる。特定の実施形態では、動物における赤血球増加症またはその症状を治療し、予防し、その発症を遅らせ、寛解し、かつ / または減少させる際に使用される、本明細書に記載のTMPRSS6を標的とするアンチセンス化合物を提供する。特定の実施形態において、赤血球増加症は真性多血症である。特定の実施形態では、TMPRSS6を標的とするアンチセンス化合物での治療は、赤血球増加症が赤血球白血病に進行するのを予防または遅延する。

30

【 0 3 6 6 】

特定の実施形態において、個体におけるTMPRSS6核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物の投与には、アンチセンス化合物に対する個体の応答を判定するために、TMPRSS6レベルのモニタリングを伴う。特定の実施形態において、個体におけるTMPRSS6核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物の投与には、個体のヘプシジンレベルのモニタリングを伴う。特定の実施形態において、個体におけるTMPRSS6核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物の投与には、個体の鉄レベルのモニタリングを伴う。特定の実施形態において、個体におけるTMPRSS6核酸を標的とする治療有効量のアンチセンス化合物の投与には、個体のトランスフェリンの飽和度の評価を伴う。アンチセンス化合物の投与に対する個体の応答は、治療的介入の量及び期間を決定するために医師が使用する。

40

50

【 0 3 6 7 】

本明細書では、鉄蓄積疾患、障害または病態に罹患しているまたは罹患しやすい患者を治療するための医薬品を調製する際に使用される T M P R S S 6 を標的とするアンチセンス化合物を含む医薬組成物を提供する。

【 0 3 6 8 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、T M P R S S 6 核酸に相補的な少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 個の連続した核酸塩基部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを含むアンチセンス化合物を投与することを含む。

【 0 3 6 9 】

特定の併用療法

特定の実施形態において、本明細書で提供する組成物または化合物を含む第 1 の薬剤は、1 つまたは複数の第 2 の薬剤と同時に投与される。特定の実施形態において、そのような第 2 の薬剤は、本明細書に記載の第 1 の薬剤のように、鉄蓄積疾患、障害または病態を治療するように設計されている。特定の実施形態において、そのような第 2 の薬剤は、本明細書に記載の第 1 の薬剤のように異なる疾患、障害または病態を治療するように設計されている。特定の実施形態において、そのような第 2 の薬剤は、本明細書に記載の 1 つまたは複数の組成物または化合物の望ましくない副作用を治療するように設計される。特定の実施形態において、第 1 の薬剤は、第 2 の薬剤の望ましくない副作用を治療するように設計される。特定の実施形態において、第 2 の薬剤は、第 1 の薬剤の望ましくない効果を治療するために、第 1 の薬剤と同時に投与される。特定の実施形態において、第 2 の薬剤を第 1 の薬剤と同時に投与して組合せ効果をもたらす。特定の実施形態において、第 2 の薬剤を第 1 の薬剤と同時に投与して相乗効果をもたらす。特定の実施形態において、第 1 及び第 2 の薬剤の共投与は、薬剤が独立した治療として投与された場合に治療効果または予防効果を達成するために必要とされる用量よりも低い用量の使用を可能にする。特定の実施形態では、同時投与される第 2 の薬剤の用量は、第 2 の薬剤が単独で投与される場合に投与される用量と同じである。特定の実施形態では、同時投与される第 2 の薬剤の用量は、第 2 の薬剤が単独で投与される場合に投与される用量より少ない。特定の実施形態では、同時投与される第 2 の薬剤の用量は、第 2 の薬剤が単独で投与される場合に投与される用量より多い。

【 0 3 7 0 】

特定の実施形態において、第 1 の薬剤及び 1 つまたは複数の第 2 の薬剤は、同時に投与される。特定の実施形態において、第 1 の薬剤及び 1 つまたは複数の第 2 の薬剤は、異なる時間に投与される。特定の実施形態において、第 2 の薬剤は、第 1 の薬剤を投与する前に投与される。特定の実施形態において、第 2 の薬剤は、第 1 の薬剤を投与した後に投与される。特定の実施形態において、第 1 の薬剤及び 1 つまたは複数の第 2 の薬剤は、単一の医薬製剤と一緒に調製される。特定の実施形態において、第 1 の薬剤及び 1 つまたは複数の第 2 の薬剤は、別々に調製される。

【 0 3 7 1 】

特定の実施形態では、第 2 の薬剤は、限定されないが、核酸化合物を含む。このような核酸化合物は、s i R N A、リボザイムまたは T M P R S S 6 または別の標的を標的とするアンチセンス化合物を含むことができる。

【 0 3 7 2 】

特定の実施形態では、第 2 の薬剤として、限定されないが、鉄キレート剤等の非アンチセンス化合物、トランスフェリン、骨形成タンパク質 6 (B M P 6)、ヘプシジンアゴニスト、幹細胞、T M P R S S 6 を標的とする抗体または胎児ヘモグロビン (H b F) 成長薬が挙げられる。さらなる実施形態では、鉄キレート剤は、限定されないが、F B S 0 7 0 1 (F e r r o K i n)、エクジエイド、デスフェラル、及びデフェリプロンから選択される。特定の実施形態では、H B F 成長薬として、5 - ヒドロキシル尿素、短鎖脂肪酸 (S C F A) 誘導体 (例えば、H Q K 1 0 0 1)、D N A メチルトランスフェラーゼ阻

10

20

30

40

50

害薬（例えば、デシタピン）またはヒストンデアセチラーゼ（H D A C）阻害薬（例えば、Z o l i n a、パノピノスタットが挙げられる。

【 0 3 7 3 】

特定の実施形態では、第 2 の薬剤は、限定されないが、静脈切開術または輸血治療を含む。特定の実施形態では、第 1 の薬剤は、静脈切開術または輸血治療時に同時に投与される。特定の実施形態では、第 1 の薬剤は、静脈切開術または輸血治療の前に投与される。特定の実施形態では、第 1 の薬剤は、静脈切開術または輸血治療の後に投与される。特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物または化合物の投与によって、個体における静脈切開術または輸血治療の頻度が減少する。特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物または化合物の投与によって、静脈切開術または輸血治療の頻度が増加する。特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物または化合物の投与によって、静脈切開術または輸血治療に必要な時間が減少する。

10

【 0 3 7 4 】

特定の化合物

ヒトにおける治療薬としての使用を促進する有益な特性を有する好ましいアンチセンス化合物を、本明細書の例で説明する。簡略して、好ましいアンチセンス化合物の選択に寄与する試験のみを説明する。参照を容易にするために、例の非網羅的要約を以下に提供する。

【 0 3 7 5 】

M O E ギャップマーモチーフを有する約 2 2 0 0 個のアンチセンス化合物またはヒト T M P R S S 6 を標的とするモチーフを含む c E t を設計し、細胞に単回投与した後のヒト T M P R S S 6 m R N A に与える効果について、H e p 3 B 細胞においてスクリーニングした。実施例 1 は、さらなる試験のために選択された 1 0 0 個以上の強力なアンチセンス化合物について、代表的な単回投与のスクリーニングのデータを示す。

20

【 0 3 7 6 】

i n v i t r o での単回投与で試験を行った約 2 2 0 0 個のアンチセンス化合物のうち、約 1 0 0 個のアンチセンス化合物を選択して用量依存性阻害試験を行い、H e p 3 B 細胞における最大半量の阻害濃度（I C ₅₀）を決定した（実施例 2）。

【 0 3 7 7 】

C D - 1 マウスにおける試験のために、用量反応及び/または単回投与試験におけるその効力に基づいて、約 7 7 個のアンチセンス化合物をさらに選択し、マウスのアンチセンス化合物の耐性（例えば、血漿化学マーカー、体重、臓器の重量）を決定した（実施例 3 ~ 4）。

30

【 0 3 7 8 】

C D - 1 マウスにおける耐性について試験を行った約 7 7 個のアンチセンス化合物のうち、約 4 8 個のアンチセンス化合物を選択して S p r a g u e - D a w l e y 系ラットにおける試験を行い、ラットの耐性を決定した（実施例 5）。

【 0 3 7 9 】

ラットの耐性試験に基づいて、約 3 2 個のアンチセンス化合物を選択して、ヒト T M P R S S 6 トランスジェニック（h u T M P R S S 6 t g）マウスにおける、i n v i v o の効力試験を行った（実施例 6）。

40

【 0 3 8 0 】

マウス試験において、効力及び耐性があると識別されたアンチセンス化合物を、アカゲザル T M P R S S 6 遺伝子配列に対する交差反応性について、評価した（実施例 7）。本明細書に記載の試験におけるアンチセンス化合物を、カニクイザルで試験を行ったが（実施例 1 1）、カニクイザル T M P R S S 6 配列を、アンチセンス化合物の配列との比較に使用することができなかったため、アンチセンス化合物の配列を、近縁種のアカゲザルの配列と比較した。約 7 個のアンチセンス化合物が、アカゲザル T M P R S S 6 遺伝子配列とミスマッチがないことがわかった。

【 0 3 8 1 】

50

マウスの効力及び耐性試験の結果、ならびにアカゲザルの配列との相同性に基づいて、先行試験の7個のアンチセンス化合物の配列(585774、585683、585775、630718、647477、647449、647420)の配列を選択して、より強力にTMPRSS6レベルを減少させるために、さらなる化学修飾を行った。GalNAc共役体を有する8個の新たな化合物(702843、705051、705052、705053、706940、706941、706942、706943)を、7個の元のアンチセンス化合物に基づいて設計した(実施例7)。

【0382】

8個のGalNAc共役アンチセンス化合物を、CD-1マウスにおける耐性(例えば、体重、臓器の重量、肝代謝マーカー(例えば、ALT、AST及びビリルビン)、腎代謝マーカー(例えば、BUN及びクレアチニン)、組織学、血液学的パラメータ(例えば、血液細胞数及びヘマトクリット)等を測定した)について(実施例8)、及びヒトTMPRSS6トランスジェニックマウスの効力について(実施例9)、マウスを用いて試験した。

10

【0383】

8個のGalNAc共役アンチセンス化合物も、粘度について評価し、8個のうち7個で好ましい粘度レベルを有することが分かり、1個はボーダーラインの許容可能な粘度レベルを有することがわかった(実施例10)。

【0384】

マウス及び*in vitro*の粘度試験において確認された好ましいプロファイルに基づいて、8個のGalNAc共役アンチセンス化合物に、カニクイザルにおいて、TMPRSS6を減少させる効力、耐性、ならびに鉄パラメータ(例えば、ヘプシジンレベル、血清鉄及びトランスフェリン飽和)に対する効果について試験を行った(実施例11)。8個のGalNAc共役アンチセンス化合物は、概してカニクイザルにおいて、効力及び耐性があることが分かった。アンチセンス化合物705051、702843、706942及び706943は、特にTMPRSS6、血清鉄及びトランスフェリン飽和を減少させる効力があることが分かった。

20

【0385】

したがって、本明細書では、治療薬として使用することに有用な1つまたは複数の特徴を有するアンチセンス化合物を提供する。特定の実施形態では、本明細書では、配列番号1~6のいずれかから選択されるヌクレオチドの領域を標的とする、またはそれに特異的にハイブリダイズすることが可能な、本明細書に記載の修飾オリゴヌクレオチドを含むアンチセンス化合物を提供する。

30

【0386】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、TMPRSS6発現を阻害する能力を有するために有効である。特定の実施形態において、化合物または組成物は、TMPRSS6を少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%阻害する。

40

【0387】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、ヒト細胞、例えば、Hep3B細胞株(実施例2で説明される)において試験するとき、*in vitro*のIC₅₀が20µM未満、10µM未満、8µM未満、5µM未満、2µM未満、1µM未満、0.9µM未満、0.8µM未満、0.7µM未満、0.6µM未満、また0.5µM未満であるために有効である。

【0388】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、*in vivo*での半有効量(ED₅₀)が5mpk/wk、4mpk/wk、3mpk/wk、2mpk/wkまたは1mpk/wkであるために有効である。特定の実施形態では

50

、 1 m p k / w k の E D ₅₀ を有する好ましいアンチセンス化合物として、実施例 8 に記載されるアンチセンス化合物 7 0 2 8 4 3、7 0 6 9 4 0、7 0 6 9 4 2 及び 7 0 6 9 4 3 が挙げられる。

【 0 3 8 9 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、実施例 9 に記載のように、4 0 c P 未満、3 5 c P 未満、3 0 c P 未満、2 5 c P 未満、2 0 c P 未満、1 5 c P 未満、または 1 0 c P 未満の粘度を有するために有効である。4 0 c P 超の粘度を有するオリゴヌクレオチドは、最適粘度に満たない粘度を有する。

【 0 3 9 0 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、例に記載された *i n v i v o* の耐性の測定値によって示されるように、高い耐性を有する。特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、生理食塩水で処置された動物と比較した A L T 及び / または A S T の 3 倍、2 倍、1 . 5 倍以下の増加が示すように、高い耐性を有する。

【 0 3 9 1 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のアンチセンス化合物は、5 0 % 超の阻害能力、E D ₅₀ 1 m p k / w k、4 0 c P 未満の粘度、トランスジェニックマウスにおける 3 倍以下の A L T 及び / または A S T の増加の 1 つまたは複数を有するために有効である。

【 0 3 9 2 】

特定の実施形態では、I S I S 7 0 2 8 4 3 (配列番号 3 6) が好ましい。当該化合物は、T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて強力な阻害薬であり、かつ C D - 1 マウスにおいて非常に耐性のあるアンチセンス化合物であることが分かった。マウスにおいて、当該化合物は、生理食塩水で処置された動物と比較した 3 倍未満の A L T レベル及び / または A S T レベルの増加を有した。当該化合物は、h u T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて、約 3 3 c P の許容可能な粘度及び E D ₅₀ 1 m p k / w k を有した。また、サルにおいて、当該化合物は、T M P R S S 6 の阻害に最も強力な化合物であった。

【 0 3 9 3 】

特定の実施形態では、I S I S 7 0 5 0 5 1 (配列番号 3 6) が好ましい。当該化合物は、T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて強力な阻害薬であり、かつ C D - 1 マウスにおいて非常に耐性のあるアンチセンス化合物であることが分かった。マウスにおいて、当該化合物は、生理食塩水で処置された動物と比較した 3 倍未満の A L T レベル及び / または A S T レベルの増加を有した。当該化合物は、h u T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて、約 2 3 c P の許容可能な粘度及び E D ₅₀ 3 m p k / w k を有した。また、サルにおいて、当該化合物は、T M P R S S 6 の阻害に最も強力な化合物であった。

【 0 3 9 4 】

特定の実施形態では、I S I S 7 0 6 9 4 2 (配列番号 7 7) が好ましい。当該化合物は、T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて強力な阻害薬であり、かつ C D - 1 マウスにおいて非常に耐性のあるアンチセンス化合物であることが分かった。マウスにおいて、当該化合物は、生理食塩水で処置された動物と比較した 3 倍未満の A L T レベル及び / または A S T レベルの増加を有した。当該化合物は、h u T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて、約 2 0 c P の許容可能な粘度及び E D ₅₀ 1 m p k / w k を有した。また、サルにおいて、当該化合物は、T M P R S S 6 の阻害に最も強力な化合物であった。

【 0 3 9 5 】

特定の実施形態では、I S I S 7 0 6 9 4 3 (配列番号 7 7) が好ましい。当該化合物は、T M P R S S 6 トランスジェニックマウスにおいて強力な阻害薬であり、かつ C D - 1 マウスにおいて非常に耐性のあるアンチセンス化合物であることが分かった。h u T

10

20

30

40

50

MPRSS6 トランスジェニックマウスにおいて、当該化合物は、生理食塩水で処置された動物と比較した3倍未満のALTレベル及び/またはASTレベルの増加を有した。当該化合物は、huTMPRSS6 トランスジェニックマウスにおいて、約19cPの許容可能な粘度及びED₅₀ 1mpk/wkを有した。また、サルにおいて、当該化合物は、TMPRSS6の阻害に最も強力な化合物であった。

【0396】

実施例

参照による非限定的な開示及び組み込み

本明細書に記載されるある特定の化合物、組成物、及び方法が特定の実施形態に従って具体的に記載されているが、以下の実施例は、本明細書に記載される化合物を例証する役割のみを果たし、それを限定するようには意図されていない。本出願に記載の参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0397】

実施例1：ヒトII型膜貫通セリンプロテアーゼ6 (TMPRSS6) を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

約2200個の新しく設計したキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを、5'-10'-5' MOEギャップマーまたはcET含有ギャップマーとして設計した。

【0398】

5'-10'-5' MOEギャップマーを20ヌクレオシドの長さのオリゴヌクレオチドとして設計し、中央のギャップセグメントは、10個の2'-デオキシヌクレオシドを含み、それぞれ5個のヌクレオシドを含む5'方向及び3'方向のウィングセグメントに隣接する。5'ウィングセグメントの各ヌクレオシド及び3'ウィングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマーにわたるヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート (P=S) 結合である。各ギャップマーにわたる全てのシトシン残基は、5'-メチルシトシンである。

【0399】

cET含有ギャップマーは、様々なデオキシ、MOE、及び(S)-cEtギャップマーモチーフで設計した。デオキシ、MOE、及び(S)-cEtオリゴヌクレオチドは、16ヌクレオシドの長さであり、ヌクレオチドは、MOE糖修飾、(S)-cEt糖修飾またはデオキシリボースのいずれかを有する。表3の「化学物質」の列は、各オリゴヌクレオチドの糖修飾を記載している。「k」は、(S)-cEt糖修飾を示し、「d」は、デオキシリボースを示し、「e」は、MOE修飾を示す。特に示されない限り、各ギャップマーにわたるヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート (P=S) 結合である。各ギャップマーにわたる全てのシトシン残基は、5'-メチルシトシンである。

【0400】

「開始部位」は、ギャップマーがヒト遺伝子配列において標的とされる5'末端ヌクレオシドを示す。「終了部位」は、ギャップマーがヒト遺伝子配列において標的とされる3'末端ヌクレオシドを示す。以下の表に挙げられる各ギャップマーは、配列番号1として本明細書で示されるヒトTMPRSS6 mRNA (GENBANK寄託番号NM_153609.2)、または配列番号2として本明細書で示されるヒトTMPRSS6ゲノム配列 (ヌクレオチド16850000~16897000から切断したGENBANK寄託番号NT_011520.12の補体) のいずれかを標的とする。以下の表では、「n/a」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが100%の相補性を有する特定の遺伝子配列を標的としないことを示す。

【0401】

2200個のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドに、その単回投与がin vitroでTMPRSS6 mRNAに与える効果について試験を行った。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、同様の培養条件を有する一連の試験において少なくとも1回、試験を行った。

【0402】

試験対象の2200個のうち、約110の強力なアンチセンスオリゴヌクレオチドの代表的な結果を、以下の表1～3に示す。これらの強力なアンチセンスオリゴヌクレオチドを以下に記載のさらなる試験のために選択した。

【0403】

表1は、5 - 10 - 5 MOEギャップマーによるTMPRSS6 mRNAの阻害率を示す。ウェル当たり約20,000個の細胞の密度で培養されたHe p 3 B細胞を、4,500 nMアンチセンスオリゴヌクレオチドで、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトした。約24時間の処理時間の後、RNAを細胞から単離し、TMPRSS6 mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3840（配列番号92として本明細書で示される正方向配列CAAGCCCAAGAAAGATGCTCAA；配列番号93としてとして本明細書で示される逆方向配列GGAATAGACGGAGCTGGAGTTG；配列番号94としてとして本明細書で示されるプローブ配列ACCAGCACCCGCCCTGGGAACCTT）を使用してmRNAレベルを測定した。TMPRSS6 mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）によって測定されるように、RNA総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6の阻害率として結果を示す。

【表 2 - 1】

表 1 : 配列番号 1 及び／または 2 を標的とする 5-10-5 MOEギャップマーによる
TPRSS6 mRNA の阻害

ISIS 番号	配列	配列番号 : 1 開始部位	配列番号 : 1 終了部位	配列番号 : 2 開始部位	配列番号 : 2 終了部位	%阻害	配列 番号
585604	CCATCACCTCCGTCC CCCTG	178	197	7011	7030	58	7
585606	TCCGCTTCCTCGCCA TCACC	190	209	7023	7042	51	8
585608	TTTTCTCTTGGAGTC CTCAC	233	252	7066	7085	52	9
585609	GCTTTTCTCTTGGAG TCCTC	235	254	7068	7087	79	10
585611	CCGGGCTTTTCTCTT GGAGT	239	258	7072	7091	58	11
585626	GGCTTTGGCGGTTC ACTGC	449	468	1194 8	1196 7	79	12
585629	GAGCATCTTCTGGGC TTTGG	461	480	N/A	N/A	80	13
585631	CCTTGAGCATCTTCT GGGCT	465	484	N/A	N/A	84	14
585649	AGTGCCCTGCACCACC TCGGG	616	635	1437 2	1439 1	79	15
585651	CAGCAGTGCCTGCAC CACCT	620	639	1437 6	1439 5	70	16
585653	TCCTCCACCAGCAGT GCCTG	628	647	1438 4	1440 3	49	17
585654	AGCTCCTCCACCAGC AGTGC	631	650	1438 7	1440 6	64	18
585655	CAGCAGCTCCTCCAC CAGCA	635	654	1439 1	1441 0	66	19
585667	GCTGTGCAGGCCCTT CTTCC	1049	1068	2404 4	2406 3	52	20
585668	GTAGTAGCTGTGCAG GCCCT	1055	1074	2405 0	2406 9	61	21
585682	ACGGCAAATCATACT TCTGC	1284	1303	2604 4	2606 3	60	22
585683	GCACGGCAAATCATA CTTCT	1286	1305	2604 6	2606 5	58	23
585684	CCCTGGGTGCACGGC AAATC	1294	1313	2605 4	2607 3	58	24
585698	CAAACGCAGTTTCTC TCATC	1567	1586	N/A	N/A	52	25
585699	TGCAAAACGCAGTTTC TCTCA	1569	1588	N/A	N/A	52	26
585752	GATCACACCTGTGAT GCGGG	2504	2523	4426 6	4428 5	48	27
585757	CTCCTGCCACCACAG GGCCT	2656	2675	4441 8	4443 7	70	28
585758	ACCTCCTGCCACCAC AGGGC	2658	2677	4442 0	4443 9	69	29
585761	TGCCATCACTGGAGC AGACA	2699	2718	4446 1	4448 0	60	30
585762	ATCCTCCTGCCATCA CTGGA	2706	2725	4446 8	4448 7	38	31
585768	TCCATTCCCAGATCC CAGT	2978	2997	4474 0	4475 9	64	32
585769	CTTCCATTCCCAGAT CCCAA	2980	2999	4474 2	4476 1	62	33
585770	ACCTTCCATTCCCAG ATCCC	2982	3001	4474 4	4476 3	52	34

10

20

30

40

【表 2 - 2】

585772	C A A A G G G C A G C T G A G C T C A C	3154	3173	4491 6	4493 5	47	35
585774	C T T T A T T C C A A A G G G C A G C T	3162	3181	4492 4	4494 3	67	36
585775	A G C T T T A T T C C A A A G G G C A G	3164	3183	4492 6	4494 5	68	37
585776	A G G C A G C T T T A T T C C A A A G G	3168	3187	4493 0	4494 9	59	38
585777	G A T C A G G C A G C T T T A T T C C A	3172	3191	4493 4	4495 3	65	39
585831	A G G A G C G G C C A C C G T C C T G T	N/A	N/A	1234 0	1235 9	45	40
				1237 1	1239 0		
				1256 2	1258 1		
585834	G G C A G G A G C G G C C A C C G T C C	N/A	N/A	1234 3	1236 2	42	41
				1237 4	1239 3		
				1256 5	1258 4		
585863	T C C C C C T G A G G C T C T C A G G A	N/A	N/A	1623 3	1625 2	32	42
				1873 7	1875 6		
585864	T A A G T C C C C C T G A G G C T C T C	N/A	N/A	1623 7	1625 6	39	43
				1874 1	1876 0		
585906	A A G A C T G T T C C T T C T C C T T T	N/A	N/A	2799 0	2800 9	44	44
585912	C A G C T T G T G C C T G C C C A G A G	N/A	N/A	2920 8	2922 7	45	45
585932	A G T C T A T C T G G C C A C A G T G A	N/A	N/A	3298 1	3300 0	34	46
585937	G G T C C T T C T T T G A G C C T C A C	N/A	N/A	3480 0	3481 9	35	47

【0404】

表2は、追加の5-10-5 MOEギャップマーによるTMPRSS6 mRNAの阻害率を示す。ウェル当たり約20,000個の細胞の密度で培養されたHep3B細胞を、5,000nMアンチセンスオリゴヌクレオチドで、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトした。約24時間の処理時間の後、RNAを細胞から単離し、TMPRSS6 mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3840を使用して、mRNAレベルを測定した。TMPRSS6 mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）によって測定されるように、RNA総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6の阻害率として結果を示す。

10

20

30

【表 3】

表 2：配列番号 1 及び／または 2 を標的とする 5-10-5 MOE ギャップマーによる TMPRSS6 mRNA の阻害

1 S 1 S 番号	配列	配列番号： 1 開始部位	配列番号： 1 終了部位	配列番号： 2 開始部位	配列番号： 2 終了部位	%阻害	配列 番号
5 9 1 4 6 6	CCTCAGGTCACCCAC TTGCTG	2 5 3 3	2 5 5 2	4 4 2 9 5	4 4 3 1 4	6 3	4 8
5 9 1 4 9 1	GCCACCTCCTGCCA CCACAG	2 6 6 1	2 6 8 0	4 4 4 2 3	4 4 4 4 2	7 2	4 9
5 9 1 4 9 2	ATGCCACCTCCTGC CACCCAC	2 6 6 3	2 6 8 2	4 4 4 2 5	4 4 4 4 4	5 9	5 0
5 9 1 5 1 4	CTCCATCCTCCTGC CATCAC	2 7 1 0	2 7 2 9	4 4 4 7 2	4 4 4 9 1	5 9	5 1
5 9 1 5 3 6	GCAAGCTGAGCTCAC CTCCCA	3 1 4 8	3 1 6 7	4 4 9 1 0	4 4 9 2 9	6 8	5 2
5 9 1 5 3 7	GGCAGCTGAGCTCA CCTCCC	3 1 4 9	3 1 6 8	4 4 9 1 1	4 4 9 3 0	7 5	5 3
5 9 1 5 4 9	GGCAGCTTTTATTCC AAGGG	3 1 6 7	3 1 8 6	4 4 9 2 9	4 4 9 4 8	6 9	5 4
5 9 1 5 5 0	CAGGCAGCTTTATT CCAAAG	3 1 6 9	3 1 8 8	4 4 9 3 1	4 4 9 5 0	7 6	5 5
5 9 1 5 5 2	ATCAGGCAGCTTTA TTCCAA	3 1 7 1	3 1 9 0	4 4 9 3 3	4 4 9 5 2	6 6	5 6
5 9 1 5 7 8	CCACTGGCCCTGGG TGCACG	1 3 0 1	1 3 2 0	2 6 0 6 1	2 6 0 8 0	6 5	5 7
5 9 1 5 7 9	TCCACTGGCCCTGG GTGCAC	1 3 0 2	1 3 2 1	2 6 0 6 2	2 6 0 8 1	6 8	5 8

【0405】

表 3 は、一連の実験の c E t 含有ギャップマーによる TMPRSS6 mRNA の阻害率を示す。ウェル当たり約 20,000 個の細胞の密度で培養された Hep3B 細胞を、2,000 nM アンチセンスオリゴヌクレオチドで、エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトした。約 24 時間の処理時間の後、RNA を細胞から単離し、TMPRSS6 mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープロブセット RTS3840 を使用して、mRNA レベルを測定した。TMPRSS6 mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) によって測定されるように、RNA 総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6 の阻害率として結果を示す。

10

20

30

【表 4 - 1】

表 3 : 配列番号 1 及び／または 2 を標的とする c E t 含有ギャップマーによる TMP R S S 6 m R N A の阻害

ISIS 番号	配列	配列番号 : 1 開始部位	配列番号 : 1 終了部位	配列番号 : 2 開始部位	配列番号 : 2 終了部位	化学名	%阻害	配列 番号
6158 40	CTTTTGGCTT ACAGTG	3057	3072	4481 9	4483 4	e k k - d 1 0 - k k e	59	59
6158 84	GCTGAGCTCA CCTCCC	3149	3164	4491 1	4492 6	e k k - d 1 0 - k k e	70	60
6158 98	TATTCCAAAG GGCAGC	3163	3178	4492 5	4494 0	e k k - d 1 0 - k k e	69	61
6159 01	CTTTATTCCA AAGGGC	3166	3181	4492 8	4494 3	e k k - d 1 0 - k k e	68	62
6159 03	AGCTTTATTTC CAAAGG	3168	3183	4493 0	4494 5	e k k - d 1 0 - k k e	70	63
6159 09	TCAGGCAGCT TTATTTC	3174	3189	4493 6	4495 1	e k k - d 1 0 - k k e	69	64
6159 10	ATCCAGGCAGC TTTATTTC	3175	3190	4493 7	4495 2	e k k - d 1 0 - k k e	69	65
6159 11	GATCAGGCAG CTTTAT	3176	3191	4493 8	4495 3	e k k - d 1 0 - k k e	69	66
6304 97	ATTCAGAAAG GCAGCT	3162	3177	4492 4	4493 9	k k k - d 1 0 - k k k	80	67
6306 89	CTTACAGTGG CAGCAG	3050	3065	4481 2	4482 7	k k k - d 1 0 - k k k	71	68
6306 92	TGGCTTACAG TGGCAG	3053	3068	4481 5	4483 0	k k k - d 1 0 - k k k	75	69
6306 93	TTGGCTTACA GTGGCA	3054	3069	4481 6	4483 1	k k k - d 1 0 - k k k	75	70
6306 96	CTTTTGGCTT ACAGTG	3057	3072	4481 9	4483 4	k k k - d 1 0 - k k k	66	59
6307 16	CTTTATTCCA AAGGGC	3166	3181	4492 8	4494 3	k k k - d 1 0 - k k k	63	62
6307 17	GCTTTATTCC AAGGGC	3167	3182	4492 9	4494 4	k k k - d 1 0 - k k k	81	71
6307 18	AGCTTTATTTC CAAAGG	3168	3183	4493 0	4494 5	k k k - d 1 0 - k k k	84	63
6307 19	CAGGCAGCTT TATTCC	3173	3188	4493 5	4495 0	k k k - d 1 0 - k k k	80	72
6307 22	GATCAGGCAG CTTTAT	3176	3191	4493 8	4495 3	k k k - d 1 0 - k k k	72	66
6307 25	TTTGATCAGG CAGCTT	3179	3194	N/A	N/A	k k k - d 1 0 - k k k	61	73
6307 26	TTTTGATCAG GCAGCT	3180	3195	N/A	N/A	k k k - d 1 0 - k k k	72	74
6307 27	TTTTTGTATCA GGCAGC	3181	3196	N/A	N/A	k k k - d 1 0 - k k k	73	75
6307 94	ACATCAGGGA CGAGAC	2686	2701	4444 8	4446 3	k k - d 8 - k e k e k e	72	76
6473 93	TTATTCCAAA GGGCAG	3164	3179	4492 6	4494 1	k k k - d 1 0 - k k k	78	83
6473 94	TTTATTCCAA AGGGCA	3165	3180	4492 7	4494 2	k k k - d 1 0 - k k k	77	84
6473 95	CAGCTTTATT CCAAAG	3169	3184	4493 1	4494 6	k k k - d 1 0 - k k k	86	77
6473 96	GCAAGCTTTAT TCCAA	3170	3185	4493 2	4494 7	k k k - d 1 0 - k k k	86	78
6473 97	GGCAGCTTTA TTCCAA	3171	3186	4493 3	4494 8	k k k - d 1 0 - k k k	85	82
6473 98	AGGCAGCTTT ATTCCA	3172	3187	4493 4	4494 9	k k k - d 1 0 - k k k	82	79
6474 04	GGCAGCTGAG CTCACC	3153	3168	4491 5	4493 0	k e k - d 9 - e e k k	76	85
6474 14	TATTCCAAAG GGCAGC	3163	3178	4492 5	4494 0	k e k - d 9 - e e k k	86	61

10

20

30

40

【表 4 - 2】

6 4 7 4 1 9	AGCTTTTATTC CAAAGG	3 1 6 8	3 1 8 3	4 4 9 3 0	4 4 9 4 5	k e k - d 9 - e e k k	8 7	6 3
6 4 7 4 2 0	CAGCTTTTATT CCAAAG	3 1 6 9	3 1 8 4	4 4 9 3 1	4 4 9 4 6	k e k - d 9 - e e k k	8 3	7 7
6 4 7 4 2 1	GCACTTTTAT TCCAAA	3 1 7 0	3 1 8 5	4 4 9 3 2	4 4 9 4 7	k e k - d 9 - e e k k	8 3	7 8
6 4 7 4 2 3	AGGCAGCTTT ATTCCA	3 1 7 2	3 1 8 7	4 4 9 3 4	4 4 9 4 9	k e k - d 9 - e e k k	8 4	7 9
6 4 7 4 2 4	CAGGCAGCTT TATTCC	3 1 7 3	3 1 8 8	4 4 9 3 5	4 4 9 5 0	k e k - d 9 - e e k k	7 8	7 2
6 4 7 4 2 6	ATCAGGCAGC TTTATT	3 1 7 5	3 1 9 0	4 4 9 3 7	4 4 9 5 2	k e k - d 9 - e e k k	8 1	6 5
6 4 7 4 2 8	TGATCAGGCA GCTTTA	3 1 7 7	3 1 9 2	N / A	N / A	k e k - d 9 - e e k k	7 6	8 0
6 4 7 4 2 9	TTGATCAGGC AGCTTT	3 1 7 8	3 1 9 3	N / A	N / A	k e k - d 9 - e e k k	7 8	8 1
6 4 7 4 4 2	ATTCCAAAGG GCAGCT	3 1 6 2	3 1 7 7	4 4 9 2 4	4 4 9 3 9	k k - d 9 - e c c k k	8 1	6 7
6 4 7 4 4 6	CTTTATTCCA AAGGGC	3 1 6 6	3 1 8 1	4 4 9 2 8	4 4 9 4 3	k k - d 9 - e e e k k	7 9	6 2
6 4 7 4 4 7	GCTTTATTCC AAGGGG	3 1 6 7	3 1 8 2	4 4 9 2 9	4 4 9 4 4	k k - d 9 - e e e k k	8 7	7 1
6 4 7 4 4 8	AGCTTTTATTC CAAAGG	3 1 6 8	3 1 8 3	4 4 9 3 0	4 4 9 4 5	k k - d 9 - e e e k k	8 6	6 3
6 4 7 4 4 9	CAGCTTTTATT CCAAAG	3 1 6 9	3 1 8 4	4 4 9 3 1	4 4 9 4 6	k k - d 9 - e e e k k	8 9	7 7
6 4 7 4 5 0	GCACTTTTAT TCCAAA	3 1 7 0	3 1 8 5	4 4 9 3 2	4 4 9 4 7	k k - d 9 - e e e k k	8 8	7 8
6 4 7 4 5 1	GGCAGCTTTA TTCCAA	3 1 7 1	3 1 8 6	4 4 9 3 3	4 4 9 4 8	k k - d 9 - e e e k k	8 8	8 2
6 4 7 4 5 3	CAGGCAGCTT TATTCC	3 1 7 3	3 1 8 8	4 4 9 3 5	4 4 9 5 0	k k - d 9 - e e e k k	7 7	7 2
6 4 7 4 5 4	TCAAGGCAGCT TTATTTC	3 1 7 4	3 1 8 9	4 4 9 3 6	4 4 9 5 1	k k - d 9 - e e e k k	8 2	6 4
6 4 7 4 5 7	TGATCAGGCA GCTTTA	3 1 7 7	3 1 9 2	N / A	N / A	k k - d 9 - e e e k k	7 8	8 0
6 4 7 4 7 5	CTTTATTCCA AAGGGC	3 1 6 6	3 1 8 1	4 4 9 2 8	4 4 9 4 3	k k - d 8 - e e e e k k	7 7	6 2
6 4 7 4 7 6	GCTTTATTCC AAGGGG	3 1 6 7	3 1 8 2	4 4 9 2 9	4 4 9 4 4	k k - d 8 - e c c e k k	8 3	7 1
6 4 7 4 7 7	AGCTTTTATTC CAAAGG	3 1 6 8	3 1 8 3	4 4 9 3 0	4 4 9 4 5	k k - d 8 - e e e e k k	8 4	6 3
6 4 7 4 7 8	CAGCTTTTATT CCAAAG	3 1 6 9	3 1 8 4	4 4 9 3 1	4 4 9 4 6	k k - d 8 - e e e e k k	7 9	7 7
6 4 7 4 8 2	CAGGCAGCTT TATTCC	3 1 7 3	3 1 8 8	4 4 9 3 5	4 4 9 5 0	k k - d 8 - e e e e k k	7 6	7 2
6 4 7 5 0 6	AGCTTTTATTC CAAAGG	3 1 6 8	3 1 8 3	4 4 9 3 0	4 4 9 4 5	k - d 9 - k e k e k e	8 9	6 3
6 4 7 5 0 8	GCACTTTTAT TCCAAA	3 1 7 0	3 1 8 5	4 4 9 3 2	4 4 9 4 7	k - d 9 - k e k e k e	7 7	7 8
6 4 7 5 1 4	GATCAGGCAG CTTTAT	3 1 7 6	3 1 9 1	4 4 9 3 8	4 4 9 5 3	k - d 9 - k e k e k e	7 8	6 6
6 4 7 5 3 1	CAGCTTTTATT CCAAAG	3 1 6 9	3 1 8 4	4 4 9 3 1	4 4 9 4 6	k k - d 8 - k e k e k e	8 8	7 7
6 4 7 5 3 2	GCACTTTTAT TCCAAA	3 1 7 0	3 1 8 5	4 4 9 3 2	4 4 9 4 7	k k - d 8 - k e k e k e	7 7	7 8

【 0 4 0 6 】

実施例 2 : Hep 3 B 細胞におけるヒト TMPRSS6 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応

実施例 1 に記載される単回投与実験において試験を行った約 2 2 0 0 個のアンチセンスオリゴヌクレオチドから選択した約 1 0 0 個のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、ヒト TMPRSS6 mRNA の *in vitro* 阻害の試験において、Hep 3 B 細胞中で様々な用量で試験した。

【 0 4 0 7 】

以下の表 4 の実験では、ウェル当たり 1 2 , 0 0 0 個の細胞密度で細胞を置き、アンチセンスオリゴヌクレオチドの 0 . 1 5 μ M、0 . 4 4 μ M、1 . 3 3 μ M、4 . 0 0 μ M 及び 1 2 . 0 0 μ M の濃度でエレクトロポーションを使用してトランスフェクトした。約 1 6 時間の処理時間の後、RNA を細胞から単離し、TMPRSS6 mRNA レベルを

10

20

30

40

50

定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープロブセットRTS3840を使用して、mRNAレベルを測定した。TMPRSS6 mRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）によって測定されるように、RNA総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6の阻害率として結果を示す。「0」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドがTMPRSS6 mRNAレベルを減少させなかったことを示す。

【0408】

各オリゴヌクレオチドの最大半量の阻害濃度（IC₅₀）も示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞において、TMPRSS6 mRNAレベルが、用量依存的に有意に減少した。

【表5-1】

表4：5-10-5 MOEギャップマーでの用量反応アッセイ

ISIS番号	0.15 μM	0.44 μM	1.33 μM	4.00 μM	12.00 μM	IC ₅₀ (μM)
585604	0	0	17	36	63	7
585606	0	0	0	0	35	>12
585608	0	13	6	8	50	>12
585609	0	10	24	44	68	5
585611	0	0	9	33	67	8
585626	3	21	27	55	82	3
585629	37	45	56	71	83	1
585631	29	56	63	70	84	1
585649	0	9	35	46	74	4
585651	0	18	1	39	75	6
585653	10	15	18	42	63	7
585654	0	0	25	33	65	8
585655	0	12	15	34	65	8
585667	0	0	2	30	52	>12
585668	11	6	0	43	70	8
585682	0	0	0	30	63	11
585683	1	9	19	39	77	5
585684	6	1	13	21	57	>12
585698	13	11	37	39	78	4
585699	0	8	25	25	65	8
585752	0	12	37	34	69	5
585757	0	7	16	53	79	4
585758	6	0	25	49	71	5
585761	2	12	13	39	66	7
585762	2	15	26	44	75	4
585768	4	0	20	52	76	4
585769	0	0	0	42	70	7
585770	12	12	42	50	68	3
585772	12	12	23	34	56	12

10

20

30

40

【表 5 - 2】

5 8 5 7 7 4	1 5	2 8	5 8	6 8	8 4	1
5 8 5 7 7 5	0	7	2 8	6 0	8 2	3
5 8 5 7 7 6	3 6	2 4	5 6	6 9	8 6	1
5 8 5 7 7 7	1 5	3 9	6 3	7 6	8 8	1
5 8 5 8 3 1	0	8	3	1 9	3 1	> 1 2
5 8 5 8 3 4	0	1 0	3	6	3 2	> 1 2
5 8 5 8 6 3	7	7	3	0	5 1	> 1 2
5 8 5 8 6 4	5	9	1 9	3 1	3 4	> 1 2
5 8 5 9 0 6	1 3	2	1 6	1 1	2 9	> 1 2
5 8 5 9 1 2	2 0	0	3 0	3 3	3 2	> 1 2
5 8 5 9 3 2	1 5	1 1	2 5	4	3 7	> 1 2
5 8 5 9 3 7	2 0	3 3	3 0	3 0	4 3	> 1 2
5 9 1 4 6 6	0	1 4	2 6	3 9	7 1	5
5 9 1 4 9 1	0	1 1	2 3	4 5	6 8	5
5 9 1 4 9 2	0	0	2 2	2 7	6 4	9
5 9 1 5 1 4	0	0	1	4 1	7 5	6
5 9 1 5 3 6	1 3	2 2	3 4	6 4	8 1	2
5 9 1 5 3 7	1 7	4 4	5 7	8 1	8 8	1
5 9 1 5 4 9	2 1	2 6	5 1	7 2	8 7	1
5 9 1 5 5 0	1 9	3 4	6 5	7 6	8 9	1
5 9 1 5 5 2	2 3	4 9	6 5	8 6	9 0	1
5 9 1 5 7 8	0	1 7	2 8	4 5	5 5	7
5 9 1 5 7 9	3	1 3	4 7	4 0	5 8	6

10

20

【 0 4 0 9 】

以下の表 5 の実験では、ウェル当たり 5 , 0 0 0 個の細胞密度で細胞を置き、アンチセンスオリゴヌクレオチドの 0 . 1 9 μ M、0 . 5 6 μ M、1 . 6 7 μ M 及び 5 . 0 μ M の濃度でエレクトロポーションを使用してトランスフェクトした。約 1 6 時間の処理時間の後、RNA を細胞から単離し、TMPRSS6 mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープローブセット RT S 3 8 4 0 を再度使用して、mRNA レベルを測定した。TMPRSS6 mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) によって測定されるように、RNA 総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6 の阻害率として結果を示す。

30

【 0 4 1 0 】

各オリゴヌクレオチドの最大半量の阻害濃度 (IC₅₀) も示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞において、TMPRSS6 mRNA レベルが用量依存的に有意に減少した。

【表 6】

表 5 : c E t 含有オリゴヌクレオチドでの用量反応アッセイ

ISIS番号	0.19 μM	0.56 μM	1.67 μM	5.00 μM	IC ₅₀ (μM)
630497	28	49	69	86	0.6
647393	28	42	69	84	0.7
647394	43	59	67	83	0.3
647395	11	41	67	83	0.9
647396	25	47	73	79	0.7
647397	27	42	70	83	0.7
647398	27	49	61	84	0.7
647404	23	47	63	79	0.8
647414	38	52	72	87	0.4
647419	45	60	74	84	0.3
647420	28	52	69	82	0.6
647421	23	47	68	85	0.7
647423	23	50	74	81	0.7
647424	20	48	72	83	0.7
647426	26	37	67	76	0.9
647428	25	33	61	83	0.9
647429	20	32	59	83	1
647442	32	51	66	78	0.6
647446	32	48	73	81	0.6
647447	29	52	70	81	0.6
647448	30	56	72	79	0.5
647449	31	45	71	83	0.6
647450	32	54	70	82	0.5
647451	40	62	74	83	0.3
647453	28	52	68	84	0.6
647454	32	45	62	84	0.7
647457	28	46	69	80	0.7
647475	9	52	63	77	1
647476	43	59	70	79	0.3
647477	48	62	77	83	0.2
647478	16	41	68	82	0.9
647482	14	37	73	79	0.9
647506	37	60	75	83	0.4
647508	21	39	52	79	1.1
647514	32	42	63	81	0.7
647531	25	53	73	80	0.6
647532	26	49	61	82	0.7

【0411】

以下の表 6 の実験では、ウェル当たり 20,000 個の細胞密度で細胞を置き、アンチセンスオリゴヌクレオチドの 0.22 μM、0.67 μM、2.00 μM 及び 6.0 μM の濃度でエレクトロポーションを使用してトランスフェクトした。約 16 時間の処理時間の後、RNA を細胞から単離し、TMPRSS6 mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープロブセット RTS3840 を使用して、mRNA レベルを測定した。TMPRSS6 mRNA レベルを、RIBOGREEN (登録商標) によって測定されるように、RNA 総含有量に従って調節した。未処理の対照細胞と比較して、TMPRSS6 の阻害率として結果を示す。

【0412】

各オリゴヌクレオチドの最大半量の阻害濃度 (IC₅₀) も示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理した細胞において、TMPRSS6 mRNA レベルが用量依存的に有意に減少した。

【表 7】

表 6 : c E t 含有オリゴヌクレオチドでの用量反応アッセイ

ISIS 番号	0.22 μM	0.67 μM	2.00 μM	6.00 μM	IC ₅₀ (μM)
630497	34	54	81	89	0.5
630689	43	61	77	87	0.3
630692	54	64	85	95	0.2
630693	42	66	75	86	0.3
630696	20	37	66	82	1.1
630717	48	73	84	83	0.1
630718	49	81	88	89	0.1
630719	42	69	83	95	0.3
630722	40	56	70	90	0.4
630726	24	45	64	82	0.9
630727	36	57	73	82	0.5
630794	25	46	71	84	0.8

10

【0413】

実施例 3 : C D 1 マウスにおけるヒト T M P R S S 6 を標的とする 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーの耐性

C D 1 (登録商標) マウス (Charles River、MA) は多目的マウスモデルであり、安全性及び有効性試験に頻繁に使用される。マウスを上述の表から選択した約 26 個の ISIS 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、様々な血漿化学マーカーのレベルの変化を評価した。

20

【0414】

処理

6 週齢の雄 C D 1 マウスの群に、50 mg / kg の ISIS オリゴヌクレオチドを 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した (100 mg / kg / 週の用量)。雄 C D 1 マウスの 1 つの群には、P B S を 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した。最後の投与から 48 時間後にマウスを安楽死させ、臓器及び血漿を採取してさらに分析した。

【0415】

血漿化学マーカー

ISIS オリゴヌクレオチドが肝臓及び腎臓の機能に与える効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿レベル (ALT 及び AST)、総ビリルビン (Tbil)、アルブミン (Alb)、クレアチニン (Creat)、及び BUN を、自動臨床化学分析器 (Hitachi Olympus AU400e、Melville、NY) を使用して測定した。結果を表 7 に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、肝臓または腎臓機能マーカーいずれかのレベルの変化を引き起こした ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる試験で除外した。

30

【表 8】

表 7：6 週目における CD1 マウスの血漿化学マーカー

ISIS 番号	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	24	51	27	0.17	0.17	2.9
585626	167	155	30	0.18	0.15	2.9
585649	263	157	28	0.17	0.15	3.0
585653	147	89	28	0.18	0.39	3.4
585654	778	300	26	0.15	0.17	3.0
585655	1709	1353	29	0.16	0.35	3.0
585683	45	63	31	0.18	0.20	3.0
585698	53	73	34	0.21	0.19	3.0
585752	90	99	29	0.16	0.17	2.9
585757	246	180	30	0.16	0.15	2.8
585758	212	305	28	0.18	0.28	2.9
585761	659	439	28	0.16	0.43	2.7
585762	597	551	27	0.17	0.64	3.0
585768	483	387	26	0.18	0.19	2.7
585774	109	126	31	0.16	0.14	2.6
585775	60	70	28	0.17	0.15	2.9
585776	654	388	27	0.17	0.13	2.9
585777	159	200	24	0.16	0.17	2.7
591466	46	53	27	0.15	0.12	3.0
591491	761	729	28	0.18	0.25	3.2
591514	230	215	33	0.15	0.14	2.5
591536	540	416	26	0.16	0.13	3.0
591537	552	346	27	0.17	0.16	3.0
591549	708	488	30	0.14	0.14	2.7
591550	294	225	31	0.17	0.12	2.9
591552	1098	680	24	0.17	0.17	3.0
591579	135	85	25	0.16	0.12	2.8

【0416】

体重及び臓器重量

全群のマウスの体重を、実験の開始時と試験終了まで毎週測定した。肝臓、脾臓、腎臓の重量は、試験の最後にも測定し、ベースラインの PBS 対照群と比較した体重及び臓器重量の変化を表 8 に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、臓器重量を変化させた ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表 9】

表 8：6 週目における C D 1 マウスの体重及び相対的な臓器の重量（グラム）

I S I S 番号	BW変化 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的脾臓重量 (g)
P B S	1. 4	1. 0	1. 0	1. 0
5 8 5 6 2 6	1. 4	1. 2	0. 9	1. 1
5 8 5 6 4 9	1. 3	1. 2	1. 0	1. 1
5 8 5 6 5 3	1. 4	1. 1	1. 0	0. 9
5 8 5 6 5 4	1. 2	1. 2	1. 0	1. 1
5 8 5 6 5 5	1. 3	1. 4	1. 0	1. 3
5 8 5 6 8 3	1. 4	1. 0	0. 9	1. 1
5 8 5 6 9 8	1. 5	1. 2	1. 0	1. 4
5 8 5 7 5 2	1. 3	1. 1	1. 0	1. 3
5 8 5 7 5 7	1. 4	1. 5	1. 0	1. 1
5 8 5 7 5 8	1. 4	1. 4	0. 9	1. 0
5 8 5 7 6 1	1. 1	1. 4	1. 0	1. 3
5 8 5 7 6 2	1. 2	2. 1	1. 0	0. 8
5 8 5 7 6 8	1. 5	1. 1	1. 1	1. 3
5 8 5 7 7 4	1. 5	1. 1	1. 0	1. 1
5 8 5 7 7 5	1. 5	0. 9	1. 0	1. 2
5 8 5 7 7 6	1. 4	1. 3	1. 1	1. 5
5 8 5 7 7 7	1. 4	1. 2	1. 1	1. 5
5 9 1 4 6 6	1. 5	1. 0	1. 0	1. 0
5 9 1 4 9 1	1. 3	1. 2	1. 0	1. 1
5 9 1 5 1 4	1. 4	1. 1	0. 9	1. 5
5 9 1 5 3 6	1. 4	1. 3	1. 0	1. 1
5 9 1 5 3 7	1. 3	1. 3	0. 9	1. 3
5 9 1 5 4 9	1. 4	1. 2	1. 0	1. 5
5 9 1 5 5 0	1. 4	1. 1	0. 9	1. 5
5 9 1 5 5 2	1. 4	1. 5	1. 1	1. 5
5 9 1 5 7 9	1. 5	1. 0	0. 9	1. 1

【 0 4 1 7 】

これらの耐性試験では、大部分の 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドは、投与から 6 週間後、良好な耐性を示したことが観察された。

【 0 4 1 8 】

実施例 4：C D 1 マウスにおけるヒト T M P R S S 6 を標的とする c E t 含有オリゴヌクレオチドの耐性

C D 1（登録商標）マウス（C h a r l e s R i v e r、M A）は多目的マウスモデルであり、安全性及び有効性試験に頻繁に使用される。マウスを、上述の表から選択した約 5 1 個の c E t 含有オリゴヌクレオチドで処理し、様々な血漿化学マーカーの変化について評価した。

【 0 4 1 9 】

処理

5 ~ 6 週齢の雄 C D 1 マウスの群（処理群につき $n = 4$ ）に、2 5 m g / k g の I S I S オリゴヌクレオチドを 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した（5 0 m g / k g / 週の用量）。雄 C D 1 マウスの 1 つの群には、P B S を 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した。最後の投与から 4 8 時間後にマウスを安楽死させ、臓器及び血漿を採取してさらに分析した。肝臓、腎臓、及び脾臓を組織診断のために採取し、血漿を採取し、特定の血漿化学マーカーのレベルを測定した。

【 0 4 2 0 】

オリゴヌクレオチドを同じ条件で 2 つの試験群に分け、結果を以下の表に示す。

【 0 4 2 1 】

血漿化学マーカー

I S I S オリゴヌクレオチドが肝臓及び腎臓の機能に与える効果を評価するために、ト

ランスアミナーゼの血漿レベル、ビリルビン、アルブミン、クレアチニン、及びBUNを、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e、Melville、NY）を使用して測定した。結果を表9～10に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、肝臓機能マーカーまたは腎臓機能マーカーのいずれかのレベルの変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。
【表10】

表9：6週目におけるCD1マウスの血漿化学マーカー

ISIS番号	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	55	53	24	0.1	0.2	2.7
615840	752	636	26	0.15	0.23	2.5
615884	1039	664	25	0.17	0.17	2.8
615898	754	420	25	0.17	0.14	2.5
615901	118	120	22	0.11	0.18	2.5
615903	33	46	22	0.12	0.18	2.5
615909	2042	2464	49	0.16	1.19	2.7
615910	978	1058	22	0.15	1.24	2.4
615911	474	366	23	0.14	0.34	2.4
630696	1117	853	26	0.15	0.21	2.3
630716	41	67	25	0.13	0.14	2.4
630717	1005	483	23	0.13	0.19	2.3
630718	57	86	25	0.13	0.13	2.4
630722	207	168	21	0.13	0.16	2.2
630725	1729	897	20	0.12	0.15	2.2
630726	1330	774	22	0.10	0.10	2.1
630727	614	653	23	0.10	0.13	1.6
630794	39	78	24	0.12	0.16	2.6

10

20

【表 1 1】

表 1 0 : 6 週目における C D 1 マウスの血漿化学マーカー

ISIS番号	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	31.3	54.8	32.3	0.14	0.19	3.0
630497	429.0	297.5	31.0	0.18	0.11	2.8
630689	2088.3	1306.0	34.7	0.10	0.22	2.2
630692	1634.8	1402.5	30.9	0.16	0.25	3.4
630693	1247.5	1193.8	33.6	0.19	0.68	2.8
630719	2553.0	2594.7	28.6	0.12	2.55	3.8
647414	718.5	444.0	32.7	0.13	0.12	3.0
647419	39.3	66.5	27.0	0.13	0.15	2.9
647420	90.3	100.8	30.8	0.13	0.19	3.1
647421	613.3	607.3	15.5	0.09	1.61	2.6
647423	1290.3	807.5	29.8	0.28	0.30	3.7
647424	1451.0	1198.3	25.2	0.16	0.37	3.7
647426	548.5	393.0	23.7	0.12	0.16	2.7
647428	2658.8	2232.8	24.8	0.21	0.52	3.0
647429	1306.3	725.3	23.2	0.12	0.21	2.8
647442	564.8	371.5	29.7	0.08	0.13	3.0
647446	69.0	91.3	27.6	0.10	0.14	2.9
647447	61.5	76.3	27.2	0.11	0.13	2.8
647448	100.8	110.5	24.4	0.10	0.14	2.9
647449	61.3	88.0	27.7	0.10	0.13	3.1
647450	1850.8	1512.0	18.3	0.09	0.47	2.9
647451	1376.3	588.3	26.0	0.15	0.29	3.7
647453	1774.3	1674.5	28.8	0.16	1.24	3.7
647454	324.3	409.3	27.0	0.11	0.15	2.7
647457	1609.0	1194.8	25.6	0.12	0.21	2.6
647475	40.0	80.5	25.1	0.10	0.12	2.6
647476	62.0	81.0	26.1	0.11	0.14	2.8
647477	74.8	94.0	26.5	0.11	0.15	2.9
647478	62.0	88.0	28.2	0.11	0.13	3.1
647482	959.8	975.8	25.8	0.11	0.19	2.9
647506	36.3	65.3	25.8	0.10	0.14	2.9
647508	49.8	93.3	26.3	0.11	0.14	3.1
647514	276.0	221.8	28.3	0.11	0.17	2.9
647531	248.5	175.0	28.7	0.11	0.16	3.2
647532	156.8	180.0	21.3	0.09	0.10	3.0

【0 4 2 2】

体重及び臓器重量

全群のマウスの体重を、実験の開始時と試験終了まで毎週測定した。肝臓、脾臓、腎臓の重量は、試験の最後にも測定し、ベースラインである P B S 対照群と比較した体重及び臓器重量の変化を表 1 1 ~ 1 2 に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、臓器の重量を変化させた I S I S オリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表 1 2】

表 1 1 : 6 週目における C D 1 マウスの体重及び相対的な臓器の重量 (グラム)

ISIS 番号	BW 変化 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的脾臓重量 (g)
PBS	1.5	1	1	1
615840	1.2	1.1	1.0	0.8
615884	1.4	1.5	1.1	1.2
615898	1.5	1.3	1.1	1.4
615901	1.5	1.3	1.1	2.0
615903	1.4	1.1	1.1	1.2
615909	0.8	1.6	1.2	0.7
615910	1.2	1.9	1.0	2.3
615911	1.5	1.4	1.1	1.6
630696	1.1	1.2	0.9	1.2
630716	1.4	1.2	1.2	1.2
630717	1.2	1.4	1.0	1.7
630718	1.4	1.2	1.1	1.4
630722	1.6	1.2	1.1	1.6
630725	1.3	1.2	1.1	1.8
630726	1.4	1.1	1.2	1.9
630727	1.3	1.2	1.2	3.5
630794	1.4	1.0	1.1	1.1

【表 1 3】

表 1 2 : 6 週目における C D 1 マウスの体重及び相対的な臓器の重量 (グラム)

ISIS 番号	BW 変化 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的肝臓重量 (g)	相対的脾臓重量 (g)
PBS	1.5	1	1	1
630497	1.3	1.2	1.0	1.1
630689	1.6	1.3	1.0	1.4
630692	1.5	1.9	0.9	1.2
630693	1.2	1.3	0.8	0.9
630719	0.8	1.4	1.1	0.4
647414	1.4	1.2	1.1	1.0
647419	1.5	1.0	1.1	1.2
647420	1.4	1.1	1.0	1.4
647421	1.2	1.1	1.1	1.3
647423	1.4	1.7	1.1	1.3
647424	1.1	1.8	1.2	0.6
647426	1.4	1.5	1.1	1.8
647428	1.3	1.4	1.1	1.9
647429	1.4	1.2	1.0	1.6
647442	1.3	1.1	1.1	1.1
647446	1.4	1.2	1.2	1.4
647447	1.5	1.3	1.2	1.4
647448	1.5	1.1	1.1	1.5
647449	1.5	1.1	1.1	1.6
647450	1.4	1.3	1.1	1.9
647451	1.4	1.6	1.0	1.8
647453	1.2	1.8	1.4	1.5
647454	1.5	1.6	1.0	2.2
647457	1.4	1.3	1.0	1.8
647475	1.4	1.2	1.1	1.5
647476	1.5	1.1	1.2	1.8
647477	1.5	1.2	1.0	1.5
647478	1.6	1.1	1.0	1.2
647482	1.4	1.7	1.2	1.5
647506	1.5	1.1	1.0	1.2
647508	1.6	1.0	1.0	1.2
647514	1.5	1.0	1.0	1.5
647531	1.4	1.0	1.0	1.4
647532	1.5	1.3	1.1	1.4

【0 4 2 3】

実施例 5 : Sprague - Dawley 系ラットにおけるヒト TMPRSS6 を標的

10

20

30

40

50

とするオリゴヌクレオチドの耐性

Sprague - Dawley 系ラットは、安全性及び有効性評価に使用される多目的モデルである。ラットを48個のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理して、上述の実施例に記載される試験のマウスにおける *in vitro* での効能及び耐性を示すことが分かり、様々な血漿化学マーカーのレベルの変化について評価した。

【0424】

処理

雄 Sprague - Dawley 系ラット（およそ8週齢）を12時間の明/暗周期に保持し、Purina 正常ラット固形飼料、食餌5001を自由に摂取させた。4匹の Sprague - Dawley 系ラットの群に、それぞれ、100mg/kgのMOEギャップマーまたは50mg/kgのcEt含有アンチセンスオリゴヌクレオチドを、1週間に1回6週間にわたって皮下注射した。最後の投与から1～2日後に、尿中タンパク質/クレアチニン比（P/C）をアッセイし、以下に記載の血液評価のために、最後の投与から3日後に血液を採取した。最後の投与から3日後に、ラットを安楽死させ、臓器及び血漿を採取してさらに分析した。

【0425】

血漿化学マーカー

ISISオリゴヌクレオチドが肝臓及び腎臓の機能に与える効果を評価するために、トランスアミナーゼ（アラニントランスアミナーゼ（ALT）及びアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST））の血漿レベル、総ビリルビン（Tbil）、アルブミン（Alb）、クレアチニン（Creat）、及びBUNを、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e、Melville、NY）を使用して測定した。結果を表13に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、肝臓機能マーカーまたは腎臓機能マーカーのいずれかのレベルの変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる試験で除外した。

10

20

【表 14】

表 13 : Sprague-Dawley 系ラットにおける血漿化学マーカー

ISIS 番号	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	60	92	18	0.3	0.1	3.7
585626	66	139	25	0.4	0.1	3.2
585653	92	154	26	0.4	0.1	3.9
585683	73	109	19	0.4	0.1	3.3
585698	66	104	22	0.4	0.1	3.4
585752	64	145	21	0.4	0.1	3.0
585758	113	669	21	0.3	0.2	2.8
585774	125	220	25	0.4	0.2	3.2
585775	66	117	24	0.4	0.1	3.2
585777	302	321	25	0.4	0.2	3.4
591466	368	444	22	0.4	0.2	3.1
591514	91	218	22	0.3	0.2	3.3
591579	484	655	20	0.4	0.2	3.8
614954	146	132	26	0.1	0.2	2.8
615895	291	383	26	0.4	0.2	3.4
615897	1946	1467	26	0.5	0.2	4.0
615899	70	113	25	0.4	0.1	3.4
615900	93	131	26	0.4	0.1	3.1
615903	59	70	22	0.4	0.1	3.5
630716	57	86	26	0.5	0.1	3.1
630718	61	72	23	0.4	0.1	3.4
630722	117	153	24	0.4	0.1	3.2
630794	90	113	29	0.5	0.1	3.4
630800	92	133	25	0.4	0.1	3.6
630948	48	77	21	0.4	0.1	3.3
630950	79	83	25	0.4	0.1	3.3
630952	208	243	31	0.4	0.2	2.9
630953	87	135	22	0.4	0.1	3.0
630957	110	115	26	0.4	0.1	3.6
637749	63	102	25	0.1	0.2	3.2
647384	135	158	24	0.4	0.1	3.7
647389	243	272	25	0.2	0.2	3.6
647391	205	520	27	0.0	1.1	2.1
647393	142	172	27	0.2	0.1	3.4
647394	391	340	29	0.1	0.2	2.8
647395	68	95	24	0.1	0.1	3.2
647419	53	66	23	0.4	0.1	3.5
647420	56	80	23	0.1	0.1	3.3
647446	66	110	23	0.2	0.1	3.4
647447	54	67	22	0.1	0.1	3.1
647448	55	73	26	0.4	0.1	3.3
647449	46	81	24	0.4	0.1	3.2
647475	45	78	26	0.4	0.1	3.5
647476	52	85	20	0.4	0.1	3.2
647477	58	89	24	0.5	0.1	3.5
647478	50	82.8	22.8	0.4	0.1	3.2
647506	45	95.3	22.9	0.4	0.1	3.2
647508	73	183.3	33.3	0.3	0.1	2.5
647532	108	179.5	47.8	0.5	0.1	1.8

10

20

30

【表 15】

表 14 : Sprague-Dawley 系ラットにおける尿中の P/C 比

PBS	1.0
585626	6.7
585653	9.4
585683	7.0
585698	6.2
585752	13.4
585758	11.5
585774	7.5
585775	6.7
585777	7.6
591466	8.0
591514	8.0
591579	7.3
614954	5.2
615895	2.9
615897	4.7
615899	4.2
615900	4.5
615903	5.7
630716	3.9
630718	4.5
630722	4.3
630794	2.3
630800	5.1
630948	2.4
630950	6.3
630952	6.6
630953	4.4
630957	3.8
637749	3.0
647384	2.2
647389	2.4
647391	3.4
647393	3.7
647394	9.9
647395	5.2
647419	5.0
647420	4.9
647446	3.8
647447	3.9
647448	5.6
647449	5.0
647475	4.1
647476	4.6
647477	5.8
647478	4.6
647506	4.7
647508	9.2
647532	49.4

10

20

30

【0426】

血液アッセイ

約 1.3 mL の血液の血液サンプルを、利用可能な試験動物それぞれから K_2 -EDTA を含む管に採取し、赤血球数 (RBC)、白血球細胞 (WBC) の数、個別の白血球数、例えば、単球、好中球、リンパ球のもの、ならびに血小板数、総ヘモグロビン含有量及びヘマトクリット (HCT) を測定して分析するために、IDEXX Laboratories, Inc. (Fremont, CA) に送った。結果を表 15 に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、血液マーカーのいずれかのレベルの変化を引き起こした ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる試験で除外した。

40

【表 16】

表 15 : Sprague-Dawley 系ラットにおける血液マーカー

ISIS 番号	WBC ($\times 10^3$ / μ L)	RBC ($\times 10^6$ / μ L)	HCT (%)	リンパ球 (/ mm^3)	単球 (/ mm^3)	血小板 ($\times 10^3$ / μ L)
PBS	4.8	8.5	52.7	3567	93	812
585626	10.1	8.3	46.9	8969	252	1237
585653	13.8	8.2	48.3	11190	359	1305
585683	17.8	7.9	45.7	15773	557	826
585698	16.9	7.9	46.0	15380	344	761
585752	15.3	8.0	46.0	11396	585	1158
585758	18.4	7.9	44.0	6369	61	1548
585774	14.7	8.5	48.6	12818	552	873
585775	7.3	8.4	48.4	6218	219	1161
585777	11.2	8.1	47.1	9548	175	982
591466	14.3	8.1	45.6	12519	226	812
591514	14.9	8.5	48.2	10993	169	1157
591579	12.5	9.1	51.1	8540	222	1080
614954	13.6	5.2	29.9	12186	441	511
615895	15.2	8.0	45.9	11868	603	926
615897	14.5	7.5	43.3	10920	786	902
615899	19.8	7.8	43.7	17319	525	566
615900	14.0	7.1	41.0	12167	267	770
615903	9.4	8.5	51.3	7113	268	687
630716	21.1	7.8	45.3	18994	449	601
630718	8.9	8.9	52.5	7071	269	657
630722	17.0	9.1	51.6	13397	721	693
630794	8.8	8.7	50.5	7098	137	529
630800	16.6	8.0	45.3	13210	478	695
630948	7.2	8.5	50.2	5359	158	670
630950	11.0	8.8	52.4	8833	307	544
630952	24.2	7.7	42.8	17991	798	958
630953	25.0	6.9	42.4	20205	713	662
630957	11.7	8.7	50.5	8913	340	684
637749	12.8	7.5	44.7	10837	765	661
647384	14.8	9.0	54.5	11682	354	642
647389	12.8	8.2	51.0	10621	534	1075
647391	16.8	2.3	20.3	13574	807	240
647393	14.5	6.9	40.8	12467	423	1112
647394	24.9	6.5	39.6	21847	1070	990
647395	10.4	7.4	45.2	8685	515	1092
647419	13.8	8.3	48.5	11866	257	939
647420	11.1	8.0	47.3	9350	521	1079
647446	5.9	7.5	44.8	4805	258	1076
647447	10.2	7.8	47.3	8542	260	1019
647448	10.7	7.9	45.3	9050	260	933
647449	21.1	7.7	45.5	18809	479	630
647475	17.4	8.3	49.0	14951	562	776
647476	14.2	8.3	47.7	12336	339	979
647477	16.8	8.3	46.3	14089	726	697
647478	23.7	7.4	42.9	22039	440	762
647506	12.9	7.9	45.4	11679	268	711
647508	12.2	6.8	38.8	9800	431	647
647532	33.1	5.3	31.0	27732	963	844

【0427】

体重及び臓器重量

全群のラットの体重を、実験の開始時と試験終了まで毎週測定した。肝臓、脾臓、腎臓の重量は、試験の最後にも測定し、ベースラインである PBS 対照群と比較した体重及び臓器重量の変化を表 16 に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、臓器重量を変化させた ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表 17】

表 16 : 6週目におけるSprague-Dawley系ラットにおける体重及び相対的な臓器の重量 (グラム)

IS1S番号	肝臓 (g)	腎臓 (g)	脾臓 (g)	体重 (g)
PBS	1.0	1.0	1.0	1.8
585626	1.1	0.9	2.3	1.4
585653	1.1	1.0	2.1	1.5
585683	1.1	0.9	3.3	1.4
585698	1.1	0.9	2.8	1.4
585752	1.1	0.9	2.5	1.3
585758	1.5	0.9	2.3	1.2
585774	1.1	0.9	2.2	1.4
585775	1.0	0.9	1.7	1.3
585777	1.0	0.9	2.3	1.4
591466	1.0	0.9	2.7	1.3
591514	1.1	1.0	2.4	1.1
591579	1.0	0.8	1.9	1.3
614954	1.4	1.3	4.1	1.4
615895	1.0	1.1	1.7	1.5
615897	1.3	1.1	2.1	1.7
615899	1.1	1.1	2.0	1.6
615900	1.2	1.2	2.1	1.8
615903	1.2	1.0	1.5	1.9
630716	1.1	1.1	2.8	1.6
630718	1.1	1.0	2.1	1.8
630722	1.2	1.2	1.6	1.5
630794	0.9	1.0	1.6	1.8
630800	1.3	1.3	2.4	1.6
630948	1.0	1.1	1.7	1.9
630950	1.2	1.0	2.3	1.8
630952	1.4	1.3	2.6	1.2
630953	1.4	1.2	4.2	1.6
630957	1.2	1.0	1.7	1.6
637749	1.4	1.3	4.4	1.4
647384	1.0	1.0	1.1	1.7
647389	1.0	1.1	1.8	1.7
647391	1.8	1.5	13.1	1.4
647393	1.3	1.1	1.8	1.6
647394	1.2	1.2	2.8	1.6
647395	1.3	1.3	1.8	1.7
647419	1.3	1.1	1.6	1.8
647420	1.2	1.1	2.1	1.6
647446	1.3	1.2	2.3	1.8
647447	1.1	1.1	1.9	1.7
647448	1.2	1.2	1.6	1.7
647449	1.2	1.2	1.7	1.7
647475	1.2	1.1	1.5	1.7
647476	1.1	1.1	1.5	1.5
647477	1.2	1.1	1.7	1.6
647478	1.2	1.3	1.8	1.7
647506	1.2	1.3	2.0	1.6
647508	1.7	2.1	2.9	1.3
647532	2.0	1.7	3.7	1.3

【0428】

実施例 6 : トランスジェニックマウスモデルにおけるTMPRSS6のアンチセンス阻害の効果

上記ラットの試験において耐性を確認した約32個のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、ヒトTMPRSS6導入遺伝子(「huTMPRSS6」または「Tg」マウス)を有するマウスのヒトTMPRSS6 mRNA転写を減少させる能力についてさらに評価した。

10

20

30

40

50

【 0 4 2 9 】

処理

8 ~ 16 週 齢 の 雄 及 び 雌 h u T M P R S S 6 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク マ ウ ス に、 T M P R S S 6 を 標 的 と す る I S I S ア ン チ セ ン ス オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド を 1 回 の 投 与 に つ き 6 m g / k g で 2 週 間 に わ た っ て 5 回 (合 計 3 0 m g / k g) 皮 下 注 射 に よ り 投 与 す る か、 ま た は 対 照 と し て P B S を 投 与 し た。 各 処 理 群 は 4 匹 の マ ウ ス で 構 成 し た。 最 後 の 投 与 か ら 4 8 時 間 後 に、 各 マ ウ ス か ら 血 液 を 採 取 し、 マ ウ ス を 屠 殺 し て、 組 織 を 回 収 し た。

【 0 4 3 0 】

R N A 分 析

試 験 の 最 後 に、 肝 臓 の T M P R S S 6 m R N A 発 現 に つ い て リ ア ル タ イ ム P C R 分 析 を 行 う た め に、 肝 臓 か ら R N A を 抽 出 し た。 結 果 は、 P B S で 処 理 さ れ た 動 物 に 対 す る 阻 害 率 と し て、 表 1 7 に 示 す。 ヒ ト プ ラ イ マ ー プ ロ ー プ セ ャ ッ ト R T S 4 5 8 6 (配 列 番 号 8 6 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る 正 方 向 配 列 T G A T A A C A G C T G C C C A C T G ; 配 列 番 号 8 7 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る 逆 方 向 配 列 T C A C C T T G A A G G A C A C C T C T ; 配 列 番 号 8 8 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る プ ロ ー プ 配 列 A G T T C T G C C A C A C C T T G C C C A) を 使 用 し て m R N A レ ベ ル を 測 定 し た。 m R N A レ ベ ル を、 ハ ウ ス キ ー ピ ン グ 遺 伝 子 の シ ク ロ フ ィ リ ン A の レ ベ ル で 正 規 化 し、 プ ラ イ マ ー プ ロ ー プ セ ャ ッ ト m C Y C L O _ 2 4 (配 列 番 号 8 9 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る 正 方 向 プ ラ イ マ ー T C G C C G C T T G C T G C A ; 配 列 番 号 9 0 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る 逆 方 向 プ ラ イ マ ー A T C G G C C G T G A T G T C G A ; 配 列 番 号 9 1 と し て 本 明 細 書 で 示 さ れ る プ ロ ー プ C C A T G G T C A A C C C C A C C G T G T T C) を 使 用 し て 測 定 し た。

10

20

【表 18】

表 17 : P B S 発現に正規化されたトランスジェニックマウスの腎臓における
T M P R S S 6 m R N A の阻害率 (%)

I S I S 番号	%阻害
5 8 5 6 2 6	5 7
5 8 5 6 5 3	7 4
5 8 5 6 8 3	8 1
5 8 5 6 9 8	5 9
5 8 5 6 9 8	5 9
5 8 5 7 7 4	6 9
5 8 5 7 7 5	8 1
5 9 1 5 1 4	7 3
6 1 5 8 9 9	8 8
6 1 5 9 0 0	8 8
6 1 5 9 0 3	9 7
6 3 0 7 1 6	8 2
6 3 0 7 1 8	9 9
6 3 0 7 2 2	9 2
6 3 0 7 9 4	7 1
6 3 0 8 0 0	8 1
6 3 0 9 4 8	6 5
6 3 0 9 5 0	8 1
6 3 0 9 5 7	7 0
6 4 7 3 8 4	6 6
6 4 7 3 9 3	9 5
6 4 7 3 9 5	1 0 0
6 4 7 4 1 9	9 9
6 4 7 4 2 0	9 6
6 4 7 4 4 6	8 4
6 4 7 4 4 7	8 9
6 4 7 4 4 8	9 6
6 4 7 4 4 9	8 8
6 4 7 4 7 5	8 4
6 4 7 4 7 6	8 4
6 4 7 4 7 7	9 6
6 4 7 4 7 8	9 1
6 4 7 5 0 6	9 1

10

20

30

【0431】

実施例 7 : G a l N A c₃ 標的 T M P R S S 6 と共役されるアンチセンス化合物

上記実施例において、効力及び耐性が確認された T M P R S S 6 を標的とする選択されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を親配列として選択して、ヒト T M P R S S 6 を標的とする新たな G a l N A c₃ 共役アンチセンス化合物を設計した。

【0432】

以下の表 18 を要約されているように、当該実施例に記述される、新たに設計されたアンチセンス化合物のそれぞれは、5' - トリスヘキシルアミノ - (T H A) - C 6 G a l N A c₃ エンドキャップを有した。I S I S 7 0 2 8 4 3 は、5' - トリスヘキシルアミノ - (T H A) - C 6 G a l N A c₃ エンドキャップと混合した (ホスホロチオエート及びリン酸ジエステル基) 骨格を有する 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーであった。I S I S 7 0 5 0 5 1、7 0 5 0 5 2 及び 7 0 5 0 5 3 は、5' - トリスヘキシルアミノ - (T H A) - C 6 G a l N A c₃ エンドキャップを含むホスホロチオエート骨格を有する 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーであった。I S I S 7 0 6 9 4 0 は、全てのホスホロチオエートヌクレオシド間結合及び 5' - トリスヘキシルアミノ - (T H A) - C 6 G a l N A c₃ エンドキャップを有する 3 - 1 0 - 3 c E t ギャップマーであり、I S I S 7 0 6 9 4 1、7 0 6 9 4 2 及び 7 0 6 9 4 3 はデオキシ、M O E、及び 5' - トリスヘキシルアミノ - (T H A) - C 6 G a l N A c₃ エンドキャップ含むホスホロチオエート骨格を有する (S) - c E t 含有ギャップマーである。

40

【表 19】

表 18 : TMPRSS6 mRNAを標的とする8個の非共役アンチセンス化合物及び対応するGalNAc₃共役アンチセンス化合物

親配列ISIS番号	GalNAc共役ISIS番号	骨格	長さ	配列	化学名	配列番号
585774	702843	MBB	20	CTTTATTCCAA AGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585774	705051	PS	20	CTTTATTCCAA AGGGCAGCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	36
585683	705052	PS	20	GCACGGCAAAT CATACTTCT	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	23
585775	705053	PS	20	AGCTTTATTCC AAAGGGCAG	5'-THA GalNAc ₃ 5-10-5 MOE	37
630718	706940	PS	16	AGCTTTATTCC AAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kkk-d10-kkk	63
647477	706941	PS	16	AGCTTTATTCC AAAGG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d8-eeeekk	63
647449	706942	PS	16	CAGCTTTATTCC CAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kk-d9-eeeekk	77
647420	706943	PS	16	CAGCTTTATTCC CAAAG	5'-THA GalNAc ₃ kek-d9-eeek	77

10

【0433】

20

表 18 に記載のオリゴヌクレオチド配列は全て、ヒトとアカゲザル配列の両方に相補的であった。本明細書に記載の試験が行われたとき、TMPRSS6 についてのカニクイザルゲノム子配列は、国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) で入手できなかったため、ヒトTMPRSS6を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとカニクイザル遺伝子配列との交差反応を確認することができなかった。代わりに、相同性について、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列とアカゲザル配列とを比較した。アカゲザル配列と相同性を有するISISオリゴヌクレオチドは、カニクイザル配列とも完全に交差反応があることが予測される。

【0434】

30

GalNAc 共役について選択されたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アカゲザルゲノム配列と完全に相補的である (配列番号 95 として本明細書で示される、ヌクレオチド 380000 ~ 422000 から切断した GENBANK 寄託番号 NW_001095180.1 の補体)。アカゲザル配列に対する各オリゴヌクレオチドの開始部位及び終了部位を表 19 に示し、ヒト配列に対する各オリゴヌクレオチドの開始部位及び終了部位を表 20 に示す。「開始部位」は、ギャップマーがアカゲザルまたはヒト配列において標的とされる 5' 末端ヌクレオチドを示す。

【表 20】

表 19 : アカゲザルの TMPRSS6 ゲノム配列 (配列番号 95) に相補的な ASO

ISIS 番号	アカゲザル開始部位	アカゲザル終了部位	化学名	配列	配列番号
585774	40518	40537	5'-10-5 MOE	CTTTATTCCAA AGGGCAGCT	36
702843	40518	40537	5'-THA GalNAc3 5'-10-5 MOE	CTTTATTCCAA AGGGCAGCT	36
705051	40518	40537	5'-THA GalNAc3 5'-10-5 MOE	CTTTATTCCAA AGGGCAGCT	36
705052	22499	22518	5'-THA GalNAc3 5'-10-5 MOE	GCA CGGC AAA T CAT ACTTCT	23
705053	40520	40539	5'-THA GalNAc3 5'-10-5 MOE	AGCTTTATTCC AAAGGGCAG	37
630718	40524	40539	kkk-10-kkk	AGCTTTATTCC AAAGG	63
706940	40524	40539	5'-THA GalNAc3 kkk-10-kkk	AGCTTTATTCC AAAGG	63
706941	40524	40539	5'-THA GalNAc3 kk-8-eeeekk	AGCTTTATTCC AAAGG	63
706942	40525	40540	5'-THA GalNAc3 kk-9-eeeekk	CAGCTTTATTTC CAAAG	77
706943	40525	40540	5'-THA GalNAc3 kk-9-eeeekk	CAGCTTTATTTC CAAAG	77

【表 21】

表 20 : GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドによって標的化された TMPRSS6 mRNA (配列番号 1) 及び/またはゲノム配列 (配列番号 2) の部位

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終了部位	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終了部位	配列番号
702843	3162	3181	44924	44943	36
705051	3162	3181	44924	44943	36
705052	1286	1305	26046	26065	23
705053	3164	3183	44926	44945	37
706940	3168	3183	44930	44945	63
706941	3168	3183	44930	44945	63
706942	3169	3184	44931	44946	77
706943	3169	3184	44931	44946	77

【0435】

実施例 8 : CD-1 マウスにおけるヒト TMPRSS6 を標的とする GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの耐性

CD1 (登録商標) マウス (Charles River, MA) を、上記表 18 に記載される ISIS GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理し、様々な血漿化学マーカーのレベルの変化について評価した。

【0436】

処理

6 週齢の雄 CD1 マウスの群 (処理群につき n = 4) に、40 mg / kg の ISIS MOE ギャップマー GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド (80 mg / kg / 週の用量)、または上記表 14 の 20 mg / kg の ISIS (S) - cet 含有ギャップマー GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド (40 mg / kg / 週の用量) を 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した。雄 CD1 マウスの 1 つの群には、PBS を 1 週間に 2 回 6 週間にわたって皮下注射した。最後の投与から 48 時間後にマウスを安楽死させ、臓器及び血漿を採取してさらに分析した。肝臓、腎臓、脾臓、心臓及び肺を組織診断のために採取し、血漿を採取して特定の血漿化学マーカーのレベルを測定した。

【0437】

血漿化学マーカー

ISIS GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが肝臓及び腎臓の機能に与える効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿レベル、ビリルビン、アルブミン、クレアチニン、及びBUNを、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e、Melville、NY）を使用して測定した。結果を表21に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、肝臓機能マーカーまたは腎臓機能マーカーのいずれかのレベルの変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表22】

表21：6週目におけるCD1マウスの血漿化学マーカー

ISIS番号	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	Creat (mg/dL)	Tbil (mg/dL)	Alb (g/dL)
PBS	32	70	27.3	0.12	0.17	2.8
702843	59	72	28	0.17	0.16	2.9
705051	47	73	26.6	0.16	0.17	2.8
705052	81	94	26.3	0.16	0.17	2.8
705053	139	129	28.2	0.17	0.18	2.9
706940	46	66	28.1	0.18	0.14	3.0
706941	40	57	25.5	0.18	0.16	2.9
706942	195	145	27	0.16	0.14	3.0
706943	178	144	26.1	0.16	0.16	3.9

【0438】

体重及び臓器重量

全群のマウスの体重を、実験の開始時と試験終了まで毎週測定した。肝臓、腎臓及び脾臓の重量は、試験の最後にも測定し、ベースラインのPBS対照群と比較した体重及び臓器重量の変化を表22に示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、臓器の重量を変化させたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表23】

表22：6週目のCD1マウスの体重及び相対的な臓器の重量の変化（グラム）

ISIS番号	BW変化 (g)	相対的な肝臓の重量 (g)	相対的な腎臓の重量 (g)	相対的な脾臓の重量 (g)
PBS	1.41	1.00	1.00	1.00
702843	1.39	1.05	1.00	1.08
705051	1.38	0.98	1.00	1.05
705052	1.39	1.02	0.96	1.32
705053	1.37	1.03	0.98	1.22
706940	1.31	0.97	1.01	1.16
706941	1.39	0.90	0.98	1.12
706942	1.39	1.09	1.09	1.40
706943	1.44	1.06	1.02	1.08

【0439】

血液検査

CD1マウスにおけるISIS GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが血液学的パラメータに与える効果について評価するために、約1.3mLの血液の血液サンプルを、利用可能な試験動物それぞれからK₂-EDTAを含む管に採取した。サンプルは、赤血球（RBC）の数、白血球細胞数（WBC）、個別の白血球数、例えば、単球、好中球、リンパ球のもの、ならびに血小板数、ヘモグロビン含有量及びヘマトクリットについて、ADVIA120血液分析器（Bayer、USA）を使用して分析した。結果を表23に示す。

【0440】

データは、オリゴヌクレオチドが、当該用量で、アンチセンスオリゴヌクレオチドにつ

いての予想範囲を超えて、血液学的パラメータを有意に変化させなかったことを示している。概して、ISIS GalNAc 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、マウスの血液学的パラメータの観点から耐性が良好であった。

【表 2 4】

表 2 3 : CD 1 マウスの血球数

ISIS 番号	WBC ($\times 10^3$ / μL)	RBC ($\times 10^6$ / μL)	HCT (%)	リンパ球 (/ mm^3)	単球 (/ mm^3)	血小板 ($\times 10^3$ / μL)
PBS	2.9	8.9	49.9	1916.5	38.8	659.0
702843	4.9	8.9	48.5	3630.0	90.3	700.5
705051	4.0	8.5	47.8	2961.0	80.7	781.3
705052	3.2	9.3	50.7	2553.7	146.0	750.7
705053	5.3	9.1	49.8	3856.0	179.5	913.3
706940	3.7	8.5	46.7	2591.3	154.0	935.3
706941	5.5	8.8	49.9	3940.3	177.5	911.8
706942	5.7	9.4	51.8	4126.3	155.3	955.7
706943	3.4	8.9	48.2	3067.0	0.0	1021.3

10

【0 4 4 1】

CD - 1 マウスの肝臓、腎臓、心臓及び肺における GalNAc 共役 TMPRSS6 アンチセンス化合物の組織学的評価を実施した。概して、GalNAc₃ 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役オリゴヌクレオチドより腎臓において約 8 倍の活性を有する用量で投与したにもかかわらず、TMPRSS6 の阻害に良好な耐性を有する有用な化合物であり、鉄蓄積疾患、障害または病態の治療の重要な候補である。

20

【0 4 4 2】

実施例 9 : huTMPRSS6 トランスジェニックマウスにおける TMPRSS6 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応

TMPRSS6 (ISIS 番号 702843、705051、705052、705053、706940、706941、706942 及び 706943) を標的とする 8 個の ISIS GalNAc₃ 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドならびに 2 つの親化合物 (ISIS585774 及び ISIS630718) に対して、huTMPRSS6 トランスジェニックマウスにおける ヒト TMPRSS6 mRNA 発現を阻害する能力について用量反応試験で試験を行い、評価した。

30

【0 4 4 3】

処理

huTMPRSS6 Tg マウスを 12 時間の明 / 暗周期で保持し、正常ラット固形飼料を自由に摂取させた。マウスは、実験の開始前に研究施設で少なくとも 7 日間順応させた。アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を緩衝生理食塩水 (PBS) で調製し、0.2 ミクロンのフィルターで濾過することによって無菌にした。オリゴヌクレオチドを 0.9 % の PBS に、注射のために溶解した。

【0 4 4 4】

およそ 3.5 ~ 4.5 週齢の雄及び雌 huTMPRSS6 マウスを、それぞれ 4 匹のマウスの 4 4 の群に分けた (各群、2 匹の雄と 2 匹の雌の群)。マウスに ISIS オリゴヌクレオチドを 1 週間に 2 回 3 週間にわたって皮下注射した。マウスの 1 つの群に、PBS を、1 週間に 2 回 3 週間にわたって皮下注射した。最後の投与から 48 時間後に、各マウスから血液を採取し、マウスを屠殺し、組織を採取した。

40

【0 4 4 5】

RNA 分析

処理期間の最後に、ヒト TMPRSS6 mRNA 発現の定量的リアルタイム PCR 分析及び測定を行うために、全 RNA をトランスジェニックマウスの肝臓から抽出した。TMPRSS6 mRNA レベルを、ハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン A のレベル

50

で正規化し、mCYCLO_24プライマープロブセットを使用して、標準プロトコルに従って測定した。結果は、PBS処理対照に正規化され、「%PBS」として示される各処理群についてのTMPRSS6 mRNAレベルの平均パーセントとして、以下の表24に示す。100超の値は、単純に「100」として示される。負の値は、単純に「0」として示される。

【0446】

ヒトプライマープロブセットRTS4586（配列番号86として本明細書で示される正方向配列TGATAACAGCTGCCCACTG；配列番号87として本明細書で示される逆方向配列TCACCTTGAAAGGACACCTCT；配列番号88として本明細書で示されるプロブ配列AGTTCTGCCACACCTTGCCCA）を使用してmRNAレベルを測定した。

【表25】

表24：TgマウスにおけるTMPRSS6を標的とする8個のISIS GalNAc₃共役及び2つの非共役化合物への応答

処理	用量 (mpk/wk)	TMPRSS6 % PBS	TMPRSS6 % 阻害
585774	100	4	96
	30	35	65
	10	99	1
	3	100	0
702843	10	0	100
	3	16	84
	1	55	45
	0.3	100	0
705051	10	1	99
	3	68	32
	1	72	28
	0.3	100	0
705052	10	28	72
	3	23	77
	1	100	0
	0.3	100	0
705053	10	7	93
	3	30	70
	1	100	0
	0.3	100	0
630718	30	0	100
	10	37	63
	3	100	0
	1	100	0
706940	3	0	100
	1	4	96
	0.3	52	48
	0.1	100	0
706941	3	8	92
	1	71	29
	0.3	100	0
	0.1	100	0
706942	3	2	98
	1	47	53
	0.3	82	18
	0.1	100	0
706943	3	2	98
	1	15	85
	0.3	100	0
	0.1	100	0

【0447】

血漿化学マーカー

ISISオリゴヌクレオチドが肝臓及び腎臓の機能に与える効果を評価するために、ト

ランスアミナーゼの血清レベル、ビリルビン及びBUNを、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e、Melville、NY）を使用して測定し、以下の表25に示した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想される範囲外で、肝臓機能マーカーまたは腎臓機能マーカーのいずれかのレベルの変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる試験から除外した。

【表26】

表25：トランスジェニックマウスにおけるTMPRSS6を標的とする8個のISIS GalNAc₃修飾ASO及び2つの非共役化合物の血清化学

	用量 (mg/kg/wk)	ALT	AST	BUN
PBS	n/a	39.5	64.8	40.4
585774	100	40.8	68.5	42.5
	30	36.5	70.8	37.2
	10	38.5	59.0	38.9
	3	39.8	59.5	41.6
702843	10	38.3	57.3	35.6
	3	41.8	65.5	38.9
	1	41.8	100.3	34.7
	0.3	43.3	65.3	38.8
705051	10	47.3	79.8	35.4
	3	37.0	58.5	34.9
	1	33.0	57.0	35.7
	0.3	42.0	67.5	34.6
705052	10	34.8	61.5	33.9
	3	37.0	62.5	32.8
	1	35.8	57.8	35.1
	0.3	35.0	65.0	34.1
705053	10	39.0	55.8	32.4
	3	35.3	62.8	38.6
	1	39.8	73.5	36.6
	0.3	39.5	73.3	37.9
630718	30	58.8	160.8	37.7
	10	38.3	73.0	33.8
	3	39.3	92.3	32.8
	1	38.0	67.8	35.0
706940	3	36.3	54.8	33.7
	1	39.8	65.0	35.7
	0.3	38.3	66.8	34.9
	0.1	36.8	52.8	31.8
706941	3	37.5	59.0	31.6
	1	34.3	75.8	32.3
	0.3	40.5	72.8	34.9
	0.1	45.3	63.8	31.3
706942	3	34.3	90.5	35.8
	1	36.8	58.3	32.8
	0.3	46.8	270.0	39.8
	0.1	35.5	76.5	31.0
706943	3	35.5	81.3	34.6
	1	33.3	71.8	31.0
	0.3	35.0	54.5	32.2
	0.1	42.3	60.0	33.1

【0448】

全てのGalNAc共役ASOは耐性が良好であり、臓器重量及び体重ならびに血清ランスアミナーゼレベルの大きな変化を示さなかった。

【0449】

各ASOの最大半量有効用量（ED₅₀）を計算し、以下の表26に表す。

【表 27】

表 26 : T M P R S S 6 を標的とする 8 個の I S I S G a l N A c₃ 修飾 A S O 及び 2 つの非共役化合物の効力

I S I S 番号	E D ₅₀ (m p k / w k)
5 8 5 7 7 4	2 6 . 0
7 0 2 8 4 3	~ 1 . 0
7 0 5 0 5 1	3 . 7
7 0 5 0 5 2	~ 2 . 7
7 0 5 0 5 3	~ 2 . 8
6 3 0 7 1 8	~ 9 . 7
7 0 6 9 4 0	~ 0 . 3
7 0 6 9 4 1	1 . 3
7 0 6 9 4 2	0 . 9
7 0 6 9 4 3	~ 0 . 9

10

【 0 4 5 0 】

E D₅₀ 計算値は、G a l N A c 共役 A S O が、非共役 A S O より約 1 0 倍もの効能があることを示した。I S I S 7 0 2 8 4 3 は、最も強力な G a l N A c 共役 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマー化合物であった。

20

【 0 4 5 1 】

実施例 1 0 : T M P R S S 6 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度の評価

アンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度を、4 0 c P 超の粘度を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを排除するために測定した。4 0 c P 超の粘度を有するオリゴヌクレオチドは、対象への投与に適してない。

【 0 4 5 2 】

I S I S オリゴヌクレオチド (3 2 ~ 3 5 m g) を、ガラス製バイアルに加え、1 2 0 μ L の水を添加し、アンチセンスオリゴヌクレオチドを 5 0 でバイアルを加熱することによって、溶液に溶解させた。加熱前の試料の部分 (7 5 μ L) をマイクロ粘度計 (C a m b r i d g e) に分注した。マイクロ粘度計の温度を 2 5 に設定し、試料の粘度を測定した。加熱前の試料の別の部分 (2 0 μ L) を、8 5 、2 6 0 n M での UV 読み取り (C a r y U V i n s t r u m e n t) を行うために、1 0 m L の水に分注した。結果は表 2 7 に示されるが、大部分の G a l N A c アンチセンスオリゴヌクレオチドの溶液は、前述の基準の下で粘度が最適であることを示している。アンチセンスオリゴヌクレオチド 7 0 6 9 4 1 は、試験を行ったアンチセンスオリゴヌクレオチドの中で唯一、4 0 c P 超の粘度レベルを有するものであった。

30

【表 28】

表 27 : G a l N A c 共役 A S O の粘度データ

I S I S 番号	化学名	c P
7 0 2 8 4 3	5' - T H A G a l N A c ₃ 5 - 1 0 - 5 M O E (M B B)	3 3
7 0 5 0 5 1	5' - T H A G a l N A c ₃ 5 - 1 0 - 5 M O E (P S)	2 3
7 0 5 0 5 2	5' - T H A G a l N A c ₃ 5 - 1 0 - 5 M O E (P S)	1 6
7 0 5 0 5 3	5' - T H A G a l N A c ₃ 5 - 1 0 - 5 M O E (P S)	2 6
7 0 6 9 4 0	5' - T H A G a l N A c ₃ k k k - 1 0 - k k k (P S)	3 9
7 0 6 9 4 1	5' - T H A G a l N A c ₃ k k - 8 - e e e e k k (P S)	5 4
7 0 6 9 4 2	5' - T H A G a l N A c ₃ k k - 9 - e e e k k (P S)	2 0
7 0 6 9 4 3	5' - T H A G a l N A c ₃ k e k - 9 - e e k k (P S)	1 9

40

【 0 4 5 3 】

50

実施例 11：カニクイザルにおける、GalNAc₃ 共役体を含むTMPRSS6 を標的とするオリゴヌクレオチドによる *in vivo*でのアンチセンス阻害

当該試験が行われたとき、TMPRSS6 についてのカニクイザルゲノム配列は、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のデータベースで入手できなかったため、ヒトTMPRSS6 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドとカニクイザル遺伝子配列との交差反応を確認することができなかった。代わりに、上記実施例 6 に記載されるように、相同性について、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列をアカゲザル配列と比較した。アカゲザル配列に対する相同性を有するISIS オリゴヌクレオチドは、カニクイザル配列とも完全に交差反応があることが予測される。

【0454】

カニクイザルにおいて試験するために選択された 10 個のヒトTMPRSS6 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記実施例 6 に記載されるアカゲザルゲノム配列（配列番号 95）と 0 のミスマッチを有した。

【0455】

試験デザイン

10 個のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、有効性及び耐性について、ならびに肝臓及び腎臓の薬物動態プロファイルについて、雄カニクイザルにおけるTMPRSS6 mRNA のアンチセンス阻害の 13 週にわたる試験で評価した。サルを、8 個のISIS GalNAc₃ 修飾ASO、及び表 28 に示されるTMPRSS6 を標的とする 2 個の非共役親アンチセンスオリゴヌクレオチドアンチセンスオリゴヌクレオチドを皮下投与することによって処理した。

【表 29】

表 28：カニクイザルの試験で比較したASO

群	ISIS 番号	用量
1	PBS Control	n/a
2	585774	25 mpk
3	705051	30 mpk
4	705052	30 mpk
5	705053	30 mpk
6	702843	30 mpk
7	705051	5 mpk
8	702843	5 mpk
9	630718	23 mpk
10	706940	30 mpk
11	706941	30 mpk
12	706942	30 mpk
13	706943	30 mpk
14	706940	5 mpk

【0456】

GalNAc 共役ASOの高用量（30 mpk）の群により毒性を評価した。GalNAc 共役ASOの低用量（5 mpk）の群と、対応する非共役親配列とを比較して活性を評価した。群 2、3、6、7 及び 8 は、同じ配列であり、混合された骨格（MBB）化合物ISIS 番号 702843 を、低用量と高用量の両方で試験し、さらに完全なホスホロチオエート化合物ISIS 第 705051 と比較した（同様に低用量と高用量の両方で試験した）。群 9、10、11 及び 14 は、同じ配列であり、ISIS 番号 706940 を、低用量と高用量の両方で試験した。

【0457】

処理

試験の前に、サルを隔離し、その間、総体的な健康を毎日観察した。サルは2～4歳であり、体重が2～4kgであった。56匹のカニクイザルを、1群につき4匹のサルの14の処理群にランダムに割り付けた。サルに、ISSオリゴヌクレオチドまたはPBSを、適切な大きさのステンレス鋼投与針及びシリンジを使用して、最初の週は1日おきに、その後は1週間に1回の合計15回を11週間にわたって皮下注射した。最初の投与前1週目、その後9日目、16日目、30日目、44日目、58日目、72日目、及び86日目に再び尾を出血させた。

【0458】

10

試験期間中、病気または苦痛の兆候について、サルを1日2回観察した。処理、怪我または病気による瞬間的なまたはわずかな痛みまたは苦痛より大きな痛みまたは苦痛を経験している動物に対して、獣医学のスタッフが、試験責任者との相談の後、承認された鎮痛薬または薬剤を使用して治療を行い、痛みを取り除いた。健康状態が良くないまたは瀕死状態であると考えられる動物を特定して、さらなるモニタリングを行い、安楽死を想定した。動物の安楽死を計画して86日目に実行した。実施例に記載のプロトコルは、動物実験委員会(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))によって承認された。

【0459】

最初の投与前、及びその後の様々な時点で、臨床病理エンドポイント(血液検査、臨床化学、凝固、補体Bb及びC3、サイトカイン及びケモカイン分析)のために血液を採取し、尿中の化学的性質を測定した。実験期間のベースライン及び最後に、肝臓のTMPRSS6 mRNA発現、血清ヘプシジン(Intrinsic Life Sciences、San Diego、CA)、血清鉄及び血清トランスフェリン飽和等の特定の薬理学的エンドポイントを測定した。試験の最後に、体重及び臓器重量、組織の組織病理、ならびに肝臓及び腎臓のPK分析値を測定した。体重、サイトカインまたはアルブミンレベルの有意な変化は観察されなかった。

20

【0460】

TMPRSS6 RNA分析

試験の最後に、様々なプライマープロブセットを使用する、TMPRSS6のmRNA発現の測定のリアルタイムPCR分析のために、肝臓からRNAを抽出した。プライマープロブセットRTS3840を使用した代表的なデータを以下の表に示す。表29の結果は、生理食塩水対照と比較したTMPRSS6 mRNAの阻害率として表され、シクロフィリン(mCYCLO_24プライマープロブセット)で正規化した。

30

【表 3 0】

表 2 9 : 1 2 週 の A S O 投与後のサル肝臓TMPRSS6 mRNAの減少

処理	用量 (mg/kg)	%阻害	群
585774	25	76	2
705051	30	90	3
705052	30	64	4
705053	30	49	5
702843	30	89	6
705051	5	77	7
702843	5	82	8
630718	23	65	9
706940	30	71	10
706941	30	72	11
706942	30	93	12
706943	30	91	13
706940	5	61	14

10

【0461】

ISIS 番号 705051、702843、706942 及び 706943 はかなり有効性があり、13 週の投与後に 30 mpk で、89 % の標的減少を示した。

20

【0462】

ヘプシジン分析

血清ヘプシジンレベルを、以下の表 3 0 に示される時点で測定した。結果をパーセント生理食塩水対照として表す。「- 7 日目」は、最初の投与が行われる 1 週間前を示す。

【表 3 1】

表 3 0 : サルの血清ヘプシジンレベル

	用量 (mg/kg)	- 7 日目	9 日目	16 日目	44 日目	86 日目
生理食塩水	n/a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
585774	25	0.9	1.3	1.4	1.1	1.4
705051	30	0.9	1.1	1.5	1.5	1.8
702843	30	0.9	1.2	1.2	1.3	1.9
706942	30	0.7	1.0	1.5	1.3	1.9
706943	30	0.8	0.9	1.5	1.2	1.6

30

【0463】

表は、試験期間中に血清ヘプシジンレベルが増加したことを示す。

【0464】

血清鉄及びトランスフェリン飽和分析

14 の処理群のそれぞれの 4 匹の対象の平均値を以下の表 3 1 に示す。表 3 1 に示されるように、血清鉄レベル及びトランスフェリン飽和 (「Tf sat」) は、対照群と比較して、処理群において 86 日目に減少した。

40

【表 3 2】

表 3 1 : 8 6 日目におけるサルの血清鉄及びトランスフェリン飽和のレベル

群番号	処理	用量 (m g / k g)	鉄	T f 飽和
1	生理食塩水	n / a	1 2 5 . 7	3 8 . 8
2	5 8 5 7 7 4	2 5	5 5 . 2	1 5 . 7
3	7 0 5 0 5 1	3 0	3 6 . 6	1 0 . 0
4	7 0 5 0 5 2	3 0	6 1 . 9	1 5 . 8
5	7 0 5 0 5 3	3 0	9 6 . 0	2 7 . 0
6	7 0 2 8 4 3	3 0	4 2 . 3	1 3 . 3
7	7 0 5 0 5 1	5	6 3 . 7	2 0 . 0
8	7 0 2 8 4 3	5	5 1 . 7	1 6 . 5
9	6 3 0 7 1 8	2 3	6 1 . 4	1 7 . 7
1 0	7 0 6 9 4 0	3 0	7 1 . 6	2 0 . 5
1 1	7 0 6 9 4 1	3 0	5 5 . 7	1 5 . 8
1 2	7 0 6 9 4 2	3 0	2 5 . 9	6 . 9
1 3	7 0 6 9 4 3	3 0	3 0 . 3	7 . 4
1 4	7 0 6 9 4 0	5	8 2 . 8	2 3 . 7

ある態様において、本発明は以下であってもよい。

〔態様 1〕配列番号 1 の核酸塩基 3 1 6 2 ~ 3 1 8 4 の等しい長さの部分と相補的な少なくとも 8 個の連続した核酸塩基の部分を含む核酸塩基配列を有する 1 2 ~ 3 0 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 8 0 % 相補的である、前記化合物。

〔態様 2〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、1 5 ~ 3 0、1 5 ~ 2 5、1 5 ~ 2 4、1 6 ~ 2 4、1 7 ~ 2 4、1 8 ~ 2 4、1 9 ~ 2 4、2 0 ~ 2 4、1 9 ~ 2 2、2 0 ~ 2 2、1 6 ~ 2 0、1 6 または 2 0 個の連結したヌクレオシドから成る、態様 1 に記載の化合物。

〔態様 3〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 の等しい長さの部分と相補的な少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、少なくとも 2 0 の連続した核酸塩基の部分を含む核酸塩基配列を含む、態様 1 に記載の化合物。

〔態様 4〕前記修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列が、配列番号 1 と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または 1 0 0 % 相補的である、先行態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 5〕配列番号 6 3、7 7 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6 個の連続した核酸塩基を含む、核酸塩基配列を有する 1 2 ~ 3 0 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む、化合物。

〔態様 6〕配列番号 2 3、3 6、3 7 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、または 2 0 個の連続した核酸塩基を含む、核酸塩基配列を有する 1 2 ~ 3 0 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む、化合物。

〔態様 7〕1 2 ~ 3 0 個の連結したヌクレオシドから成り、配列番号 3 6 の核酸塩基配列の少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 1 0、少なくとも 1 1、少なくとも 1 2、少なくとも 1 3、少なくとも 1 4、少なくとも 1 5、少なくとも 1 6、少なくとも 1 7、少なくとも 1 8、少なくとも 1 9、または 2 0 個の連続した核酸塩基を含む、核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む、化合物。

〔態様 8〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、一本鎖である、前記態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 9〕少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、修飾ヌクレオシド間結合である、先行態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 10〕少なくとも 1 つの修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、態様 9 に記載の化合物。

〔態様 11〕修飾ヌクレオシド間結合のそれぞれが、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、態様 9 に記載の化合物。

〔態様 12〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの修飾糖を含む、先行態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 13〕少なくとも 1 つの修飾糖が、二環糖である、態様 12 に記載の化合物。

〔態様 14〕少なくとも 1 つの修飾糖が、2' - O - メトキシエチル、拘束エチル、3' - フルオロ - HNA、または 4' - (CH₂)_n - O - 2' 架橋を含み、ここで n が 1 または 2 である、態様 12 に記載の化合物。

〔態様 15〕少なくとも 1 つのヌクレオシドが、修飾核酸塩基を含む、先行態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 16〕前記核酸塩基が、5 - メチルシトシンである、態様 15 に記載の化合物。

〔態様 17〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、12 ~ 30 個の連結したヌクレオシドから成り、

a . 連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、
b . 連結したヌクレオシドから成る 5' ウイングセグメント、及び
c . 連結したヌクレオシドから成る 3' ウイングセグメントを含み、
前記ギャップセグメントが、5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントとの間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を含む、先行態様のいずれかに記載の化合物。

〔態様 18〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、16 ~ 20 個の連結したヌクレオシドから成る、態様 17 に記載の方法。

〔態様 19〕前記修飾オリゴヌクレオチドが、20 個の連結したヌクレオシドから成り、
a . 10 個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、
b . 5 個の連結したヌクレオシドから成る 5' ウイングセグメント、及び
c . 5 個の連結したヌクレオシドから成る 3' ウイングセグメントを含み、
前記ギャップセグメントが、5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントとの間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが、2' - O - メトキシエチル糖を含み、少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基が、5 - メチルシトシンである、態様 17 に記載の化合物。

〔態様 20〕配列番号 36 の少なくとも 8 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 20 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、

a . 10 個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、
b . 5 個の連結したヌクレオシドから成る 5' ウイングセグメント、
c . 5 個の連結したヌクレオシドから成る 3' ウイングセグメント、及び
d . Ga1NAc 共役体を含み、
前記ギャップセグメントが 5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントとの間に位置し、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが 2' - O - メトキシエチル糖を含み、少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基が 5 - メチルシトシンである、前記化合物。

〔態様 21〕配列番号 77 の少なくとも 8 個の連続した核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する 16 個の連結したヌクレオシドから成る修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、

a . 9 個の連結したデオキシヌクレオシドから成るギャップセグメント、

10

20

30

40

50

- b . 3 個の連結したヌクレオシドから成る 5' ウィングセグメント、
- c . 4 個の連結したヌクレオシドから成る 3' ウィングセグメント、及び
- d . G a l N A c 共役体を含み、

前記ギャップセグメントが 5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置し、各ウィングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を含み、各ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基が 5 - メチルシトシンである、前記化合物。

[態様 2 2] 以下の式： $mCes \quad Teo \quad Teo \quad Teo \quad Ae o \quad Tds \quad Tds$
 $mCds \quad mCds \quad Ads \quad Ads \quad Ads \quad Gds \quad Gds \quad Gds \quad mCeo \quad A$
 $eo \quad Ges \quad mCes \quad Te$ (配列番号 3 6) に従う修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、式中、

A = アデニン、

mC = 5 - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシエチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である、前記化合物。

[態様 2 3] 以下の式： $mCks \quad Aes \quad Gks \quad mCds \quad Tds \quad Tds \quad Tds$
 $Ads \quad Tds \quad Tds \quad mCds \quad mCds \quad Aes \quad Aes \quad Aks \quad Gk$ (配列番号 7 7) に従う修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、式中、

A = アデニン、

mC = 5 - メチルシトシン、

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシエチル修飾ヌクレオシド、

d = 2' - デオキシヌクレオシド、

s = ホスホロチオエートヌクレオシド間結合、

k = 拘束エチルである、前記化合物。

[態様 2 4] 共役 G a l N A c 部分をさらに含む、先行態様のいずれかに記載の化合物。

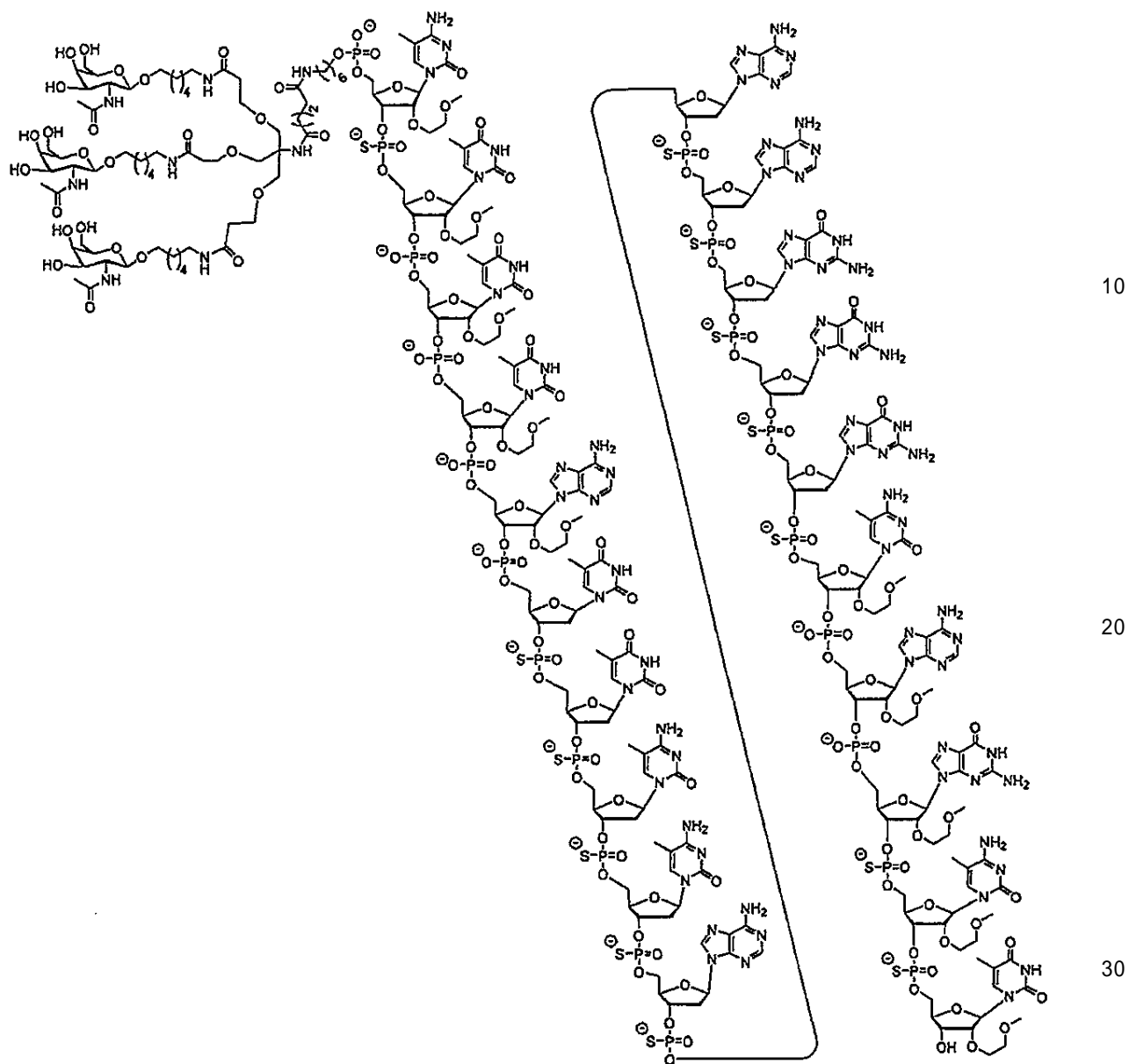
[態様 2 5] 以下の式に従う修飾オリゴヌクレオチド。

10

20

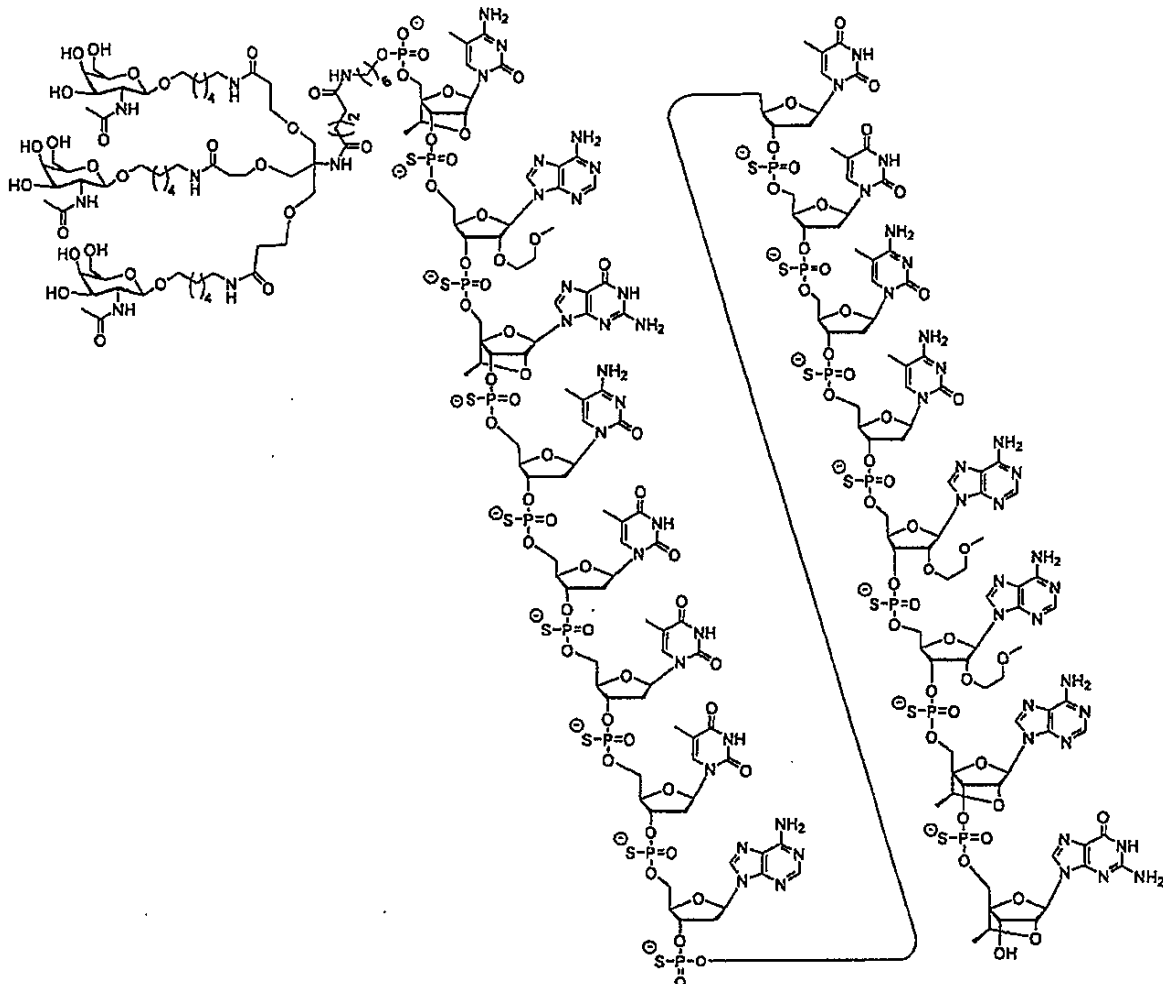
30

【化 2 7】



[態 様 2 6] 以下の式に従う修飾オリゴヌクレオチド。

【化 28】



〔態様 27〕先行態様のいずれかに記載の化合物もしくは修飾オリゴヌクレオチド、またはその塩、及び薬学的に許容可能な担体もしくは希釈剤を含む、組成物。

〔態様 28〕治療に使用するための、先行態様のいずれかに記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチドを含む、組成物。

〔態様 29〕医薬品の調製に使用するための、先行態様のいずれかに記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチドを含む、組成物。

〔態様 30〕細胞、組織、臓器または動物における TMPS6 を減少させる際に使用するための、先行態様のいずれかに記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 31〕動物における、鉄蓄積を減少し、ヘプシジン発現レベルを増加し、かつ/またはトランスフェリンの飽和度を減少するために使用するための、先行態様のいずれかに記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 32〕動物における過剰鉄蓄積に関連する疾患、障害または病態を治療し、予防し、またはその進行を遅らせる際に使用するための、先行態様のいずれかに記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 33〕前記疾患、障害または病態が、赤血球増加症、ヘモクロマトーシスまたは貧血である、態様 32 に記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 34〕前記貧血が、遺伝性貧血、骨髓異形成症候群または重症慢性溶血である、態様 33 に記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 35〕前記遺伝性貧血が、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ファンコニー貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、赤血球膜傷害、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素欠損症、または遺伝性出血性毛細血管拡張症である、態様 34 に記載の化合物または修飾オリゴヌクレオチド。

〔態様 36〕前記サラセミアが、サラセミアである、態様 35 に記載の化合物または

修飾オリゴヌクレオチド。

【配列表】

0006833705000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00

(74)代理人 100120112
弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100163784
弁理士 武田 健志

(72)発明者 グオ, スーリン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0 , カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 アガジャン, マリアム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0 , カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

(72)発明者 スウェイジ, エリック・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 0 1 0 , カールズバッド, ガゼル・コート 2 8 5 5

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 2 0 5 9 3 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 0 9 2 8 6 (U S , A 1)
特表 2 0 1 4 - 5 1 8 6 1 2 (J P , A)
特開 2 0 1 3 - 0 9 9 3 3 8 (J P , A)
特表 2 0 1 4 - 5 3 0 0 0 4 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
A 6 1 K 3 1 / 7 1 1 5
A 6 1 K 3 1 / 7 1 2
A 6 1 K 3 1 / 7 1 2 5
A 6 1 P 7 / 0 0
A 6 1 P 7 / 0 6
A 6 1 P 9 / 0 0
A 6 1 P 1 9 / 0 0
A 6 1 P 4 3 / 0 0
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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
D D B J / G e n e S e q
W P I D S (S T N)